

**IVONE MEDEIROS VIEIRA BERTELS**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FUNCIONAIS E  
MORFOLÓGICOS DA AÇÃO DA ANGIOTENSINA II  
SOBRE SEGMENTOS DE TÚBULOS PROXIMAIS  
ISOLADOS E CONSERVADOS EM SOLUÇÕES DE  
EURO-COLLINS E BELZER**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2009**

**IVONE MEDEIROS VIEIRA BERTELS**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FUNCIONAIS E  
MORFOLÓGICOS DA AÇÃO DA ANGIOTENSINA II  
SOBRE SEGMENTOS DE TÚBULOS PROXIMAIS  
ISOLADOS E CONSERVADOS EM SOLUÇÕES DE  
EURO-COLLINS E BELZER**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas

**Orientador: Prof. Dr. José Francisco Figueiredo**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2009**

*iii*

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

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

B461a

Bertels, Ivone Medeiros Vieira

Avaliação de parâmetros funcionais e morfológicos da ação da angiotensina II sobre segmentos de túbulos proximais isolados e conservados em soluções de euro-collins e belzer / Ivone Medeiros Vieira Bertels. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: José Francisco Figueiredo  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Angiotensina II. 2. Citoesqueleto. 3. Filamentos de actina.  
4. Túbulos contorcidos proximais. 5. Losartan. 6. Bloqueadores do receptor tipo I da angiotensina II. I. Figueiredo, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: “Functional and morphological behavior of preserved PCT during treatment using angiotensin II and Losartan”**

**Keywords:** • Angiotensin II  
• Cytoskeletal  
• Microfilaments  
• Kidney tubules proximal  
• Losartan  
• Angiotensin II type I receptor blockers

**Titulação: Doutor em Clínica Médica**

**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. José Francisco Figueiredo**

**Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo**

**Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D’Ancona**

**Profa. Dra. Doris Falkenstein**

**Prof. Dr. Luiz Antonio Ribeiro de Moura**

**Data da defesa: 13-03-2009**

---

# Banca examinadora da tese de Doutorado

Ivone Medeiros Vieira Bertels

---

---

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

---

---

## Membros:

---

1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Doris Falkenstein

*Doris Falkenstein*

2. Prof. Dr. Luiz Antonio Ribeiro de Moura

*L. A. Ribeiro de Moura*

3. Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona

*Carlos Arturo Levi D'Ancona*

4. Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

*J. A. Rocha Gontijo*

5. Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

*J. F. Figueiredo*

---

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 13/03/2009

---

## DEDICATÓRIA

---

Dedico este trabalho  
ao meu pai,  
**IVAN ALVES VIEIRA** (*IN MEMORIAM*)  
que teria apreciado compartilhar este momento.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

Ao meu orientador, **PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO FIGUEIREDO**, cuja sabedoria e competência, sobretudo, paciência e dedicação, foram imprescindíveis na transmissão de tecnologia tão delicada como a técnica de microperfusão *in vitro*.

Ao **PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO DA ROCHA GONTIJO**, cuja visão e capacidade científica muito contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A todos aqueles professores, com os quais tive prazer em conviver durante a realização deste trabalho. Em especial, ao **PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER** por sua acessibilidade, constante disposição em ajudar e pelas valiosas sugestões durante a qualificação.

## AGRADECIMENTOS OFICIAIS

---

À **PROF. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD** pelo uso do Laboratório de microscopia confocal do **HEMOCENTRO** da **UNICAMP**.

À **CÂMARA** de **PESQUISA** da **FCM - UNICAMP**, pelo apoio com a análise estatística e correções de português e inglês.

À **FAPESP** - processo **nº01/10735-0**, à **FAEPEX** - processo **nº 00377/2004**, e ao **CNPq** - processo **nº 300190/79-4**, pelo apoio financeiro.

## AGRADECIMENTOS

---

À **CONCEIÇÃO**, cuja ajuda na avaliação deste trabalho, amizade e carinho foram incentivos nos momentos difíceis.

À **ANA RITA**, companheira de estudos e de discussão, que muito contribuiu para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À **GLÁUCIA**, ajuda especial na análise de resultados, permitindo um desfecho mais rico em termos de idéias.

À **LEDA**, cujo apoio e incentivo, durante este percurso, foram fundamentais.

À **NOEMI**, estagiária dedicada, contribuição importante na elaboração deste trabalho.

Aos colegas **PAULO, TERESA, MARIANA, LUCIENE, CAROLINA**, pela ajuda na captura de imagens com o microscópio confocal a laser.

À **CARINA**, colaboração precisa com o “end-note”.

À **SANDRA**, “designer”, preciosa e oportuna colaboração.

Ao **BRUNO**, eficiente ajuda com o “photoshop”.

Ao **ERASMO** e ao **JORGE**, da secretaria do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu marido, **DIRK**, compreensão nestes anos de trabalho intensivo.

À minha mãe, **GLÉSIA**, aos meus irmãos, **SANDRA, IVAN, LUIZ CARLOS, GILTON, DANIEL, JUSSARA, JESSÉ, JONAS, JUSCELINO, FLÁVIO FRANCISCO** e **GILBERTO**, pelo incentivo constante e carinho com que sempre me distinguiram.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE), **CONCEIÇÃO, GLÁUCIA, MEG, CARINA, KARLA/MARCOS, RHUBIA/RAFAEL, GIOVANNA, RIKA, PRISCILA, LÉO, THIAGO**, companheiros de churrascos alegres, durante este empreendimento.

À **LUCÉLIA, ZEZÉ, ANA, MARTA, CIDINHA, LAURIONE, CLAUDIMEIRE, HILDA e WAGNER**, por acompanharem de perto esta jornada.

A todos os **AMIGOS** e **COLEGAS** que souberam entender as minhas constantes ausências nas comemorações programadas ao longo da realização deste trabalho.

Ao **DEUS** de todos nós que, por nEle cremos somos esperançosos e nos tornamos capazes de seguir, construindo, sempre.

*“O PENSAMENTO É  
A FORÇA VIVA QUE TUDO CONSTRÓI”.*

**Ivan Alves**

**Introdução:** A qualidade da conservação obtida em um órgão e a duração do armazenamento seguro são dependentes do tipo de solução e tempo de conservação, estando sujeitas a intercorrências imprevisíveis. Em virtude disso, o parênquima renal e, particularmente, o túbulo contornado proximal (TCP), local onde ocorre necrose tubular aguda (NTA), são susceptíveis às mudanças na homeostase funcional do órgão, durante a conservação e durante a reperfusão pós-implante. O TCP reabsorve cerca de 70% de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}$  filtrados; sua membrana apical tem células especializadas com microvilosidades para aumentar a área de transporte unidirecional de solutos do lúmen para o sangue. O principal componente estrutural da bordadura em escova, filamentos de F-actina, interage com uma variedade de proteínas transmembranas, inclusive moléculas transportadoras de íons. Esta função é regulada por parâmetros fisiológicos e hormonais, sendo a Angiotensina II (AII) uma das principais envolvidas com o citoesqueleto de actina e proteínas associadas, mediada principalmente por seus receptores AT1.

**Métodos:** Neste trabalho, túbulos isolados de fragmentos frescos e de fragmentos conservados por períodos de 1 e 24h nas soluções de Euro - Collins (ECO) e de Belzer (UW) foram tratados com AII, losartan e AII+losartan, para medida do volume de absorção de fluido ( $J_v = \text{nl} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$  (microperfusão *in vitro*), e medida da intensidade (média) de pixel da fluorescência dos receptores AT1 e do citoesqueleto de actina (imunoistoquímica).

**Resultados:** **a)** Demonstrou-se que AII ( $10^{-12}\text{M}$ ) estimula absorção fluida ( $J_v$ ), que é diminuída com losartan ( $10^{-6}\text{M}$ ) em TCP frescos e também em TCP conservados em soluções de ECO 1h e UW 1-24h. Em túbulos conservados 24h em ECO, não houve absorção de fluidos. **b)** A média da intensidade de pixel de fluorescência dos receptores AT1 em túbulos frescos (sem conservação) apresentou discreta variação entre os grupos não estatisticamente significante. Em túbulos conservados 1h com ECO e UW, a média da intensidade de pixel de receptores AT1 estava aumentada no grupo sem drogas, quando comparados aos tratados com AII, losartan e AII+losartan. Entretanto, em túbulos

conservados 24h, ambas as soluções, houve aumento na média de intensidade do pixel de receptores AT1, no grupo tratado com AII, quando comparados aos demais grupos.

c) O citoesqueleto de actina em túbulos frescos (sem conservação) não mostrou variação estatisticamente significativa na média de intensidade de pixel entre os grupos (AII, losartan ou AII+losartan). No entanto, verificamos uma maior coesão entre os filamentos de actina de túbulos tratados com AII. A distribuição dos filamentos de actina em túbulos conservados em ECO 1h e UW 1 e 24h, mostrou-se uniforme, sem diferenças entre os grupos. Entretanto, em túbulos conservados em ECO 24h (tratamentos AII, losartan, AII+losartan) foi verificada alteração do citoesqueleto de actina.

**Conclusão:** Baseados nestes dados, verificamos que, na conservação do TCP realizada por tempo reduzido, as diferenças na composição das soluções escolhidas não acarretaram alterações estatisticamente significantes na capacidade de absorção de fluidos, na distribuição dos receptores AT1 e no citoesqueleto de actina. Porém, quando o tempo de conservação é estendido, a composição da solução utilizada no processo, interfere na qualidade da conservação, acarretando alterações no citoesqueleto de actina, determinando alterações que poderiam implicar em mudanças na função absorptiva, sendo que a solução de UW mostrou o melhor desempenho nestas condições experimentais.

**Introduction:** Depending on the preservation quality and duration, considering the solution composition and the preservation method, unexpected interurrences may occur. In consequence, the renal parenchyma and particularly the proximal convoluted tubule (PCT), site where the acute tubular necrosis (NTA) occurs, are susceptible to changes in the organ functional homeostasis during preservation in the post implantation reperfusion period. The PCT reabsorbs approximately 70% of filtered  $\text{Na}^+$  and  $\text{H}_2\text{O}$ , and its apical membrane has specialized cells with microvilli to increase the area of unidirectional solute transport from the lumen to the blood. The major structural component of brush border microvilli is the filamentous F-actin, which has been shown to interact with a variety of transmembrane proteins, including ion transport molecules. This function is regulated by physiological and hormonal parameters, such as angiotensin II (AII) interacting with actin cytoskeleton and associated proteins, mediated mainly through type I receptors (AT1R). After via different signaling pathways having been triggered, the varied functions are started, including fluid absorption ( $J_v$ ), which is directly related to the actin cytoskeleton.

**Methods:** Fresh (no preserved) and tubules preserved for 1h and 24hrs in Euro-Collins (EC) and Belzer (UW) solutions, treated with AII, losartan and AII+losartan, evaluated by “in vitro” microperfusion technique (fluid absorption ( $J_v = \text{nl. min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ )), and by immunohistochemical technique (AT1 receptor measurement and actin cytoskeleton).

**Results:** **a)** Our results showed that AII ( $10^{-12}\text{M}$ ) (physiological concentration) stimulates fluid absorption ( $J_v$ ), which is reduced with losartan ( $10^{-6}\text{M}$ ) in fresh PCT, such as PCT preserved for 1h in EC and for 1-24hrs in UW solutions. There was no fluid absorption ( $J_v \leq 0$ ) in tubules preserved for 24hrs in EC solution. **b)** The mean fluorescence intensity of pixel of AT1 receptors in fresh tubules (no preserved) showed discreet changes while using drug treatments; however, these differences were not statistically significant. In tubules preserved for 1h in EC and UW, the mean fluorescence intensity of pixel of AT1 receptors increased in the group with no drug treatment, when compared with tubules treated with AII, losartan and AII+losartan. However, the mean pixel intensity of AT1 receptors in

tubules preserved for 24hrs in both solutions increased in those treated with AII, when compared with other groups, control group, losartan and AII+losartan. c) When we examined actin cytoskeleton of fresh tubules (no preserved), comparing groups with no drug treatment and those treated with AII, losartan or AII+losartan, we verified that the variation in the mean pixel intensity of actin cytoskeleton, there was no difference statistically significant. However, we verified a greater cohesion in the actin filaments in tubules treated with AII. In tubules preserved in EC for 1h and UW for 1-24hrs there was a uniform distribution of actin filaments. However, it was verified disorganization in all groups (AII, losartan, AII+losartan) in tubules preserved for 24hrs in EC solution, showing that the organ preservation in this solution was not adjusted.

**Conclusion:** Based on these data, we verified that when PCT preservation was carried out for a reduced time (1h), the differences in the composition of the chosen solutions were not significant; however, when the preservation time was extended, the composition of the solution used in the process affected the preservation quality and altered the actin cytoskeleton, determining alterations that could imply in changes in its absorptive functions. The UW solution showed better performance in these experimental conditions.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ADF</b>	Fator despolimerizante de actina (Actin depolymerizant factor)
<b>AI</b>	Angiotensina I
<b>AII</b>	Angiotensina II
<b>AIII</b>	Angiotensina III
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclico (“3,5-Cyclic Adenosinemonophosphate”)
<b>ANP</b>	Peptídeo atrial natriurético (atrial natriuretic peptide)
<b>AT1</b>	Receptor de angiotensina II, tipo 1.
<b>AT2</b>	Receptor de angiotensina II, tipo 2.
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BRAs</b>	Bloqueadores de receptores AT1
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio iônico
<b>CAGE</b>	Enzima geradora de angiotensina II, sensível à quimostatina (Chymostatin-sensitive angiotensin II-generating enzyme)
<b>CAMs</b>	Moléculas de adesão celular

<b>COX</b>	Ciclooxigenases
<b>CPT</b>	Célula proximal tubular
<b>DAG</b>	Diacilglicerol (Ativador endógeno das PKCs)
<b>DMEM</b>	Meio Dulbeccos modificado (Dulbeccos modified Eagle's medium)
<b>DuP-753</b>	(2)-n-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-(1H-tetrazole-5-yl) bifenil-4-yl) metil] imidazole, potassium salt (losartan)
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina I para angiotensina II
<b>ECO</b>	Solução de Euro - Collins
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FDA</b>	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (Food and Drug Administration)
<b>GC</b>	Guanilato ciclase (enzima produtora de GMPc)
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteínas-G (G-protein coupled receptors)
<b>GST</b>	glutathiona reduzida (glutathione-S-transferase)
<b>GSSG</b>	Glutathiona oxidada
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>GTx</b>	Glutathiona peroxidase
<b>H<sup>+</sup></b>	Íons hidrogênio

<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bicarbonatos
<b>HTK</b>	Solução de histidina-triptofano-cetoglutarato
<b>HEA</b>	Hidroxi-etil-amido
<b>ICC</b>	Insuficiência cardíaca congestiva
<b>IECA</b>	Inibidores da enzima conversora de angiotensina II
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IP3</b>	Inositol-trifosfato
<b>IRA</b>	Insuficiência renal aguda
<b>JAK</b>	Janus quinase
<b>LAP</b>	Leucina-aminopeptidase
<b>LDH</b>	Lactato-desidrogenase
<b>L-NAME</b>	Inibidor óxido nítrico sintase (N(G)-nitro-L-arginine methyl ester)
<b>MAPK</b>	Proteína quinase mitógena ativada (Mitogen-activated protein kinases)
<b>MCP-1</b>	Monocyte-chemoattractant protein-1
<b>Mm</b>	Milímetro
<b>Min</b>	Minuto
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro (Messenger RNA)
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NAK</b>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase, bomba de sódio

<b>NBC</b>	Cotransportador basolateral de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NHE1</b>	Trocador de $\text{Na}^+$ e $\text{H}^+$ , Isoforma 1 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger type1)
<b>NHE3</b>	Trocador de $\text{Na}^+$ e $\text{H}^+$ , Isoforma 3 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger type3)
<b>NHERF's</b>	Fatores regulatórios de trocadores de $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger regulatory factor)
<b>nl</b>	Nanolitro
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Enzima sintetizadora de óxido nítrico (nitric oxide synthase)
<b>OH•</b>	Radical hidroxil
<b>PBS</b>	Solução salina tampão - fosfatos (Phosphate buffered saline)
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PKA</b>	Proteína quinase A (dependente de AMPc)
<b>PKC</b>	Proteína quinase C (dependente de $\text{Ca}^{2+}$ )
<b>PKII</b>	Proteína quinase II $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dependente (CaM-K II)
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub> (prostaciclina)
<b>PGLs</b>	Prostaglandinas

<b>SFKs</b>	Tirosina-quinases da família Src
<b>SRA</b>	Sistema renina angiotensina
<b>SRAA</b>	Sistema renina angiotensina-aldosterona
<b>TCP</b>	Túbulo contornado proximal
<b>TGF-B1</b>	Fator de crescimento transformador-B1
<b>TJ</b>	Junções oclusivas (“tight junctions”)
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)
<b>t-PA</b>	Ativador de plasminogênio tecidual
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xix
<b>ABSTRAT</b> .....	xxi
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>1.1- Aspectos gerais</b> .....	39
<b>1.2- Conservação renal e hipotermia</b> .....	40
<b>1.3- Soluções de conservação</b> .....	42
1.3.1- Composição eletrolítica.....	44
1.3.2- Capacidade de tamponamento.....	44
1.3.3- Impermeantes.....	45
1.3.4- Colóides.....	45
1.3.5- Seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	46
1.3.6- Efeitos secundários dos componentes.....	46
<b>1.4- Isquemia e reperfusão na conservação</b> .....	47
<b>1.5- Citoesqueleto de actina em células tubulares</b> .....	51
<b>1.6- Sistema-renina-angiotensina-aldosterona</b> .....	55
<b>1.7- Receptores AT1, proteína-G e vias de sinalização</b> .....	60

<b>1.8- Bloqueadores de angiotensina AII.....</b>	<b>63</b>
<b>1.9- Angiotensina II e proteínas de transporte no rim.....</b>	<b>65</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
<b>2.1- Objetivo artigo 1 (PUBLICADO).....</b>	<b>71</b>
<b>2.2- Objetivo artigo 2 (ACEITO).....</b>	<b>71</b>
<b>2.3- Objetivo artigo 3 (SUBMETIDO).....</b>	<b>71</b>
<b>3- CAPÍTULOS.....</b>	<b>73</b>
<b>3.1- Artigo 1 (PUBLICADO).....</b>	<b>77</b>
<b>3.2- Artigo 2 (ACEITO).....</b>	<b>85</b>
<b>3.3- Artigo 3 (SUBMETIDO).....</b>	<b>91</b>
<b>4- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>121</b>
<b>5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>129</b>
<b>6- APÊNDICES.....</b>	<b>147</b>

# **1- INTRODUÇÃO GERAL**

---

## 1.1- Aspectos gerais

De uma forma geral, o número de pacientes que espera pelo transplante renal vem subindo nos últimos anos e uma percentagem alta de rins doados nos centros de referência é oriunda de doadores em estado de morte cerebral. Estes órgãos provêm de situações caracterizadas por instabilidade hemodinâmica, com aporte de grande quantidade de catecolaminas que contribuem para alterações na circulação e no sistema imune. Desta forma, também poderão ocorrer complicações em razão do estado nutricional do doador, restringindo a capacidade funcional pós-transplante (1-3).

O procedimento de coleta do órgão começa com um período de isquemia quente que se refere ao período desde a parada da circulação para o rim e o início da armazenagem fria, temperatura de 0-4°C, quando o órgão é resfriado com uma solução de perfusão fria ainda no doador, ou após a retirada, e termina quando o tecido atinge a temperatura fisiológica após os procedimentos do implante. No caso do doador em morte encefálica que, obrigatoriamente, a perfusão com solução gelada (0-4°C) começa *in situ*, este período é praticamente igual a zero. No caso do doador vivo, o período entre o pinçamento dos vasos renais, retirada do rim e o início da perfusão com solução é de menos de dois minutos. Entretanto, se houver necessidade de transferência para outras localidades, este órgão será exposto a uma maior isquemia fria, elevando as chances de maiores danos ao tecido renal (4-7).

Após a implantação no receptor, o rim ainda sofrerá os efeitos da reperfusão, com o restabelecimento da circulação sangüínea e o aporte de oxigênio, o que é prejudicial tanto quanto a própria isquemia e hipóxia, conforme demonstrado por diversos trabalhos nesta área (8, 9).

Além da lesão isquêmica e risco de insuficiência renal aguda (IRA), comumente chamada de “necrose tubular aguda” (NTA), os danos isquêmicos podem iniciar inflamação e desencadear mecanismos de rejeição do enxerto, com infiltração de células T e dendríticas. A NTA é o processo de lesão mais comum achado em enxerto renal no início do período pós-transplante, mascarando, freqüentemente, os sinais de outras alterações que acontecem em transplantes de rins, tais como a ativação do sistema imune e a maior sensibilização à nefrotoxicidade pelas drogas imunossupressoras (10-13).

A isquemia e a reperfusão também contribuem para os danos não imunológicos que complicam o transplante renal, e elevam os níveis intra-renais de Angiotensina II (AII) no período pós-reperfusão geralmente associado com redução da taxa de filtração glomerular pela ativação da vasoconstrição intra-renal, embora a literatura mostre que nestas circunstâncias, a capacidade de resposta à AII esteja diminuída e a intensidade de receptores AT1 esteja aumentada no túbulo contornado proximal (TCP) (14).

Assim, durante a coleta, estocagem e implante, muitos fatores determinam a viabilidade futura do órgão, devendo ser levados em consideração a origem do órgão a ser implantado, o tipo de solução escolhida e seus componentes, assim como o tempo envolvido no processo. Sendo esses fatores, os principais responsáveis pelo aumento dos riscos de disfunções do enxerto, das taxas de mortalidade e da elevação de custos com os cuidados médicos, tornam-se necessários conhecimentos dos mecanismos envolvidos no período pós-conservação e pós-implante do órgão, para que estratégias corretas sejam adotadas durante estas intervenções, garantindo o sucesso do procedimento (8, 15-17).

## **1.2- Conservação renal e hipotermia**

A conservação renal é um processo cujo objetivo é assegurar a viabilidade funcional do órgão a ser transplantado e garantir que este, ao ser perfundido e estocado com soluções balanceadas a frio, possa, de fato, ser conservado com as suas características funcionais, morfológicas e bioquímicas integrais (8, 15-20).

Durante a remoção do órgão, é realizada uma perfusão vascular refrigerada para a remoção do sangue e impedir formação de coágulos e subsequente obstrução da micro-vascularização e para permitir equilíbrio da temperatura da solução conservadora refrigerada com o tecido no início da estocagem (7, 17).

O rebaixamento da temperatura visa inibir crescimento bacteriano, diminuir as necessidades metabólicas, inativar as reações mediadas pelas enzimas, diminuindo o uso de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto, a hipotermia (e hipóxia) ocasiona efeitos colaterais que resultam em lesão celular, tais como:

Inibição da bomba de sódio, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (NAK) provocando:

- Entrada de  $\text{Na}^+$  para o meio intracelular;
- Entrada do  $\text{Cl}^-$  extracelular por troca com o  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  intracelular;
- Acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}$  com aumento do volume da célula;
- Aumento da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio citoplasmático.

Outras decorrências da hipotermia são:

- Acúmulo de metabólitos, inclusive íons  $\text{H}^+$ ;
- Alterações de fluidez de membranas, alterando permeabilidade;
- Depleção de estoques de ATP;
- Liberação de enzimas lisossomais e autólise;
- Perda de fosfolípidos de membrana;
- Produção de espécies reativas de oxigênio;
- Compactação de hemáceas remanescentes com obstrução e lesão vascular.

Dessa forma, o entendimento dos fenômenos celulares envolvidos na manutenção das diferentes estruturas do néfron, tanto em condições-controle como em situações de agravo, é fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de conservação renal, que proporcionem sucesso aos transplantes.

### 1.3- Soluções de conservação

As soluções protetoras eletrolíticas e/ou coloidais são estéreis e apirogênicas para perfusão de órgãos, antes ou imediatamente após a colheita e para estocagem e conservação hipotérmica dos mesmos, no tempo que precede o transplante.

Portanto, as soluções de conservação a frio devem ser capazes de minimizar o edema celular causado pela hipotermia, prevenir a acidose celular, evitar os danos celulares por espécies reativas do metabolismo do oxigênio e fornecer substratos energéticos para a regeneração de ATP durante a reperfusão (6-8, 15, 17).

O desenvolvimento dessas soluções teve início na década de 60, a partir dos trabalhos de Belzer em transplante renal. Estas pesquisas abriram portas para o aperfeiçoamento de novas soluções de conservação. De 1970 até 1986, as soluções mais utilizadas diferiam-se pela composição eletrolítica e pela osmolaridade (iso ou hiper-osmolar): Collins, Euro - Collins (ECO), solução de citrato hipertônico (Marshall) foram as mais utilizadas (16).

A solução de ECO foi introduzida em 1977 (Tabela 1), a partir de uma modificação da solução de Collins, realizada pela Organização de Eurotransplantes. O magnésio foi retirado da formulação desta solução em virtude da indução à formação de cristais de fosfato de magnésio durante o armazenamento a frio, o que gerava danos ao parênquima renal. Esta é uma solução do tipo intracelular padrão para conservação de rim (16).

Em 1986, Belzer e Southard padronizaram uma nova e revolucionária solução, a solução de "Universidade de Wisconsin" (UW), contendo inibidores de edema celular, tampões eficientes e nutrientes que propiciaram um expressivo aumento no tempo de conservação de órgãos, possibilitando, inclusive, o transplante de modo eletivo e o transporte de órgãos a outras localidades, viabilizando a distribuição dos órgãos para os diversos centros transplantadores, tornando possível a captação de órgãos à distância (7, 8, 17, 20).

Nos últimos 20 anos foram desenvolvidas várias soluções dos tipos extra e intracelulares, assim classificadas de acordo com a concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ; dentre as soluções do tipo extracelular temos solução de Lyon (LYPS), solução de Celsior, solução Hospital St. Thomas (STH) e Universidade de Wisconsin (UW-1), que mimetizam o fluido extracelular com concentração de  $\text{Na}^+$  acima de 70mmol/L e  $\text{K}^+$  entre 5 e 30mmol/L.

As soluções do tipo intracelular, dentre elas Universidade de Wisconsin (UW-2), solução Custodiol ou solução histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK) e Euro - Collins (ECO), mimetizam o fluido intracelular, apresentando concentração de  $\text{Na}^+$  menor que 70mmol/L e  $\text{K}^+$  entre 30 e 125mmol/L. As soluções intracelulares têm baixa osmolaridade, o que permite a adição de impermeantes, porém a alta concentração de  $\text{K}^+$ , também poderia gerar danos celulares (18, 19).

A solução UW intracelular (Tabela 2) tem atividade osmótica mantida através de substratos inertes, como lactobionato de potássio e rafinose, que atuam prevenindo a hipopotassemia e o edema celular. A adição do hidróxi-etil-amido (HEA), substância coloidosmótica não antigênica, visa minimizar o edema intersticial deixando o vaso com um conteúdo celular coloidal, semelhante ao plasma. A glutatona e o alopurinol sequestram radicais livres, a adenosina fornece substrato para a síntese de ATP. Estes constituintes tornam esta solução melhor estruturada para a manutenção da viabilidade celular (17, 20).

A partir de 2002, a solução ECO deixou de ser comercializada nos Estados Unidos, mas na Europa e em países da África e da América do Sul, o seu uso tem sido mantido pela maioria dos grupos de transplante renal. Em razão do alto custo da solução UW, no Brasil, em situações em que apenas o rim será transplantado, a solução ECO continua sendo a escolhida, e a solução de UW utilizada principalmente na retirada múltipla de órgãos (6, 7, 11, 12).

### 1.3.1- Composição eletrolítica

As soluções do tipo intracelulares são eficazes em impedir o edema celular. A troca dos líquidos entre os compartimentos celular, intersticial e vascular obedece ao equilíbrio de Donnan. A compensação entre cátions extracelulares ( $\text{Na}^+$ ) e ânions intracelulares (proteínas, aminoácidos) impede o edema celular. O uso de concentração elevada de  $\text{K}^+$  nestas soluções protege o compartimento intracelular em circunstâncias em que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATP-ase é inibida (hipotermia). Nestas situações, a alta concentração de  $\text{K}^+$  da solução, impediria que o  $\text{K}^+$  intracelular passasse para o meio extracelular, por troca com o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  que entrariam na célula, gerando uma força osmótica que dirigiria o líquido para dentro da célula com formação de edema. No entanto, o uso de concentrações altas de  $\text{K}^+$  poderia causar disfunção endotelial que se caracteriza por diferenciação celular prejudicada, exibindo fenótipos com aumento da atividade mitótica, diminuição do contato intercelular, aumento da permeabilidade para macromoléculas e aumento da expressão de moléculas que induzem vasoconstrição, adesão e trombose (18, 19).

O uso do  $\text{Mg}^{2+}$  nas soluções de conservação a frio teria efeitos benéficos devido à atividade vasodilatadora e de inibição metabólica que previne a perda intracelular de  $\text{K}^+$ , inibindo o aumento deletério de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, apesar de haver riscos de precipitação do  $\text{Mg}^{2+}$  no parênquima renal, como citado em experimentos utilizando a solução de Collins (20, 21).

### 1.3.2- Capacidade de tamponamento

Uma característica importante das soluções de conservação é a prevenção da acidose celular. Os tampões frequentemente usados são: fosfato, histidina ou citrato. O tampão adequado é importante para impedir a acidose celular, evitando a ativação das fosfolipases com conseqüente lesão da membrana celular (22).

### 1.3.3- Impermeantes

Os impermeantes são adicionados às soluções para neutralizar o edema celular causado pelas forças osmóticas intracelulares geradas por proteínas e ânions, e ficam distribuídos no espaço intravascular ou intersticial. Eles reduzem o edema celular, gerando uma força osmótica fora da célula. Os impermeantes eficazes em soluções de conservação são os açúcares e os ânions. A eficácia dos açúcares está relacionada ao tamanho da molécula. Pela ordem de tamanho, o mais eficaz é a rafinose (594 mW), a sacarose (342 mW), o manitol (182 mW) e a glicose (180 mW), cuja substituição por moléculas maiores, como a da sacarose, vem sendo estudada atualmente, apesar de sua discreta toxicidade. Se as moléculas de açúcares atravessarem a membrana, em quantidades razoáveis, poderão contribuir para o deslocamento das forças osmóticas do lado intersticial para o lado intracelular, levando ao edema celular.

Embora o manitol também possa atravessar a membrana celular, continua sendo usado devido à sua ação final como removedor de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Os impermeantes não-sacarídeos reduzem o edema celular pela força eletroquímica. São ânions, tais como o citrato, o gluconato e o ácido lactobiônico. O tamanho e a carga determinam a eficácia destes ânions. O mais efetivo é o ácido lactobiônico (358 mW), que ligado ao  $K^+$  forma o lactobionato de  $K^+$ , com ação antioxidante protegendo a membrana. Em seguida aparecem o cloreto e o ácido glucônico (23, 24).

### 1.3.4- Colóides

Em estocagem fria, a formação de edema intersticial durante a nefrectomia e a perda sanguínea *in situ* é impedida com a adição de colóides. No entanto, existem opiniões divergentes quanto à necessidade de seu uso nesta situação, porém seus efeitos benéficos são vistos no pós-transplante, após longo prazo de isquemia fria.

Desde que o amido (hidroxi-etil-amido) foi apontado como de menor toxicidade e importante componente para soluções de conservação, outros colóides, tais como dextranas e polietilenoglicol (PEG) também têm sido testados, mas sabe-se que estas substâncias não influenciam nos sistemas imunológico e de coagulação (25).

### 1.3.5- Seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de EROs pode ser parcialmente prevenida pela inibição das enzimas que as produzem, assim a xantina oxidase, enzima geradora de precursores de EROs é inibida por alopurinol. Outra substância usada é a glutathiona reduzida (GSH), tripeptídeo natural formado pelo ácido glutâmico, cisteína e glicina. O mecanismo principal envolvido na função específica de detoxificação de EROs é a oxidação de GSH reduzida a glutathiona oxidada (GSSG), catalizada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx). Entretanto, a meia vida da GSH é limitada (oito dias a 4°C) e, por esse motivo, deverá ser adicionada à solução de conservação apenas momentos antes de seu uso (26-28).

### 1.3.6- Efeitos secundários de componentes

Alguns componentes, além da função primária atribuída, têm um efeito secundário benéfico na conservação, impedindo danos ao órgão e mantendo sua viabilidade.

→A histidina, além de tampão, tem ação impermeante e é inibidor de metaloproteinases (endopeptidases dependentes de zinco). É também quelante do cálcio, cujo aumento intracelular poderia provocar morte celular por vários mecanismos: ativação de proteases, formação de radicais livres, peroxidação de lipídios e apoptose celular, entre outros.

→O ácido lactobiônico, assim como a histidina, é também quelante de  $Fe^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  o que previne a entrada do  $Ca^{2+}$  para a célula, diminuindo a ativação das enzimas hidrolíticas, que poderiam alterar a membrana celular. Entretanto, em consequência da quelação do  $Ca^{2+}$  intravascular ocorre um deslocamento de  $Ca^{2+}$  para fora da célula, o que resulta

também em diminuição de  $K^+$  intracelular. Alguns autores relatam melhora da conservação com o uso de verapamil e nifedipina, que são vasodilatadores e bloqueadores de canais de  $Ca^{2+}$ , melhorando a perfusão renal (29, 30).

→A Glutathiona reduzida (GSH), além de prevenir danos induzidos pelas EROs, também melhora a capacidade da célula em regenerar o ATP através da manutenção da integridade da membrana celular; age como tampão sulfidril e participa dos mecanismos de transporte de aminoácidos através da membrana celular (28).

#### **1.4- Isquemia e reperfusão na conservação**

No transplante renal, quatro componentes causam danos ao órgão transplantado: os efeitos da isquemia e hipotermia durante o armazenamento a frio e os efeitos da reperfusão e reaquecimento, depois do transplante (5, 8, 10-13, 27, 29, 31).

Sob condições hipotérmicas, o metabolismo é diminuído cerca de até duas vezes para cada  $10^{\circ}C$  de rebaixamento de temperatura. Assim, a  $4^{\circ}C$  ainda há atividade metabólica mínima. Por outro lado, a taxa de metabolismo pode rapidamente consumir o conteúdo de ATP celular, além de diminuir a capacidade de síntese de ATP para fornecer a energia requerida. Nestas circunstâncias, a fonte de energia utilizada é a defosforilação do ADP para adenosina monofosfato (AMP) e adenosina, sendo que em condições anaeróbicas, a adenosina é degradada para inosina e hipoxantina (26).

A redução dos níveis intracelulares de ATP leva à diminuição da atividade da bomba  $Na^+/K^+$ ATP-ase (NKA), resultando no acúmulo intracelular de  $Na^+$  com subsequente aumento do influxo de  $H_2O$ , perda de  $K^+$  por vazamento passivo, através de canais específicos presentes na membrana basolateral, e pela redução do influxo basolateral decorrente da falta de energia para a bomba NKA, o que leva ao edema celular, dificultando a perfusão renal.

Em paralelo, na ausência de oxigênio ocorre a glicólise anaeróbica para gerar energia e, durante esse processo, a metabolização de 1mol de glicose formará 2moles de ATP, sendo que em condições aeróbicas seriam gerados 38moles. Durante esse processo

anaeróbico, 2moles de ácido láctico também são formados, o que contribui para a acidose progressiva, resultando em ativação das fosfolipases e proteases que induzem a lises lisossomais, podendo levar à morte celular (29, 31, 32).

Outro efeito importante, associado à redução da atividade das bombas iônicas na depleção de ATP, é o aumento na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, importante mediador de danos isquêmicos na insuficiência renal aguda que participa da patogênese da vasoconstrição e constrição mesangial (29, 30, 33).

A elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico resulta na ativação das fosfolipases que promovem destruição da membrana celular e ativação de proteases que convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase, enzima ricamente distribuída no tecido renal, responsável pela transformação do substrato hipoxantina em xantina, quando em presença do oxigênio durante a reperfusão. Em conseqüência, são formadas altas proporções de uratos e de espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de causar danos celulares através de peroxidação lipídica, oxidação da cadeia lateral de aminoácidos, formação de ligações cruzadas entre proteínas, fragmentação protéica pela oxidação do seu esqueleto peptídico, dano do DNA incluindo a quebra de fitas, caminhando para a NTA (27, 34).

Outra importante conseqüência da elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico é a apoptose, evento celular participante ativo da homeostase entre a taxa de proliferação e morte em um tecido, auxiliando na manutenção do tamanho e forma dos tecidos e dos órgãos adultos ou em desenvolvimento (35).

As “famílias” de proteínas reguladoras de apoptose incluem os receptores de morte celular como a citocina FasL que interage com o receptor Fas (glicoproteína transmembrana), as proteínas Bcl2, compreendendo membros pró-apoptóticos (Bax) e anti-apoptóticos como a BclxL, e as caspases (caspase 3), que são moléculas efetoras intracelulares da apoptose (36).

A molécula FasL é expressa pelas células infiltrantes (linfócitos T ativados) do interstício e representa, ao ligar-se ao receptor Fas expresso pelas células tubulares, um dos mecanismos clássicos mais importantes de “ignição” do processo de apoptose,

desencadeando a ativação seqüencial intracelular da cascata das caspases. Outro mecanismo de ativação intracelular das caspases envolvendo o complexo perforina-granzima, não necessita da interação com o receptor Fas (37).

A Perforina é responsável pela atividade citolítica do linfócito T citotóxico (T CD8+). Esta proteína submete-se à polimerização na presença de  $Ca^{2+}$ , promovendo a formação de poros na membrana da célula-alvo. Além de permitir a entrada de granzima B na célula, estes poros induzem mudanças no gradiente osmótico celular, conduzindo à lise celular. A Granzima B é um grânulo serino-protease do linfócito T citotóxico, com habilidade de clivar proteínas e é capaz de ativar várias caspases celulares. Estes grânulos são liberados quando o linfócito reconhece um antígeno estranho presente na superfície das células infectadas do hospedeiro, promovendo uma cascata de ativação de nucleases, causando a fragmentação do DNA. Conseqüentemente, a célula-alvo submete-se a apoptose. Alguns estudos mostram expressão de RNA mensageiro de perforina e granzima B em biópsias de enxertos com episódios de rejeição aguda (38).

No rim transplantado a apoptose poderá desempenhar um papel importante na deleção de diversas células do tecido renal, principalmente células do epitélio tubular, submetidas a agravo agudo ou crônico. Esta apoptose poderá ser mediada pelas moléculas Fas e caspase 3, através do estímulo gerado pela hipóxia do tecido isquêmico na necrose tubular aguda ou pelo fenômeno inflamatório na rejeição aguda (39).

A expressão da molécula BclxL (anti-apoptótica) reflete, provavelmente, a mobilização dos mecanismos de proteção da célula, face aos mecanismos indutores de apoptose. Dessa forma, é encontrada tanto na fase aguda como crônica em células tubulares e do interstício (40).

Além do  $Ca^{2+}$ , existem vários agentes que podem induzir o processo apoptótico, dentre eles podem ser citados alguns ativadores fisiológicos como fatores de crescimento, neurotransmissores, glicocorticóides. Fatores ambientais também podem ser considerados indutores de apoptose, como, por exemplo, os choques de temperatura, toxinas bacterianas, radicais livres, agentes oxidantes, agentes genéticos. A apoptose poderá ser induzida, também, por agentes farmacológicos, como por exemplo, os quimioterápicos, antibióticos, radiações, e o etanol.

Em experimentos após 3 a 6 horas de isquemia, seguida de reperfusão, foi verificada a presença de corpos apoptóticos através da microscopia eletrônica (41). As alterações bioquímicas e moleculares, como a liberação de citocromo c do espaço intermediário da mitocôndria, aparecem mais precocemente, cerca de uma hora após indução de morte celular, antes da despolarização da mitocôndria e ativação de caspases. Os danos às membranas mitocondriais ocorrem cerca de duas horas após a reperfusão, observando-se ruptura de membranas internas e desorganização de suas cristas (42).

Na perda da função renal, durante a isquemia e reperfusão ainda devem ser considerados como mediadores as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e os metabólitos do ácido araquidônico (AA), pois a liberação de radicais livres, citocinas e outros agentes pró-inflamatórios, durante a reperfusão, alteram a permeabilidade das membranas capilares e celulares contribuindo, substancialmente, para alterar os volumes de água contidos nos diferentes compartimentos do organismo.

O óxido nítrico (NO), conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (FRDE), é uma molécula gasosa e reativa com uma meia-vida de poucos segundos. É produzido a partir do aminoácido L-arginina pela ação enzimática das isoenzimas óxido-nítrico-sintase (NOS). Duas destas isoenzimas são dependentes de  $Ca^{2+}$  e expressas constitutivamente nas células endoteliais (eNOS) e nas células neuronais (nNOS). A expressão da terceira isoenzima (iNOS), independente de  $Ca^{2+}$ , é dependente de um estímulo imunológico ou inflamatório, podendo ser expressa em uma variedade de células (43). A ação do óxido nítrico não se dá através da utilização de receptores celulares, apenas difunde-se pela membrana celular, ativando seu segundo mensageiro, guanilato ciclase que, por sua vez atua sobre proteínas-alvo, ativando várias cascatas de proteínas quinases, incluindo as vias da proteína quinase mitógena ativada (MAPK), Janus quinase (JAK) e Jun N-terminal quinase (JNK) (34). Essas respostas intracelulares desencadeiam efeitos fisiológicos importantes, como o de ser um potente vasodilatador, com importante repercussão tanto na regulação da pressão arterial quanto na função renal (34, 43, 44).

Revisões recentes têm demonstrado que o NO é um importante vasodilatador pré-glomerular, aumentando o fluxo sanguíneo renal, entretanto supõe-se que tenha papel ambíguo durante a isquemia-reperfusão tecidual, ou seja, na isquemia, ele parece proteger o

tecido com sua propriedade vasodilatadora e ação contra o acúmulo leucocitário; contudo, durante a reoxigenação do tecido isquêmico, o NO pode reagir com espécies reativas de oxigênio, atuando nas vias de sinalização de fatores de crescimento, como o “nerve growth factor” (NGF) e o “vascular endothelial growth factor” (VEGF) ou reagir diretamente com moléculas de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), formando o radical peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), potente oxidante celular, envolvido na progressão da doença renal, causador da lipoperoxidação de membranas celulares (34, 43, 44).

O ácido araquidônico, também importante na síndrome de isquemia e reperfusão, é metabolizado pela via da ciclooxigenase (COX), produzindo uma variedade de prostaglandinas (PGs), que são metabolizadas pela PGE-sintase (PGES) para prostaglandina-E2 (PGE2), envolvida no controle do fluxo sanguíneo renal. Em experimentos com indução à isquemia quente e reperfusão em ratos, ocorreu aumento da expressão de COX-2 e PGES, com danos tissulares (45, 46).

A isquemia induz ainda a produção de fatores de crescimento fibrogênicos, como o fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) expressão de moléculas de adesão epitelial, produção de citocinas e fator de necrose tumoral (TNF), permitindo a translocação do epitélio por leucócitos, com invasão do parênquima renal (47).

A resposta imunológica ao enxerto também poderá ser potencializada pela isquemia, aumentando a expressão antigênica dos complexos principais de histocompatibilidade (MHC) (48).

Resumindo, a isquemia e reperfusão, associadas à hipertensão induzida por ativação do SRA, geram danos, ao tecido renal, que se apresentam como uma complexa síndrome, envolvendo vasoconstrição renal, e danos glomerular e tubular.

### **1.5- Citoesqueleto de actina em células tubulares**

A orientação inicial para a célula epitelial tubular renal tornar-se totalmente diferenciada é dependente da expressão seqüencial de determinados polipeptídios, os fatores de crescimento, que induzem à proliferação celular e à produção de matriz

extracelular. A interação celular através de receptores de superfície com proteínas da matriz extracelular induz à organização do citoesqueleto de actina, o qual, por sua vez, orienta espacialmente, a distribuição de proteínas de membrana e de organelas intracelulares em determinados domínios. Posteriormente, a formação de contatos célula-célula fortalece a definição destes domínios, fazendo função de barreira para o fluido tubular, constituindo um epitélio polarizado, permitindo assim o transporte vetorial de água e solutos (49).

As células do TCP são dotadas de um alto grau de capacidade endocítica para lidar com o filtrado glomerular, e este padrão endocítico pode ser duplicado por hormônios como a angiotensina II, promovendo a internalização de proteínas e alguns outros componentes do filtrado glomerular na membrana apical, conduzindo-os aos compartimentos intracelulares (50, 51).

Em condições fisiológicas, o TCP tem uma bem definida rede de actina, a qual interage com as microvilosidades apicais também ricas em actina, com a rede terminal, com os complexos juncionais, com os substratos de ligação celular e, indiretamente, com o ancoramento de proteínas na membrana basolateral. As  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e canais de  $\text{Na}^+$  são fixados pelo citoesqueleto de actina, em domínios específicos na membrana, apropriados às suas funções; posteriormente à inserção na membrana, estas proteínas podem ser realocadas para submembranas. A atividade de canais de íons na membrana pode ser modulada pelo citoesqueleto de actina, cuja densa rede de filamentos restringe o movimento de vesículas ao lado interno da membrana (52-54).

Dessa forma, o citoesqueleto de actina é uma estrutura celular dinâmica que interage com uma variedade de proteínas transmembrana, incluindo moléculas de transporte de íons como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (NKA), o co-transportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ , o trocador basolateral  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 1 (NHE1) e o trocador apical  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 3 (NHE3), importantes para a função renal (55).

A integridade do citoesqueleto de actina e sua interação com a membrana da célula tubular proximal e com as proteínas associadas estabilizam e facilitam as funções específicas das células do TCP, como absorção e secreção, fornecendo a estrutura básica para a polarização celular (53).

Evidências sugerem que a reestruturação do citoesqueleto de actina pode desempenhar um papel importante nas alterações da membrana, interferindo em diversos eventos como manutenção da estrutura e da função celular, polaridade, endocitose, exocitose, divisão, migração, adesão, transporte de fluido extracelular-celular e celular-celular, transdução de sinal e ativação de canais de íons, que são dependentes do equilíbrio entre agregação e desagregação de actina (56, 57).

Durante a isquemia quente, o metabolismo permanece ativo e, rapidamente as enzimas intracelulares degradam os componentes essenciais, causando danos celulares. Assim, com apenas 5 minutos de oclusão de artéria renal *in vivo* (isquemia) ocorrem alterações funcionais e estruturais dentro das células tubulares como rompimento da actina microvilar, fator importante na fisiopatologia da insuficiência renal aguda (IRA) (58-62).

O quadro de insuficiência renal aguda, ocasionado por um processo isquêmico, decorre de eventos hormonais, hemodinâmicos, tubulares, celulares e moleculares que levam à diminuição do ritmo de filtração glomerular. O mecanismo fisiopatológico ainda não é totalmente compreendido, porém, estão envolvidos fatores hormonais que interferem com o tônus das arteríolas aferente e eferente, alterando a hemodinâmica glomerular (angiotensina II, vasopressina, prostaglandinas), diminuição do coeficiente de ultrafiltração (contração da célula mesangial), agregação eritrocitária na microvasculatura (medula renal) e a lesão endotelial com alteração na produção de substâncias vasodilatadoras (óxido nítrico) e vasoconstritoras (endotelina) (31, 32, 34, 46, 61, 63).

Na insuficiência renal aguda, dados histológicos, utilizando microscopia eletrônica, mostram edema mitocondrial, formação de vesículas no retículo endoplasmático e redistribuição da rede terminal de actina. Paralelamente às alterações do citoesqueleto, ocorre a desintegração da borda em escova das células epiteliais tubulares proximais, associada à perda da orientação de proteínas da membrana celular, ocasionando prejuízo nas ligações que ancoram a célula epitelial, a matriz extracelular (integrinas) e dissociação dos complexos de ligação célula a célula que separam os domínios das membranas basolateral e apical, permitindo fluidez de lipídios e proteínas, assim como a perda das junções de oclusão (“tight junctions”, TJ) com redistribuição da actina de localização cortical para a perinuclear, a redistribuição de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-ase para a membrana apical,

devido à dissociação do complexo “citoesqueleto+Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP-ase” e à destruição das interações entre a actina e outras proteínas associadas, levando à perda da ligação da actina à membrana plasmática (63-66).

Pesquisas demonstraram que em microvilosidades apicais, no período pós-isquemia (15min), a marcação de F-actina está diminuída, com aumento da marcação de G-actina e realocação do fator despolimerizante de actina (ADF), proteína associada à actina (67).

Também foi demonstrado que a tropomiosina é importante na manutenção da integridade dos filamentos de actina presentes nas microvilosidades apicais de TCP de ratos e que a isquemia rapidamente altera esta interação, o que poderia levar à falência renal (68).

A partir do momento que os contatos célula-célula e célula-matriz extracelular são perdidos, ocorre o destacamento destas células, com quebra da integridade do epitélio tubular, levando à obstrução tubular, aumento da pressão intratubular e retrodifusão do filtrado glomerular e, conseqüentemente, diminuição da função renal. A extensão dos danos isquêmicos pode ser reversível ou não, dependendo do tempo e dos vários procedimentos adotados para a melhor conservação da função renal (50, 52, 58, 60, 61, 65, 66, 69).

Entretanto, o tecido renal tem grande capacidade de regeneração e grande parte dos pacientes com quadro de necrose tubular aguda recuperam parcial ou totalmente a função renal, dependendo do quadro clínico (choque, sepsis, rejeição) (69, 70). Porém, torna-se necessário que as células perdidas em razão destes danos sejam repostas e que o túbulo adquira novamente a sua morfologia e sua capacidade funcional. Primeiramente, ocorre um processo de desdiferenciação, quando as células marginais às regiões do túbulo desnudo assumem aspecto epitelióide, migram através das áreas despitelizadas e, posteriormente, pela proliferação celular (mitose) reepitelizam completamente o túbulo renal (69, 71). Este processo de reparação depende, em parte, do envolvimento dos fatores de crescimento, que por ação autócrina, parácrina e endócrina, são capazes de estimular a migração celular (atividade motogênica), de regular a passagem do estado quiescente para a fase ativa de síntese de DNA e proliferação celular (ação mitogênica) além de promover a tubulogênese (atividade morfogênica) (71).

A grande maioria destes fatores de crescimento possui receptores específicos com atividade intrínseca de tirosino-quinase, sendo que a ativação destes receptores leva à autofosforilação dos resíduos de tirosina, desencadeando a expressão de fatores transcricionais que regulam a expressão de genes, síntese de DNA, produção de novas proteínas e o ciclo de divisão celular (71).

A recuperação da função renal, após a reperfusão, depende da restauração da hemodinâmica glomerular e da proliferação e diferenciação celular, o que é geralmente promovido pela AII. Entretanto, mesmo havendo recuperação, poderá haver perda da função global em decorrência do sacrifício de uma população de néfrons, processo dependente das condições clínicas, e que poderia levar a um envelhecimento renal precoce (69, 71, 72).

#### **1.6- Sistema-renina-angiotensina-aldosterona**

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um importante regulador do balanço de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}$  e da homeostase da pressão sanguínea no homem. Tradicionalmente conhecido como um sistema endócrino, o SRAA atua principalmente através da angiotensina II (AII) (72, 73).

O angiotensinogênio, glicoproteína secretada principalmente pelo fígado, é clivado pela renina, glicoproteína-aspartil protease, para liberar o decapeptídeo angiotensina I (AI). A renina, produzida inicialmente como pré-pró-renina, transforma-se rapidamente em pró-renina, sendo armazenada nos grânulos das células do aparelho justaglomerular, onde é convertida em renina ativa. A produção intra-renal de renina determina a geração de AII na circulação sistêmica e também a produção local (74-76).

A produção e liberação da renina pelas células justaglomerulares do rim se dá por estímulos sistêmicos e intra-renais:

## **Sistêmicos**

→Estados hipotensivos ou hipovolêmicos.

## **Intra-renais**

→Redução na pressão de perfusão arterial renal detectada por pressoreceptores presentes na arteríola aferente (terminações nervosas que respondem à deformação ou estiramento das paredes dos vasos onde estão localizados; são mediadores primários do sistema nervoso autônomo no controle da pressão arterial e da frequência cardíaca);

→Redução na carga distal de  $\text{Na}^+$  detectado pela mácula densa;

→Aumento da atividade do nervo simpático renal, através de receptores  $\beta$ -adrenérgicos em decorrência da redução da pressão arterial;

→Em menor intensidade, a liberação de renina pode ser aumentada por fatores como a redução de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células justaglomerulares e por prostaglandinas. Endotelina e peptídeo natriurético atrial (ANP) podem reduzir a liberação de renina (74, 77, 78).

A angiotensina I é clivada pelas enzimas conversoras de angiotensina (ECA) (metaloproteases produzidas pelas células endoteliais principalmente do pulmão), a partir da exclusão de dois aminoácidos da porção carboxi-terminal, liberando o octapeptídeo angiotensina II (AII), um potente constritor da musculatura lisa vascular que promove a secreção da aldosterona a partir das células glomerulares adrenais, além de desencadear alterações tróficas no coração e nos vasos sanguíneos (79).

A vasoconstrição, clássico efeito sistêmico da AII, é importante na manutenção da pressão arterial, particularmente nos estados de hipovolemia. Assim, nas situações de contração do volume extracelular, a AII:

- Mantém, em curto prazo, a pressão sanguínea através da vasoconstrição;
- Corrige o volume extracelular, valendo-se de sua ação antinatriurética, seja por atuação em centros cerebrais, ou diretamente, no túbulo proximal, ou indiretamente, através da aldosterona. Nas células da zona glomerulosa da adrenal, a ativação dos receptores de AII promove elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e da atividade da proteína-quinase C (PKC), responsáveis pela produção e secreção de aldosterona. Após sua secreção, a aldosterona atinge o rim, via circulação, atuando principalmente sobre as células do ducto coletor cortical, estimulando a reabsorção de  $\text{Na}^+$  e a secreção de  $\text{K}^+$ , o que traz o volume extracelular e a pressão arterial de volta aos níveis normais (51, 80-84).

As vias alternativas para a clivagem de AI para AII são:

- Através de uma catepsina G, ou de quimases (serina-protease, específica para formação de AII), ou por enzimas geradoras de angiotensina sensível à quimostatina (CAGE) (82);
- Através da ação da ECA localizada na membrana apical de arteríolas renais, arteríolas glomerulares e capilares peritubulares;
- A partir da síntese de AI *in situ*, na parede dos vasos intra-renais.

A AII também poderá ser gerada diretamente do angiotensinogênio por enzimas não reninas, incluindo o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), a catepsina G, a elastase, a quimostatina ou a tonina. Todos os componentes funcionais do SRA foram identificados no rim, e as células do TCP sintetizam e secretam angiotensinogênio, renina, e ECA, possuindo, portanto, a estrutura completa para a síntese local de AII (81-84).

O SRA também é visto como um importante sistema parácrino que regula a hemodinâmica renal e a função do transporte tubular. Alguns autores sugerem que o SRA intra-renal possa ser constituído por dois sistemas distintos:

- SRA túbulo-intersticial, incluindo os túbulos proximais e o interstício;
- SRA vascular, incluindo os vasos renais, as arteríolas, e o glomérulo.

Diversos estudos têm mostrado evidências de que o SRA no rim é regulado seletivamente, sendo, muitas vezes, dissociado dos níveis de AII e de renina da circulação. Experimentos de micropunção *in vivo* e medidas da concentração de AII no conteúdo de TCP não perfundidos demonstraram que, apesar de AII se encontrar em concentrações bem mais elevadas no fluido tubular que na circulação, essa AII não é proveniente do filtrado glomerular (80, 81, 83-85).

A concentração de Angiotensina II no fluido intersticial renal é mais alta que as concentrações venosas ou arteriais renais, o que justifica a possibilidade de formação local de AII. No córtex, a AII está localizada no fluido tubular, intersticial e dentro das células, sendo que o fluido intersticial é que contribui para o alto nível de AII cortical (85).

Dessa forma, o SRA além de ser um sistema hormonal circulatório, é também encontrado em diversos órgãos e tecidos capazes de produzir AII, independentemente, podendo atuar de maneira endócrina, parácrina e autócrina para regular as diversas funções intra-orgânicas. O angiotensinogênio está presente nas células mesangiais e tubulares, a renina em células justaglomerulares, a ECA e quimases no endotélio vascular. A ECA também se encontra em grande quantidade na bordadura em escova da membrana das células tubulares podendo gerar AII intraluminal (86).

A ação intra-renal de AII é desencadeada a partir do peptídeo originado tanto da circulação sistêmica como da produção local. No rim, além da vasoconstrição das artérias intra-renais, a AII possui importantes efeitos sobre:

- Contração da célula mesangial;
- Absorção tubular de sódio;
- Proliferação, reparo celular e expansão de matriz extracelular;
- Síntese de hormônios e substâncias vasoativas (ex: prostaglandinas e NO).

As ações tubulares são caracterizadas por alterações no ritmo de filtração glomerular (RFG), reajustando, proporcionalmente, a taxa de reabsorção de fluido tubular proximal, um fenômeno chamado de balanço túbulo-glomerular (87).

Atualmente, a AII é considerada uma citocina multifuncional com propriedades de fator de crescimento, modulando proliferação e crescimento de células musculares lisas, cardiovasculares e renais em processos de desenvolvimento e crescimento e também em estados patológicos que levam à fibrose (88, 89).

A AII é também citocina pró-fibrinogênica e pró-inflamatória, produzindo aumento da síntese de matriz extracelular, ativando a fibronectina e o colágeno, componentes de reorganização da matriz extracelular, o que provavelmente a torna um mediador de processos inflamatórios, contribuindo na progressão da doença renal (88, 90-92).

A AII modula a resposta imunológica, como a quimiotaxia, a proliferação e a diferenciação de monócitos em macrófagos (88), a partir de vários efeitos como indução à adesão de leucócitos a células endoteliais, modulação da expressão de moléculas de adesão (e-selectina) implicadas no contato inicial entre leucócitos e endotélio, que desempenham papel importante no processo de rolamento de leucócitos e na inflamação.

Existem publicações demonstrando que o bloqueio da ação da AII previne a inflamação, a expressão da proteína Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), a infiltração de monócitos na parede arterial e diminui a resposta inflamatória renal com queda da hipertensão arterial (93).

Diversos estudos têm mostrado eventos celulares mediados pela AII, sugerindo um papel biológico amplo, do intracelular ao tecido ou ao sistema. Apesar de AII ser responsável pela grande maioria das respostas normalmente atribuídas ao SRA, outras angiotensinas produzidas têm ações específicas, como as angiotensinas III e IV e a angiotensina-(1-7). Estas angiotensinas também são produzidas a partir do angiotensinogênio, por ação da renina (94).

## 1.7- Receptores AT1, proteína-G e vias de sinalização

Estímulos químicos como hormônios ou medicamentos interagem com proteínas receptoras situadas na membrana celular. Estas proteínas têm a função específica de reconhecer sinais ou mensagens que chegam às células. Após a sensibilização destes receptores, várias outras proteínas intracelulares efetoras são ativadas, gerando pequenas moléculas sinalizadoras, conhecidas como mensageiros secundários. Dessa forma, a AII desempenha seus efeitos por ação direta através dos seus receptores, AT1 e AT2, e indiretamente por liberação de fatores de crescimento, citocinas, e outros agentes vasoativos, ou ainda por ligação cruzada com cascata de sinalizações celulares (95, 96).

São conhecidos como receptores com sete domínios transmembrana, que apresentam segmentos  $\alpha$ -helicoidais hidrofóbicos que atravessam a membrana plasmática sete vezes. Possuem homologia de 32-34%, mas os mecanismos de sinalização, a cinética de internalização e a distribuição tecidual de AT1 e AT2 são bastante diferentes. Apesar de AII se ligar aos dois subtipos de receptores, AT1 e AT2, a maioria das suas funções conhecidas e a quase totalidade dos seus efeitos, sistêmicos e locais, resultam da sua interação com receptores AT1 (97-99).

Não obstante vários estudos demonstrem que AT1 medeia os efeitos inibitórios e os estimulatórios de AII, alguns pesquisadores apresentaram evidências de que AT2 medeia os efeitos inibitórios como vasodilatação, apoptose, antiproliferação e anticrescimento. No rim, os efeitos *in vivo* mediados pelos receptores AT2 parecem envolver o NO, via GMPc e esses receptores, AT2 expressos no rim de adulto, são ligados a discreto aumento na excreção urinária de  $\text{Na}^+$ , discreta diminuição da pressão sanguínea, em contraste aos efeitos estimulatórios dos receptores AT1, sugerindo que a ativação do receptor AT1 no túbulo renal sirva como um possível mecanismo protetor, garantindo o aumento de reabsorção de  $\text{Na}^+$  e da pressão sanguínea, quando o volume fluido extracelular estiver ameaçado. Assim, em relação às respostas à angiotensina II, devemos lembrar que a mesma é bifásica na maior parte da rede vascular, pois ocorre uma discreta vasodilatação desencadeada pela ativação dos receptores AT2 presentes nas células endoteliais, seguida de potente vasoconstrição pela ativação dos receptores AT1 presentes nas células vasculares lisas (100-102).

Os receptores AT1 estão vastamente distribuídos em órgãos e sistemas, incluindo o cardiovascular, renal, endócrino, e sistema nervoso humano. No rim, os receptores AT1 foram evidenciados por anticorpos mono e policlonal, em arteríolas aferentes e eferentes, e células mesangiais onde se encontram em maior densidade. Também estão presentes na bordadura em escova e na membrana basolateral do TCP, no túbulo distal, no ducto coletor, nos podócitos glomerulares e na mácula densa (97, 103-105).

Os receptores AT1 também são denominados GPCR (G-protein coupled receptors) por serem acoplados a uma proteína G-heterotrimérica (proteínas que possuem três subunidades de guanina denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (106-108).

A ligação da AII (ligante) ao receptor AT1 resulta em ativação da proteína-G através da troca de GTP por GDP, promovendo a dissociação da subunidade  $\alpha$  do complexo “ $\beta\gamma$ ”, o que induzirá cascatas de ações dependentes dos diferentes tipos das subunidades de proteína-G ativada (109).

Após a interação com o receptor AT1, a AII exerce efeitos diversos e dentre as funções sistêmicas, destacam-se:

→Manutenção e modulação da pressão arterial;

→Controle do volume extracelular e regulação da circulação sistêmica e renal. O rim tem papel fundamental como mediador desses efeitos, uma vez que AII influencia tanto a filtração glomerular como a reabsorção tubular de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .

A interação do receptor AT1 com o citoesqueleto de actina para a formação de um complexo multiprotéico e a interação do complexo AII+receptor com ativação da proteína-G, desencadeando a série de eventos intracelulares que resultam nas mais variadas funções do peptídeo, é dependente de proteínas que facilitam a transdução de sinais, como as proteínas adaptadoras, proteínas PDZ (receberam este nome devido às primeiras proteínas adaptadoras que foram identificadas: PSD-95, Dlg1, ZO-1). Essas proteínas PDZ

formam um ancoradouro na membrana apical para inserção de outras proteínas, onde atuam com um ponto de ancoragem, “amarrando-as” ao citoesqueleto de actina. Exemplos de proteínas PDZ são as proteínas conhecidas como fatores regulatórios de trocadores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  (NHERF's), que atuam, facilitando o desempenho da proteína trocadora de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$ , (NHE3) também modulada pela AII, através do receptor AT1 (110).

A ligação de AII ao receptor AT1 estimula a internalização e o processamento do complexo AII+receptor e existem evidências de que a internalização do complexo AII+receptor AT1 não acontece apenas pelo propósito de levar a AII para os lisossomos para a degradação e para a reciclagem do receptor, mas este processo parece ser vital para as ações da AII no TCP (111). Por exemplo, foi demonstrado que a ligação de AII e a endocitose do complexo AII+receptor AT1 estão associadas para que haja a ativação das vias de transdução de sinal de transporte de  $\text{Na}^+$ . A endocitose de AT1 aparece acoplada com aumento de fosfolipase C (PLC), diminuição de Adenilil Ciclase (AC) e indução ao fluxo de  $\text{Na}^+$ . Também foi demonstrado que endocitose de AII pela internalização de receptores AT1 da membrana apical está associada com ativação de fosfolipase A2 (PLA2) e liberação de ácido araquidônico (AA), necessários para o fluxo de  $\text{Na}^+$  e reciclagem de AT1.

A internalização de AT1 ocorre também pela endocitose via vesículas revestidas de proteínas clatrina (112).

Embora os receptores AT1 sejam expressos na membrana apical e na basolateral de TCP, há diferenças nas taxas de endocitose e reciclagem destes receptores e também na seqüência dos aminoácidos nos domínios terminais envolvidos na atuação destes receptores. A cadeia de aminoácidos carboxi-terminal do receptor AT1 parece ser importante na regulação do transporte transcelular de  $\text{Na}^+$  (113-117).

Em epitélio polarizado são expressas diferentes estruturas endocíticas que sinalizam moléculas, sendo que a ausência destes elementos pode afetar a internalização de AT1. Esse pode ser um fator determinante para as diferenças entre receptores da membrana apical e da basolateral, uma vez que o ambiente polarizado parece ser significativo para que proteínas-G envolvidas no processo endocítico se distribuam em domínios celulares distintos do citoesqueleto.

Pesquisadores têm mostrado que a ligação de AII ao receptor AT1 leva o receptor para a sua conformação ativa, causando um rearranjo de ligações intramoleculares que estabilizam a sua estrutura e que a indução à internalização dos receptores pela AII é um mecanismo importante para o controle da função do receptor pelos seguintes motivos:

- Regula o número de receptores viáveis na superfície celular;
- Facilita a ressensibilização dos receptores que foram dessensibilizados pela fosforilação mediada pelas quinases. No entanto, estudos mostram que, a internalização do receptor, estimulada pela AII, pode ocorrer na ausência de ativação da proteína-G e que receptores ativados internalizam, mesmo na ausência de fosforilação, e que talvez na ausência de fosforilação eles possuam uma conformação com alta afinidade pela  $\beta$ -arrestina, proteína multifuncional envolvida em processos de endocitose (118-120).

A angiotensina II também pode ser internalizada pela megalina, proteína receptora na membrana apical da célula tubular proximal, envolvida na reabsorção e metabolismo de várias proteínas filtradas pelo glomérulo. A megalina, assim como o receptor AT1, pode regular os níveis de angiotensina II no túbulo proximal, mediando a captação da AII, uma vez que esta proteína é responsável pela retirada de várias proteínas do fluido tubular (121).

## **1.8- Bloqueadores de AII**

A partir do nonapeptídeo teprotida, isolado do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (122), foram desenvolvidos os inibidores da enzima conversora de angiotensina II (IECA) para o tratamento da hipertensão arterial e da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), através do bloqueio na formação de AII. Esse bloqueio inibe a produção de aldosterona, levando à queda da absorção de  $\text{Na}^+$ , à diminuição da resistência periférica e também do volume plasmático efetivo. Contudo, os IECA diminuem também a degradação da bradicinina, aumentando a liberação de NO, PGI<sub>2</sub> e substância P (neurotransmissor), além de que, a AII continuará a ser produzida por outras vias não derivadas da clássica ECA.

Outra classe de drogas para bloqueio de AII tem como principal representante o losartan, de estrutura química (2)-n-butyl-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-(1H-tetrazole-5-yl) bifenil-4-yl) metil] imidazole, que atua por antagonismo específico aos receptores AT1 (123, 124).

O losartan é uma droga não peptídica, sintética, potente, ativa por via oral. Em experimentos *in vitro* e *in vivo*, o losartan e seu metabólito farmacologicamente ativo, o ácido carboxílico (E-3174), bloquearam as ações fisiologicamente relevantes da AII. A ligação ao receptor AT1 é saturável, reversível e independe da via responsável pela síntese da AII. O seu antagonismo pode ser feito por interferência na ativação do receptor pela ocupação de sítios intermembranas que seriam ocupados pela AII (antagonismo competitivo) ou pode ainda induzir mudanças na conformação do receptor, evitando a ligação de AII (antagonismo não competitivo) (125, 126).

Em bioensaios de ligação e farmacológicos, verificou-se bloqueio seletivo, específico com alta afinidade para receptores AT1 e nenhuma afinidade por AT2, diferente dos IECA que reduzem níveis de AII, com conseqüente estimulação de AT1 e AT2 (127).

Durante o tratamento, promove uma elevação dos níveis circulantes de AII, que, teoricamente, poderia ligar-se aos receptores AT2, entretanto a prática clínica não tem demonstrado nenhuma desvantagem nessa possível ligação de AII ao receptor AT2, uma vez que existem experimentos demonstrando que essa ligação promove diminuição da pressão arterial, apoptose e também efeitos antiproliferativos (126, 127).

Esse medicamento é importante no tratamento da hipertensão arterial, da insuficiência cardíaca e, provavelmente, retarda a evolução da doença renal, fazendo parte de uma família de bloqueadores de AII (BRAs), que produzem efeitos tais como:

- Dilatam artérias e veias e desse modo reduzem a pressão arterial;
- Regulam a atividade adrenérgica simpática, bloqueando os efeitos da AII na liberação da norepinefrina;
- Promovem a excreção renal do sódio e água (efeitos natriurético e diurético) através de bloqueio dos efeitos da AII no rim e bloqueio da estimulação da secreção de aldosterona;

→Inibem o remodelamento cardíaco e vascular associado com hipertensão crônica, falência cardíaca e infarto miocárdico.

De acordo com trabalhos publicados, o mais recente desta classe de medicamentos, a olmesartana medoxomila (Benicar®) tem ligações químicas mais estáveis com o receptor e aumenta a expressão da ECA2, enzima que forma o peptídeo vasodilatador, angiotensina-(1-7) a partir de AI e de AII, sugerindo que esse mecanismo também contribua para o efeito anti-hipertensivo da olmesartana (128, 129).

Um novo produto para tratamento da hipertensão, o alisquireno (Rasilez®), é um inibidor direto da renina, proporcionando benefícios adicionais às terapias disponíveis no mercado, como controle da pressão arterial sustentado por 24 horas e potencial para proteger os órgãos-alvo da hipertensão (cérebro, vasos, coração e rins) (130).

### **1.9- Angiotensina II e proteínas de transporte no rim**

A angiotensina II é conhecida por regular o transporte proximal de modo bifásico: estimulação por concentrações picomolares e inibição por concentrações nanomolares (131, 132). Várias publicações demonstram que AT1 medeia os efeitos estimulatórios de angiotensina II (133-135).

Embora vários hormônios sejam mostrados como capazes de interferir no processo de transporte no túbulo contornado proximal, o efeito bifásico de AII sobre a absorção de H<sub>2</sub>O, Na<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> está confirmado e sucessivos estudos têm demonstrado que a atividade do co-transportador basolateral de Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NBC-1), trocador apical de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> subtipo3 (NHE3) e Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase (NKA) é regulada pelo efeito bifásico de AII (136, 137).

Este processo é considerado importante na regulação do balanço de H<sub>2</sub>O e Na<sup>+</sup> corporal. Dessa forma, a AII regula a reabsorção transepitelial de Na<sup>+</sup> via NHE3 e o NBC-1, enquanto na basolateral o NHE1 faz a regulação de pH (136-138).

A AII tem um papel importante na acidificação tubular proximal renal através da co-estimulação do co-transportador basolateral de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC-1) e das atividades do trocador apical de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE3). Portanto, para que haja homeostase ácido-base estes transportadores trabalham de modo coordenado, utilizando forças eletroquímicas fornecidas pela enzima basolateral NKA (136).

A AII aumenta a absorção de  $\text{Na}^+$ . Este efeito é mediado principalmente por um aumento da atividade de NHE3, essencial à secreção tubular de íons  $\text{H}^+$  e responsável por substancial absorção proximal de  $\text{Na}^+$ . O TCP reabsorve cerca de 80% do  $\text{HCO}_3^-$  filtrado e a maioria desse  $\text{HCO}_3^-$  é reabsorvida via estrutura protéica, como o trocador NHE3. A saída através da membrana basolateral é via NBC-1 (136, 137).

A concentração picomolar de AII estimula a atividade de PKC e o balanço de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em células de TCP. No entanto, medidas de níveis de AII no fluido do TCP detectaram níveis nanomolares, concentração não compatível com absorção. A explicação seria que o transporte de  $\text{Na}^+$  não é inibido pela AMPc endógena, e que PKC e  $\text{Ca}^{2+}$  podem modular o efeito da concentração nanomolar de AII, resultando em inibição ou estimulação da absorção, dependendo dos teores de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que alteraria a permeabilidade da membrana celular a íons (139).

A estimulação pela AII em concentrações fisiológicas pode ser mediada pela diminuição dos níveis de AMPc na célula e/ou pela ativação de PKC. Por outro lado, supõe-se que as inibições ocasionadas pelas altas concentrações de AII envolvam a PLA2 e subsequente liberação de ácido araquidônico (139, 140).

Existem estudos sugerindo a existência de PLA2  $\text{Ca}^{2+}$ -independente, e que esta enzima seria responsável pela fusão das vesículas endocíticas, e que a endocitose de AII mediada pela internalização de receptores AT1 da membrana apical está associada com ativação de PLA2, necessária para o fluxo de  $\text{Na}^+$  e para a reciclagem de AT1 (141).

O bloqueio de receptores AT1 pelos receptores não peptídicos (losartan) diminui a absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , o que indica que a AII endógena regula a absorção (água e solutos) no rim e está de acordo com níveis picomolares existentes no plasma, condizentes com estimulação (142).

A atividade dos transportadores também pode ser regulada por condições fisiológicas, como:

- Acidose ou estimulação de PKC, fatores que estimulam uniformemente os dois transportadores, NBC-1 e NHE3;
- Alcalose metabólica diminuindo a atividade de NBC-1;
- Fosforilação por PKA e PKII inibindo NHE3 e NBC-1;
- A inibição da atividade de NHE3 pela PKA requer a participação do co-fator regulatório de trocadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHERF's) (110);
- A regulação de  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  pela PKA, via NHERF's, reforça a existência de um mecanismo molecular. Vários estudos propõem um modelo para regulação de NHE3 pela PKA, envolvendo um sinal-complexo de proteínas, incluindo ezrina e NHERF's (143, 144).

Recentes estudos demonstraram que nervos simpáticos renais modulam a produção e o efeito luminal de AII no transporte no TCP, e que o efeito estimulatório no transporte proximal de  $\text{Na}^+$  é realçado por nervos renais associados à internalização dos receptores AT1 de AII, apicais e basolaterais (145, 146).

Fatores físicos como a pressão arterial elevada na insuficiência cardíaca ou a distensão adicional das células das aurículas cardíacas provocam a liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP), também responsável pela regulação da atividade de transporte no TCP. O ANP aumenta a taxa de filtração glomerular e inibe a secreção de aldosterona, renina e vasopressina, provocando aumento na excreção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (77-79, 140).

Finalmente, baseados em dados de Fisiologia Renal e Biologia Molecular disponíveis na literatura e considerando a experiência original do Laboratório na área da Conservação Renal, pretendemos:

- Mostrar, através da microperfusão *in vitro*, o comportamento funcional do túbulo isolado em protocolos experimentais de conservação;
- Monitorar a morfologia do citoesqueleto de actina e a distribuição de receptores AT1 de angiotensina II, utilizando a microscopia confocal a laser.

## **2- OBJETIVOS**

---

## **2.1- Objetivo do artigo 1**

Avaliar, *in vitro*, a ação da angiotensina II (AII) e do losartan sobre o túbulo contornado proximal de coelho (TCP), através da absorção de fluidos (Jv), da avaliação da presença de receptores AT1 de angiotensina II e da morfologia do citoesqueleto de actina.

## **2.2- Objetivo do artigo 2**

Avaliar, *in vitro*, as alterações fisiológicas (absorção de fluidos) e morfológicas (citoesqueleto de actina) em túbulo contornado proximal de coelho (TCP), após a conservação a frio 1 e 24h, com as soluções de Euro - Collins e Belzer.

## **2.3- Objetivo do artigo 3**

Avaliar, *in vitro*, as alterações fisiológicas (absorção de fluidos) e morfológicas (distribuição e frequência dos receptores AT1 de angiotensina II e citoesqueleto de actina) em túbulo contornado proximal conservado 1 e 24h com as soluções de Euro - Collins e Belzer, submetido a tratamento basolateral com angiotensina II e losartan.

## **3- CAPÍTULOS**

---

### **3.1- Artigo 1: (publicado)**

Idioma exigido: inglês

Journal of Nephrology

*EXPERIMENTAL ORIGINAL INVESTIGATION*

*www.sin-italy.org/jnonline/vol20n1/ 1*

#### **AT1 receptors and the actin cytoskeleton during angiotensin II treatment**

Ivone M. V. Bertels<sup>1</sup>, José A. R. Gontijo<sup>2</sup> and José F. Figueiredo<sup>1 3</sup>

### **3.2- Artigo 2: (publicado)**

Idioma exigido: inglês

Transplantation Proceedings

EXPERIMENTAL Kidney

#### **Actin Cytoskeletal and Functional Studies of the Proximal Convoluted Tubules After Preservation**

*Transplantation Proceedings*, 40, 3311–3315 (2008)

J.F. Figueiredo, I.M.V. Bertels, and J.A.R. Gontijo

### **3.3- Artigo 3: (submetido)**

Idioma exigido: inglês

Cell Transplantation

#### **Isolated preserved proximal tubules during angiotensin II and losartan treatment**

Ivone M. V. Bertels<sup>1</sup>, José A. R. Gontijo<sup>2</sup> and José F. Figueiredo<sup>1 3</sup>

# AT1 receptors and the actin cytoskeleton during angiotensin II treatment

Ivone M.V. Bertels<sup>1</sup>, José A.R. Gontijo<sup>2</sup>, José F. Figueiredo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Organ Preservation Laboratories, Medical Sciences School, State University of Campinas–Unicamp, Campinas - Brazil

<sup>2</sup> Department of Internal Medicine, Medical Sciences School, State University of Campinas–Unicamp, Campinas - Brazil

<sup>3</sup> Department of Experimental Surgery, Medical Sciences School, State University of Campinas–Unicamp, Campinas - Brazil

**ABSTRACT:** *Background:* The response of proximal convoluted tubules (PCTs) to angiotensin II is mediated by specific type 1 receptors found on both apical and basolateral surface membrane cells. After ligand association with type 1 receptors, different signaling pathways are triggered and determine changes in fluid absorption (J<sub>v</sub>). The presence of AT1 and actin cytoskeleton, which are directly related to J<sub>v</sub>, can undergo changes in distribution based on the actions of AngII and losartan.

*Methods:* Using a microperfusion technique and immunohistochemistry analysis, we investigated the basolateral action in PCTs, of AngII and/or losartan on J<sub>v</sub> in rabbits, with regard to AT1 and actin cytoskeleton.

*Results:* AngII increased J<sub>v</sub>, while in contrast, losartan and combined AngII + losartan led to its decrease. AngII did not change fluorescence intensity of AT1 receptors on tubular membranes, while losartan and AngII + losartan demonstrated a slight increase after treatment. On the other hand, AngII increased the fluorescence intensity of actin cytoskeleton, while losartan induced a decrease. AngII + losartan led actin cytoskeleton having a higher fluorescence intensity than in the control group.

*Conclusions:* In the present study, we demonstrated that treatment of the basolateral side of PCT cells with AngII and losartan could lead to changes in absorptive tubular function. Important alterations were detected in AT1 receptor fluorescence on the luminal and basolateral membranes, and changes in F-actin cytoskeleton were verified by fluorescence following these protocols.

**Key words:** Angiotensin II, Fluid absorption, Proximal convoluted tubules, Morphological aspects

## INTRODUCTION

Evidence suggests that actin-associated proteins and cell surface membranes of proximal convoluted tubules (PCTs) interact to establish and maintain cellular structures that facilitate specific functions of these cells. Actin cytoskeleton organization plays a key role in controlling sodium/hydrogen exchanger type 3 isoform (NHE3) activities under normal conditions (1-3). Thus, NHE3 coupled to basolateral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, through the stimulatory effect of systemic angiotensin II (AngII) concentration, is the major regulated sodium transporter in PCT, with reabsorption of up to one third of the filtered load of sodium in renal PCT, and all NaCl reabsorbed via transcellular transport (4). This nephron segment

contains a complete renin-angiotensin system (RAS), secreting high concentrations (approximately 100-1,000 fold higher than that in the systemic circulation) of AngII into their lumen. The AngII mechanism is modulated through angiotensin type 1 (AT1) receptors, on the apical and basolateral surfaces of PCT cells, triggering different signaling pathways, in a dose-dependent manner (5, 6). Micropuncture and in vitro experiments have demonstrated that physiological concentrations of AngII (10<sup>-12</sup> to 10<sup>-10</sup> mol/L) can stimulate Na<sup>+</sup> absorption, while higher doses (10<sup>-7</sup> mol/L) can inhibit Na<sup>+</sup> absorption. When AngII is applied at low concentrations, signaling pathways are initiated causing the inhibition of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and activation of protein kinase C (PKC), while AngII at high

dosages has been suggested to effect transport through the activation of a calcium-dependent phospholipase A2 (PLA2) with consequent activation of membrane-bound arachidonic acid (AA) release, followed by metabolism via a cytochrome P-450-dependent epoxygenase pathway (6, 7).

Advances in the comprehension of the structure and function of AT1 receptors have been made possible by following the development of nonpeptide AngII receptor antagonists, such as losartan. This class of compounds is used in the treatment of primary hypertension and diabetes, and when systemically administered, acts through basolateral AT1 receptors, blocking proximal tubule transport (8).

The aim of this study was to evaluate the changes in the distribution and of the fluorescence pixel intensity of AT1 receptors and of actin cytoskeleton compared with the control group, and any correlation with volume absorption in PCT during treatment with AngII, with losartan and with AngII plus losartan.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Experimental design*

The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. The experiments were performed on fresh isolated proximal convoluted tubules (PCTs), on the P<sub>2</sub> segment from kidneys of male New Zealand white rabbits weighing from 1.5 to 2 kg. The PCTs were submitted to the following: In vitro microperfusion using the Burg and Orloff technique of 1968 (9), as modified in our laboratory (10). Individual tubules were dissected in cooled (4°C) Krebs Henseleit plus albumin (KHA) solution, and perfused with an ultrafiltrate of KHA solution. Perfusion and bath solutions were bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4). Osmolalities of bath and perfusate were adjusted to 290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. The first collection period began after an equilibration time of 15-20 minutes. The volumes of the perfusate and collected samples were measured in a fixed-volume collection pipette, and <sup>14</sup>C-inulin (New England Nuclear, Boston, MA, USA) concentrations in these samples were determined in a LS 5000 liquid scintillation counter (Beckman Counter). For these experiments, we used 10<sup>-12</sup> M AngII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Sigma) and 10<sup>-6</sup> M losartan (2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[(2'--(1H-tetrazole-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]imidazol, DuP753; Dupont) and administered AngII + losartan together, on the peritubular side, based on previous works (11). Fluid absorption (Jv) was calculated in accordance with the equation of Burg and Orloff in 1968 (9):  $Jv = VL/L$  (<sup>14</sup>C-

inulin L / <sup>14</sup>C-inulin 0) - 1, where VL (nl/min) is the collection rate, L (mm) the perfused length of the tubule measured with an eyepiece micrometer and (<sup>14</sup>C-inulin L / <sup>14</sup>C-inulin 0) is the concentration ratio of the volume marker in the collected and perfused solutions, respectively; the lumen-to-bath flux (leakage) was measured by the rate of appearance of <sup>14</sup>C-inulin in the continuously collected bath, accepting only values of less than 3%.

##### *AT1 receptors and actin cytoskeleton labeling*

###### *Fresh isolated nonperfused PCTs*

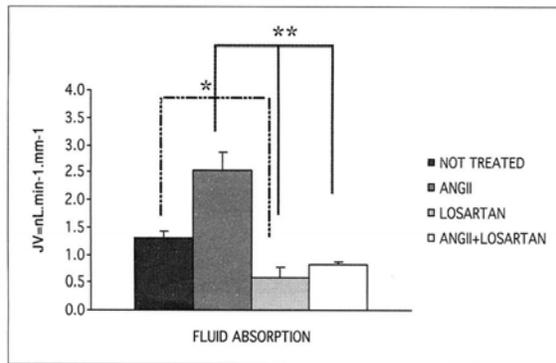
After dissection, the tubules were washed 3 times with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and incubated with the drugs, 10<sup>-12</sup> AngII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) and 10<sup>-6</sup> losartan (2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[(2'--(1H-tetrazole-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]imidazol), and AngII + losartan simultaneously, for 30 minutes at 36°C. Drug incubations were performed at room temperature in a humidified chamber.

Isolated tubules were mounted on silanized glass slides and fixed in methanol for analysis incubated at -20°C for 1 hour. The sections were rinsed 3 times with PBS (pH 7.4).

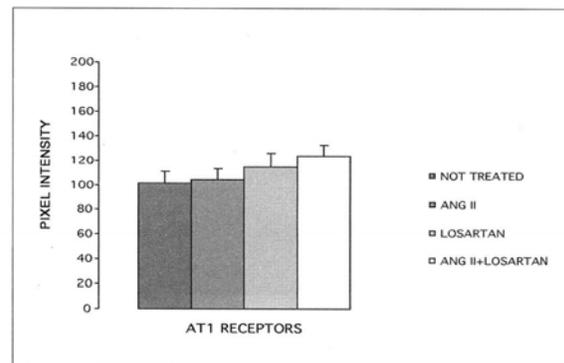
The localization of AngII AT1 receptors was examined immunohistochemically with the polyclonal primary antibodies against a peptide mapping near the amino terminus of the AngII AT1 receptor. Specificity of immunostaining was determined by Cy2-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG.

Nonspecific binding of antibodies was blocked by incubating sections with special blocking solution containing 1% normal rabbit serum, 2.5% bovine serum albumin (BSA), 3% dried milk powder diluted in 0.1 M PBS overnight at 4°C in a humidified atmosphere. After shaking off excess blocking solution, the sections were then incubated with a polyclonal rabbit anti-AT1 (N-10) antibody (Santa Cruz Biotechnology) using a 1:600 dilution overnight at 4°C. After 3 washes of 5 minutes each in 0.1 M PBS, the sections were covered for 2 hours with the secondary antibody diluted 1:400 (donkey anti-rabbit IgG conjugated to Cy3 [Jackson Immunoresearch]), followed by washing 3 times with 0.1 M PBS.

In all experiments, tubules were rinsed twice with Ca-Mg free 0.1 M PBS and were treated with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (product number P1951; Sigma-Aldrich) in 0.1 M PBS for 20 minutes at room temperature. The usual dilution of phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate was 1:200 from 200 U/mL methanol stock solution. After being rinsed in 0.1 M PBS, tubules were gently pelleted and resuspended in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).



**Fig. 1 - Effect of AngII and losartan on fluid absorption on fresh PCTs.** Analysis showed an increase in Jv of the fresh tubules treated with AngII when compared with fresh tubules treated with losartan, and AngII + losartan (\*\* $p < 0.01$ ); and a decrease in Jv of the fresh tubules treated with losartan (\* $p < 0.05$ ) when compared with control group. Data reported as means  $\pm$  SEM for at least 4 PCTs per group, compared with control group (c) (ANOVA), followed by multiple comparisons corrected with the Bonferroni adjustment; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 2 - Effect of AngII and losartan on AT1 receptors demonstrated by pixel intensity on fresh rabbit PCTs,** using polyclonal primary anti-AngII AT1 receptor antibody, followed by secondary CY2-conjugated Affinipure donkey anti-rabbit IgG. Analysis showed that the fresh tubules treated with AngII, and treated with losartan and AngII + losartan exhibited values of AT1 pixel intensity, similar to control group. However, qualitative analysis of the AT1 receptor distribution, based on the picture acquired by microscopy visualization, exhibited different behaviors when comparing one to the other and to control.

#### Visualization of AT1 receptors and F-actin by laser-scanning confocal microscopy

The tubules were observed through a Zeiss confocal microscope (LSM 510 META) equipped with an X63 oil immersion objective. The tubules were imaged longitudinally, and the total intensity of AT1 receptors and actin cytoskeleton were quantified after background subtraction by integrating pixel intensities of tubule images over the total number of optical sections using LSM 510 software.

#### Statistical analysis

All data are presented as means  $\pm$  SE. Statistical analysis was performed using ANOVA, followed by multiple comparisons corrected with the Bonferroni adjustment and Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA), for physiological and morphological data, respectively. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

#### Physiological data

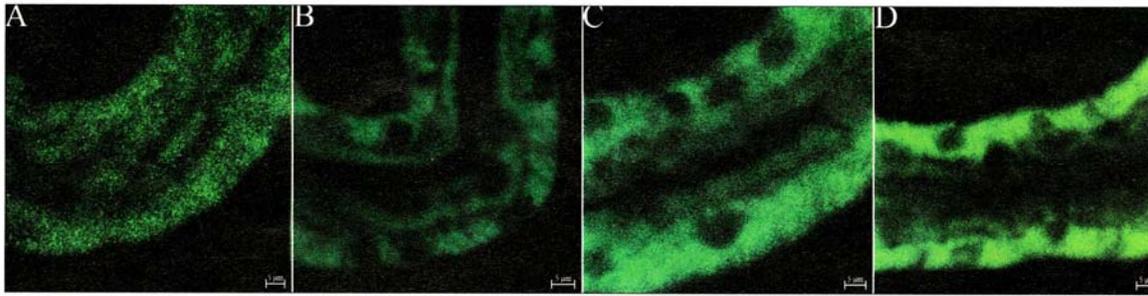
With in vitro microperfusion analysis ( $J_v = \text{nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ ) (Fig. 1), the value of fluid absorption for the control group (c) was  $J_v = 1.31 \pm 0.11$  ( $n=6$ ). After peritubular treatment with AngII, there was an increase in result values:  $J_v = 2.54 \pm 0.33$  ( $n=7$ ). In contrast, under the same conditions, PCTs treated with losartan

demonstrated a decrease in results:  $J_v = 0.57 \pm 0.21$  ( $n=4$ ). Simultaneous treatment with AngII + losartan resulted in an intermediate rate of absorption:  $J_v = 0.81 \pm 0.06$  ( $n=4$ ).

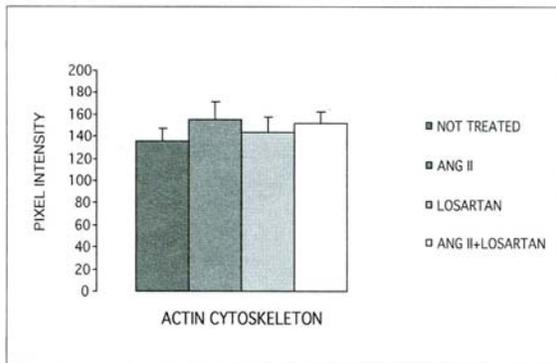
#### Morphological data

In this work, our objective was to analyze the actin cytoskeleton and AT1 receptors of the entire proximal convoluted tubule and not of each isolated tubular cell. The pixel intensity fluorescence of AT1 receptors of the control group (c) was  $100.87 \pm 11$  ( $n=5$ ) (Fig. 2). Treatment with physiological concentrations of AngII on the basolateral side led to a discrete increase in pixel intensity of these receptors, which was  $104.29 \pm 9$  ( $n=5$ ). Interestingly, treatment with losartan increased the intensity of these receptors to  $114.71 \pm 11$  ( $n=5$ ). Similarly, both AngII + losartan also demonstrated an increase in intensity, to  $123.27 \pm 9$  ( $n=5$ ). However, these differences were not statistically significant when compared with the control group. Nevertheless, in visual analysis, without measured data, we noticed that AT1 receptors were in larger concentrations on the basolateral than on the luminal side. In addition, AT1 receptors, in visual analysis showed intensive bright fluorescence when exposed to losartan, even when AngII was present (Fig. 3).

Actin cytoskeletal pixel intensity measured in the control group was  $135.10 \pm 12$  ( $n=5$ ) (Fig. 4). Treatment with AngII led to an increase in actin cytoskeletal pixel intensity to  $155.08 \pm 16$  ( $n=5$ ). In this group, actin appeared accentuated in the brush border, showing more



**Fig. 3 -** Representative images of several fresh isolated nonperfused PCTs submitted to immunohistochemical analysis for AT1 receptors with polyclonal primary anti-AngII AT1 receptor antibody, followed by secondary CY2-conjugated Affinipure donkey anti-rabbit IgG. (A) control group; (B) fresh tubule treated with AngII; (C) fresh tubule treated with losartan; (D) fresh tubule treated with AngII + losartan. In the control group, AT1 receptor distribution was demonstrated on the basal and luminal membranes (A). In fresh tubules treated with AngII (B), the AT1 receptors can be observed, suggesting its maintenance. However, by qualitative analyses, in tubules treated with losartan and AngII + losartan, AT1 receptors were observed to be increased on the PCT membranes (C and D).



**Fig. 4 -** Effect of AngII and losartan on the actin cytoskeleton, demonstrated by pixel intensity in fresh rabbit PCTs, using phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate. Analysis showed that fresh tubules treated with AngII, and those treated with losartan and AngII + losartan, exhibited values of actin pixel intensity similar to those of the control group. However, qualitative analysis of the distribution of the actin cytoskeleton based on the picture acquired by microscopy visualization exhibited different behaviors when comparing one to the other and to control.

cohesion than in the control group. However, fluorescence intensity was lower in PCTs treated with losartan, for which it was  $143.15 \pm 14$  (n=5). In these tubules, the brush border was less evident than in the control group and also smaller than in tubules treated with AngII. In tubules treated with AngII + losartan, the fluorescence intensity measured increased to  $151.19 \pm 11$  (n=5). In this group, actin showed microfilaments with a marked staining concentration which were located in the brush border and comparable to those in tubules treated with AngII (Fig. 5).

## DISCUSSION

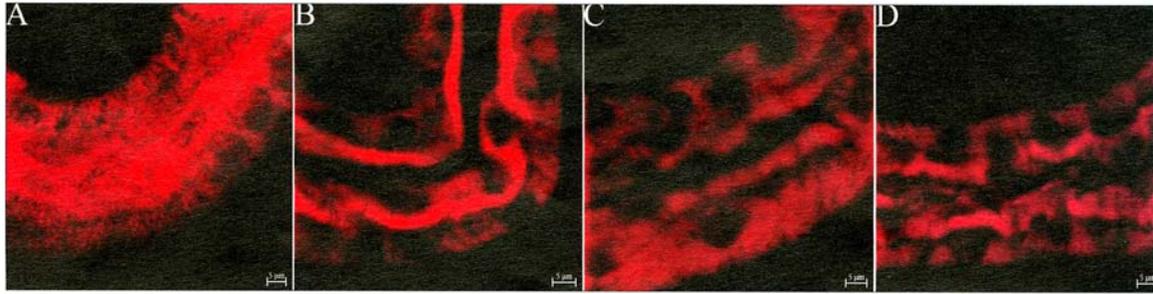
The role of the AngII in renal PCTs is already known. However, our objective was to characterize tubular fluid absorption in normal physiological conditions during treatment on the basolateral side, with AngII and its antagonist, losartan, with regard to the pixel intensity of the AT1 receptors and actin cytoskeleton.

This protocol was chosen because of the importance of the actions of AngII on renal function behavior in PCTs. After exposure to losartan, several alterations appeared in the membrane cellular structure which could involve AT1 receptors and actin cytoskeleton (Fig. 6).

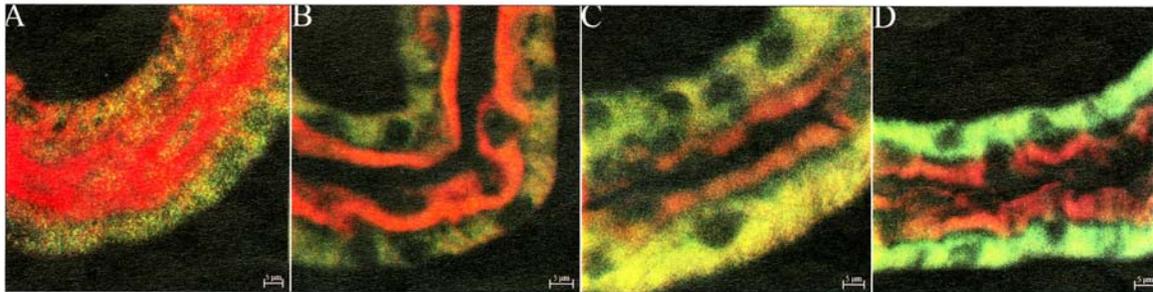
We verified that AT1 receptor pixel intensity of the nonperfused isolated PCTs underwent alterations on the basolateral membrane showing different results depending on the presence of AngII or losartan.

In control groups, Jv showed similar results to findings in the literature (10), and fluorescence intensity of AT1 receptors showed a similar distribution in luminal and basolateral membranes. Immunolabeling studies with polyclonal and monoclonal antibodies to the AT1 receptor have identified abundant AT1 receptors that are widely distributed throughout the kidney, in several tissues (12). Our results in measuring the fluorescence pixel intensity of actin cytoskeleton in tubules in the control groups demonstrated an immunolabeling concentration near the apical membrane in PCT cells, characteristic of a terminal web.

Regarding the action of AngII, data from the literature report contradictory results of fluid absorption of tubules under this condition, depending on the concentration of this drug and whether it was luminally or basolaterally administered (6, 7). We demonstrated a significant increase in fluid absorption of tubules



**Fig. 5** - Representative images of several fresh isolated nonperfused PCTs submitted to immunohistochemical analysis for F-actin cytoskeleton staining, after treatment with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate. (A) control group; (B) fresh tubule treated with AngII; (C) fresh tubule treated with losartan; (D) fresh tubule treated with AngII + losartan. In the control group, the actin cytoskeleton distribution was preferentially at the lumen of PCT cells, where it was responsible for the structure of the brush border (A). In tubules treated with AngII (B) the structure can still be observed, suggesting its maintenance. However, in tubules treated with losartan, a decrease of actin cytoskeleton in the brush border was observed (C). In fresh tubules treated with AngII + losartan (D), the structure was maintained, and there was an increase of actin similar to that in the group in (B).



**Fig. 6** - AT1 receptors and actin cytoskeleton together. Representative images of several fresh isolated nonperfused PCTs submitted to immunohistochemical analysis for AT1 receptors with polyclonal primary anti-AngII AT1 receptor antibody, followed by secondary CY2-conjugated Affinipure donkey anti-rabbit IgG, and immunohistochemical analysis for F-actin cytoskeleton staining, after treatment with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate. (A) control group; (B) fresh tubule treated with AngII; (C) fresh tubule treated with losartan; (D) fresh tubule treated with AngII + losartan.

treated with AngII. According to our results, we could hypothesize that AT1 receptors were present on the basolateral side, and that they were able to perform functions previously described for AngII in PCTs. Actually, after AngII treatment, our immunohistochemical results were comparable to the control group, with a discrete increase in pixel intensity of AT1 receptors on the basolateral and apical membranes, although this was not statistically significant. Reports in the literature have shown that chronic AngII infusion does not alter total AngII receptor densities (13). AngII binding to AT1 receptor causes a conformational change resulting in isomerization of the receptor, which takes on an active conformation and triggers the signaling cascade, which leads to receptor internalization. The recycled AT1 receptor has a decreased affinity for AngII on the plasma membrane, probably as a consequence of its uncoupling from the G protein. In the literature

searched, we found data indicating that the majority of the internalized AT1 receptors were recycled to the different domains of the plasma membrane, whereas AngII was targeted for lysosomal degradation (14). The mechanism of internalization is important for AT1 receptor signaling and functions; however, different mechanisms occur at the apical and basolateral surface of PCT cells, demonstrating the importance of membrane structure for internalization and recycling (15). In addition, when the tubules were exposed to AngII, an increase in immunolabeling of actin cytoskeleton was observed on the apical side. In our visual analysis, it was noted that actin appears with greater cohesion on the luminal than on the basolateral side.

Data from the literature, using *in vivo* microperfusion and *in vitro* techniques, show an inhibitory effect of luminal losartan with concentrations of  $10^{-8}$  M and  $10^{-6}$  M (16-18). These data corroborate our results, where

the addition of  $10^{-6}$  M losartan to PCTs to treat the basolateral membrane inhibited volume absorption. Interestingly, the density of AT1 receptors showed an increase of fresh tubules treated with losartan, in spite of decreased Jv. However, this increase in pixel intensity was not statistically significant. Losartan treatment caused a decrease in actin cytoskeleton immunolabeling on the apical side, when compared with the control and AngII groups.

Treatment with AngII + losartan led to an increase in the immunolabeling of the receptors. However, our results on fluid absorption demonstrated lower values than those of both the control group and the AngII group. Analyzing the fluid absorption results, we noted that treatment with AngII + losartan presented no alterations when compared with the results obtained with losartan alone, demonstrating the high affinity of this receptor antagonist (losartan) for the AT1 receptor. Previous studies report that losartan binding to specific amino acids in the AT1 receptors prevented interaction with the natural ligand and that the complex losartan + receptors was not internalized, as demonstrated by immunohistochemistry, where the density of receptors on the membrane was not affected (19). The importance of the agonist-induced conformational change in receptor internalization was supported by the lack of internalization of the nonpeptide antagonist losartan (14).

These data demonstrated an increase with AngII and a decrease with losartan in fluid absorption (Jv) of about 40%, and also demonstrated that losartan exhibited

higher affinity than AngII for the receptors, by blocking the action of AngII when both drugs were added. Furthermore, in this study we demonstrated that treatment with AngII and its receptor antagonist, in addition to altering fluid reabsorption, also altered distribution of AT1 receptors and the actin cytoskeleton in PCT membranes. However, as mentioned in the discussion above, after drug treatment, there were no significant alterations of the values (pixel) of AT1 receptors and F-actin fluorescence intensity when analyzed statistically.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

*This work was supported by the following grants: CNPq, 97/12103-1; FAEPEX, 00377/2004 and FAPESP, 01/10735-0.*

Address for correspondence:

*Jose Francisco Figueiredo, M.D., Ph.D.  
Laboratório de Nefrologia Experimental  
Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental  
Faculdade de Ciências Médicas (FCM)  
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)  
Cx. Postal 6.111  
13083-970 Campinas, SP, Brasil  
figueiredojf@fcm.unicamp.br*

#### REFERENCES

1. Kurashima K, D'Souza S, Szászi K, Ranjeesingh R, Orłowski J, Grinstein S. The apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1999; 274: 29843-9.
2. Chevrand DD, Paillard M, Poggioli J. Regulation of the luminal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 by intracellular protein trafficking. *Nephrologie* 2002; 23: 219-24.
3. Moe OW. Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2412-25.
4. Szászi K, Grinstein S, Orłowski J, Kapus A. Regulation of the epithelial Na/H exchanger isoform by the cytoskeleton. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10: 265-72.
5. Kolb RJ, Woost PG, Hopfer U. Membrane trafficking of angiotensin receptor type-1 and mechanical signal transduction in proximal tubule cells. *Hypertension* 2004; 44: 352-9.
6. Du Z, Ferguson W, Wang T. Role of PKC and calcium in modulation of effects of angiotensin II on sodium transport in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F688-92.
7. Han HJ, Park SH, Koh HJ, Taub M. Mechanism of regulation of Na<sup>+</sup> transport by angiotensin II in primary renal cells. *Kidney Int* 2000; 57: 2457-67.
8. Edwards RM, Stack EJ, Trisna W. Transport of [<sup>3</sup>H] losartan across isolated perfused rabbit proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 38-42.
9. Burg M, Orloff J. Control of fluid absorption in the renal proximal tubule. *J Clin Invest* 1968; 47: 2016-24.
10. Silva LA, Bertels IM, Paula FS, Falkenstein D, Figueiredo JF. The effect of Collins, Euro-Collins and University of Wisconsin solutions on the function of isolated proximal straight tubules. *Transplant Proc* 2002; 34: 1108-10.
11. Falkenstein D, Conti GT, Ajzen H, Draibe SA, Figueiredo JF.

- Properties of the isolated rabbit proximal convoluted tubule and pars recta after long term storage in a modified Collins solution. *Braz J Med Biol Res* 1982; 15: 361-5.
12. Paxton WG, Runge M, Horaist C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE. Immunohistochemical localization of rat angiotensin AT1 receptor. *Am J Physiol* 1993; 264: F989-95.
  13. Thekkumkara TJ, Cookson R, Linas SL. Angiotensin (AT1A) receptor-mediated increases in transcellular sodium transport in proximal tubule cells. *Am J Physiol* 1998; 274: F897-905.
  14. Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gáborik Z. Mechanisms and functions of AT1 angiotensin receptor internalization. *Regul Pept* 2000; 91: 29-44.
  15. Thekkumkara T, Linas SL. Role of internalization in AT (1A) receptor function in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F623-9.
  16. Smart ML, Hiranyachata S, Harris PJ. Effects of angiotensin II receptor blockade on proximal fluid uptake in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 697-700.
  17. Wong PS, Johns EJ. The receptor subtype mediating the action of angiotensin II on intracellular sodium in rat proximal tubules. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 41-6.
  18. Baum M, Quigley R, Quan A. Effect of luminal angiotensin II on rabbit proximal convoluted tubule bicarbonate absorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997; 273: F595-600.
  19. Becker BN, Cheng H-F, Hammond TG, Harris RC. The type 1 angiotensin II receptor tail affects receptor targeting, internalization, and membrane fusion properties. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 362-9.

*Received: July 19, 2006*

*Revised: October 05, 2006*

*Accepted: November 15, 2006*

© Società Italiana di Nefrologia

## Actin Cytoskeletal and Functional Studies of the Proximal Convoluted Tubules After Preservation

J.F. Figueiredo, I.M.V. Bertels, and J.A.R. Gontijo

---

### ABSTRACT

**Background.** Proximal tubule cells have specialized apical membranes with microvilli that provide an extensive surface area for unidirectional transport of solute from lumen to blood. The major structural solute component is F-actin, which interacts with transmembrane proteins, including ion transport molecules related to normal absorptive and secretory functions. Our study was to evaluate F-actin and fluid absorption (Jv) in proximal tubules after exposure to preservation solutions.

**Methods.** In vitro microperfusion technique and immunohistochemistry analysis.

**Results.** 1. Absorptions were similar in 1- and 24-hour-preserved tubules, as well as in fresh tubules. The exception was tubules for 24 hours in Euro-Collins solution, which did not show absorption, suggesting that it was affected. 2. Fluorescence intensity of actin tubules preserved for 1 hour in both solutions showed similar values to each other and to the control group; tubules preserved for 24 hours in both solutions were similar to each other, although statistically different than the control group and those preserved for 1 hour in Belzer (UW) solution.

**Conclusion.** There were differences among groups in the distribution of F-actin; Jv values were different for 24-hour preservation in each solution, whereas fluorescence intensity was similar in both 24-hour solutions. Thus, actin cytoskeleton was not responsible for it, because 24-hour preservation in UW showed Jv results comparable to the control group.

---

**P**ROXIMAL TUBULE CELLS (PTC) have specialized apical plasma membranes with microvilli to provide an extensive surface area for unidirectional solute transport

from lumen to blood. Filamentous F-actin is the major structural solute component, and its integrity plays a critical role in the normal absorptive and secretory functions and in

---

From the Organ Preservation Laboratories (J.F.F., I.M.V.B.), Department of Internal Medicine (J.A.R.G.), and Department of Experimental Surgery (J.F.F.), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Unicamp, Brazil.

---

Address reprint requests to Jose Francisco Figueiredo, PhD, MD, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Unicamp, Brazil.

© 2008 by Elsevier Inc. All rights reserved.  
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/08/\$-see front matter  
doi:10.1016/j.transproceed.2008.06.060

*Transplantation Proceedings*, 40, 3311-3315 (2008)

3311

the regulation of cellular events such as cell shape stability, cell motility and distribution of integral membrane proteins.<sup>1,2</sup> Evidence has shown interaction of actin with ion transport molecules such as basolateral  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger type 1 (NHE1) and apical  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger type 3 (NHE3), mediated by the  $\text{Na}^+$  gradient generated by basolateral  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.<sup>3,4</sup> Likewise, this interaction is essential for control of vesicle movement, as well as uptake of the assembly of macromolecular signaling complexes at the apical membrane.<sup>5</sup> Cytoskeleton disorganization and loss of membrane polarity are significant pathophysiologic mechanisms of ischemic injury in proximal convoluted tubule (PCT) cells.<sup>6,7</sup> The preservation of the harvested organ is a prerequisite for organ transplantation, and hypothermic storage remains the most common technique used for kidney preservation. However, hypothermic organ preservation is associated with oxygen deprivation, which inevitably leads to some degree of ischemia-reperfusion injury upon transplantation.<sup>8,9</sup> Several processes involved in cellular injury during ischemia and after ischemia-reperfusion have been reported in recent years in an effort to understand the pathophysiology of acute tubular necrosis (ATN), which often represents the background of other disorders occurring in transplanted kidneys.<sup>10</sup> We chose Euro-Collins (EC) and Belzer (UW) solutions for this study because they have been the mainstay of hypothermic storage protection since they came into worldwide use.<sup>11-13</sup> The segment chosen was PCT, a major site of salt and water homeostasis in the mammalian nephron. Approximately 70% of the  $\text{Na}^+$ - and water-filtered load in the kidney is reabsorbed in this segment (P1, P2, P3), which is quite sensitive to ATN, probably due to a higher metabolic consumption. The aim of this work was to evaluate physiologic and structural PCT alterations in vitro in which ischemia by cold preservation and damage by reperfusion could be involved. This study evaluated changes in actin cytoskeleton distribution and its correlation with PCT volume absorption.

## MATERIALS AND METHODS

The investigation followed the general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation. The experiments were performed on preserved isolated PCT from kidneys of male New Zealand White rabbits weighing 1.5 to 2.0 kg.

### In Vitro Microperfusion

We used an in vitro microperfusion technique by Burg and Orloff.<sup>14</sup> Thirty rabbits were sacrificed, and kidneys were then rapidly removed and cut into thin slices, which were preserved with EC and

UW solutions (4°C–8°C) for 1 and 24 hours.<sup>15</sup> Briefly, the isolated PCT, measuring 0.6 to 1.0  $\mu\text{m}$  in length, were dissected under a microscope in chilled solution (4°C–8°C on ice) and transferred to a special temperature-controlled acrylic chamber containing Krebs Henseleit solution modified by addition of 6.5 g/dL of fraction V bovine serum albumin, which consisted of (in mmol/L) 105.0 NaCl, 25.0  $\text{NaHCO}_3$ , 10.0 NaAc, 4.84 KCl, 0.92  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.60  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.81  $\text{MgSO}_4$ , 1.97  $\text{CaCl}_2$ , 5.0 alanine, 8.0 glucose, bubbled with 95%  $\text{O}_2/5\%$   $\text{CO}_2$  mixture, without the aid of enzymatic agents (pH, 7.4; osmolality, 290 mosmol/kg  $\text{H}_2\text{O}$ ). The concentrations of  $^{14}\text{C}$ -inulin were determined using an LS 5000 liquid scintillation counter (Beckman-Coulter, Fullerton, Calif). Fluid absorption (Jv) was calculated in accordance with the equation from Burg and Orloff<sup>16</sup>:  $Jv = VL/L ([^{14}\text{C}\text{-inulin } L] / [^{14}\text{C}\text{-inulin } 0] - 1)$ , where VL (nL/min) is the collection rate, L (mm) the perfused length of the tubule measured with an eyepiece micrometer, and  $[^{14}\text{C}\text{-inulin } L] / [^{14}\text{C}\text{-inulin } 0]$  the concentration ratio of the volume marker in the collected and perfused solutions, respectively; the lumen-to-bath flux (leakage) was measured by the rate of appearance of  $^{14}\text{C}$ -inulin in the continuously collected bath, with only values of less than 3%.

### Visualization of F-Actin Cytoskeleton Using Laser-Scanning Confocal Microscopy

Tubules were fixed and treated with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate. The tubules were observed through a confocal microscope (LSM 510 META; Zeiss, Thornwood, NY) equipped with an  $\times 63$  oil immersion objective. The tubules were imaged longitudinally, and the total intensity of phalloidin-staining fluorescence was quantified after background subtraction by integrating pixel intensities of tubule images over the total number of optical sections.

### Statistical Analysis

All data are presented as means  $\pm$  standard error. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparisons corrected by the Bonferroni adjustment for physiologic data (Jv), and the Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA) for morphologic data. Significance was set at  $P < .05$ .

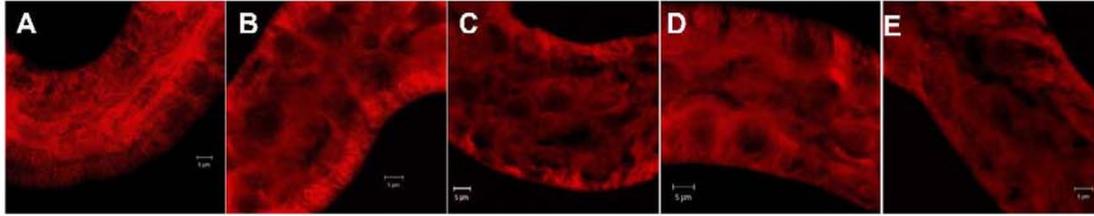
## RESULTS AND DISCUSSION

### Physiologic and Morphologic Data

In general, research concerning preservation of organs in renal transplantation results from work that uses the whole organ for experimentation, such as isolated kidney perfusion. Publications are usually based on experimental and medical findings, as well as observations during the post-transplant period. However, the experimentation has not clarified what may occur in each renal structure segment. We used in vitro microperfusion because this technique permitted direct investigation of the effects of changes in

**Table 1. Actin Cytoskeletal and Functional Studies of Proximal Convoluted Tubules After Preservation**

	Fluid Absorption on Preserved Tubules					
	EC Solution			UW Solution		
1 Hour	1.0 $\pm$ 0.12	n = 7	$P > .5$	1.4 $\pm$ 0.11	$P > .5$	n = 6
24 Hours	No absorption	n = 7	$P < .001$	1.6 $\pm$ .20	$P > .5$	n = 7



**Fig 1.** Representative images of several fresh and preserved isolated nonperfused proximal convoluted tubule (PCT) cells submitted to immunohistochemical analysis for F-actin cytoskeleton staining after treatment by phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate. (A) Control group. (B) Preserved PCT cells in Euro-Collins (EC) solution for 1 hour. (C) Preserved PCT cells in EC solution for 24 hours. (D) Preserved PCT cells in Belzer (UW) solution for 1 hour. (E) Preserved PCT cells in UW solution for 24 hours. In the control group, the actin cytoskeleton distribution was preferentially at the lumen of the PCT cells and is responsible for the brush border structure (A). In both preservation solutions after 1 hour (B and D), the structure can still be observed, suggesting maintenance. However, in preserved PCT cells (EC solution for 24 hours), a discreet disorganization of actin cytoskeleton (C) was observed, although the structure was better maintained in the preserved group (UW for 24 hours) than in EC for 24 hours (E).

the preservation solution that might predict outcomes on whole-organ transplants and allow evaluation of without involvement of hormonal or nerve interferences, the optimal cellular situation after exposure to each preservation solution.<sup>14,15,17-19</sup> In addition, we worked without any other kidney structures (eg, glomerulus), which could be affected by absence of coordinating structures.

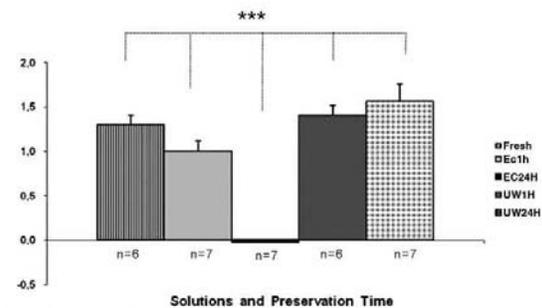
Our laboratory recently published data<sup>18</sup> that showed fluid absorption values ( $J_v = \text{nL}/\text{min}/\text{mm}$ ) in fresh tubules ( $1.3 \pm 0.11$ ;  $n = 6$ ), with results compatible with reviewed literature.<sup>19</sup> The published data established a control group for comparisons among results from preserved tubules, and results of fluid absorption of preserved tubules are summarized in Table 1.

Interestingly, the function of PCT preserved for 24 hours in UW solution was comparable to fresh tubules,<sup>18</sup> and was also comparable to results of tubules preserved for 1 hour in both solutions, which suggests that UW solution preserves PCT better than EC solution. The negative absorption results of the tubules preserved in EC solution for 24 hours showed that EC solution did not preserve the tubule's absorptive capacity ( $P < .001$ ). However, the same results are not seen with tubules preserved for 24 hours in UW solution, which is considered the "gold standard" solution.<sup>13</sup> The actin cytoskeleton pixel intensity was measured as described in Materials and Methods, and the qualitative analysis of the distribution was carried out by microscopic visualization. Our objective was to analyze the actin cytoskeleton in the whole PCT and not in each isolated tubular cell.

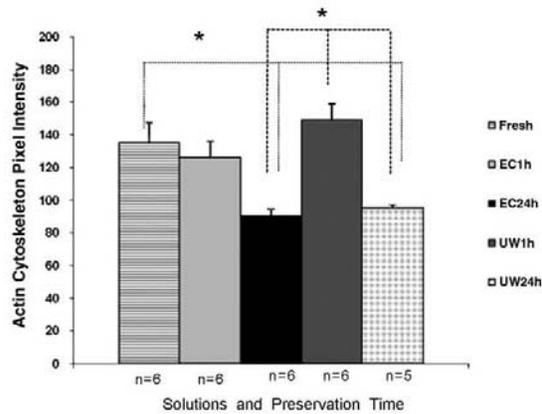
As shown in Fig 1, we verified the massive presence of actin cytoskeleton in the PTCs from all preserved groups studied (1A-D). The actin fluorescence intensity appeared enhanced in the brush border of the fresh proximal tubule ( $135 \pm 12$ ;  $n = 6$ ) and with more cohesion than on the basolateral side; filament organization in the tubular structure was evident as well, as in published data by our laboratory.<sup>18</sup>

The results of actin fluorescence intensity of preserved tubules are summarized in Table 2. In tubules preserved for

1 hour in EC solution (Fig 1A), the fluorescence intensity was equal to that of fresh tubules.<sup>18</sup> In PCT preserved for 24 hours in EC solution (Fig 1B), the fluorescence intensity was significantly lower and the brush border was less evident than those in fresh tubules; in these tubules, actin appeared to be disorganized, quite different than tubules preserved for 1 hour in both solutions (Fig 2). In addition, in tubules preserved for 24 hours in EC solution, actin also appeared less distinct than in tubules preserved for 1 hour in EC solution. Tubules preserved for 1 hour in UW solution (Fig 1C) revealed pixel fluorescence intensity similar to that of fresh tubules and discreetly increased compared with the group preserved in EC for 1 hour. Actin was located in brush border microfilaments with marked



**Fig 2.** Results of fluid absorption ( $J_v$ ) of preserved proximal convoluted tubule (PCT) cells. The analysis showed a decrease in the  $J_v$  of tubules preserved for 1 hour in Euro-Collins (EC) solution and an increase in the  $J_v$  of tubules preserved for 1 hour and 24 hours in Belzer (UW) solution. However, these changes were not statistically different when compared with each other and with the control group ( $P > .05$ ). The  $J_v$  of tubules preserved for 24 hours in EC solution showed no absorption, which was different than the other groups and was statistically significant ( $***P < .001$ ). Data are reported as means  $\pm$  standard errors of the mean for  $\geq 4$  PCT per group compared with the control group (analysis of variance), followed by multiple comparisons corrected according to Bonferroni ( $*P < .05$ ;  $**P < .001$ ).



**Fig 3.** Actin cytoskeleton pixel intensity of preserved proximal convoluted tubule (PCT) cells using phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate. The analysis showed that tubules preserved for 1 hour in Euro-Collins (EC) and Belzer (UW) solutions exhibited values similar to those of the control group ( $P > .05$ ). Although tubules preserved for 24 hours in EC or UW solutions exhibited similar values compared with each other or with tubules preserved for 1 hour in EC ( $P > .05$ ), there was a statistically significant difference in comparison with the control group and the tubules preserved for 1 hour in UW solution ( $P < .05$ ). Data are reported as means  $\pm$  standard errors of the mean for  $\geq 4$  PCT per group compared with the control group (Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance test for morphologic data;  $*P < .05$ ).

staining concentration, also comparable to that of fresh tubules and the group preserved in EC for 1 hour. This result is statistically significant compared with results of the groups preserved for 24 hours in both solutions.

The actin fluorescence pixel intensity of the tubules (Fig 3) preserved for 24 hours in UW was similar to those preserved for 24 hours in EC solution, although the structure of the tubules from UW solution had a better appearance than the tubules from the EC solution during the same preservation period. The qualitative analysis is based on observation of the visualized data. Data from the literature reported that cultured hepatocytes, when stored at 4°C in UW solution for 4 or 12 hours, showed amorphous precipitates of F-actin and fragmented short microtubules, which does not occur when these cells remain in culture medium at 37°C.<sup>20</sup> In addition, these data partly justify the smaller amount of F-actin in our tubules from prolonged hypothermia. Other published data support the model assumption

**Table 2. Actin Cytoskeletal and Functional Studies of Proximal Convoluted Tubules After Preservation**

Actin Cytoskeleton Fluorescence Intensity on Preserved Tubules						
	EC Solution			UW Solution		
1 Hour	121 $\pm$ 10	$P > .5$	n = 6	145 $\pm$ 11	$P > .5$	n = 6
24 Hours	96 $\pm$ 10	$P < .5$	n = 6	95 $\pm$ 3	$P < .5$	n = 5

that actin cytoskeleton is a key mediator for transduction of the hydrodynamic force on microvilli related to NHE3 alteration density within the luminal cell membrane.<sup>21</sup> Interestingly, in an experimental study using preservation solutions at varied temperatures, it was observed that after rewarming, EC solution led to cell swelling and deterioration of the transepithelial potential; however, UW solution at 22°C to 37°C had no effect on the cell volume. Thus, the presence of EC solution in the renal interstitium during the rewarming phase may contribute significantly to reperfusion injuries in kidney transplantation.<sup>22</sup>

According to these data, during reperfusion in our models preserved for 24 hours in EC solution, the residual volume of the EC solution within the tubules also could contribute to alterations in cell function, decreasing reabsorption. In accordance with recent models of epithelial transport, fluid and ions move through tight junctions with solute backleak, estimated to be between 15% and 20%, from the lateral intracellular space to the tubular lumen back, and the loss rate could increase by membrane breakdown and opening of tight junctions. According to published data, because the opening of tight junctions is related to actin cytoskeleton disorganization and depolarization of apical membrane proteins, significant mechanisms may lead to ischemic injury, which could result in absorptive losses.<sup>23</sup> This possibility of membrane breakdown and opening of tight junctions could also explain our negative results for reabsorption with tubules preserved for 24 hours in EC solution. Then changes in actin could cause alterations to other proteins related to fluid absorption and, depending on the preservation solution used, could alter the absorption rate. This change in rate may explain the change in actin after 24-hour preservation in both solutions, although only the EC solution showed changes to Jv. Therefore, our results lead us to believe that regarding tissue preservation, the differences among the solutions and time of preservation could determine morphologic alterations in the distribution of F-actin cytoskeleton and other metabolic pathways, which could affect fluid absorption. Some molecular and physiologic studies on the preservation area have shown the superiority of UW solution,<sup>12,13,17</sup> however, our objective with these data was to evaluate fluid absorption related to actin cytoskeleton after cold preservation. In summary, under our experimental conditions, the data confirmed that UW solution was better than EC solution in maintaining fluid absorption. In addition, we showed the superiority of UW solution to maintain actin cytoskeleton organization in PCT cells.

#### REFERENCES

- Ashworth SL, Sandoval RM, Hosford M, et al: Ischemic injury induces ADF relocalization to the apical domain of rat proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F886, 2001
- Ashworth SL, Wean SE, Campos SB, et al: Renal ischemia induces tropomyosin dissociation-destabilizing microvilli microfilaments. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F988, 2004
- Szászi K, Kurashima K, Kaibuchi K, et al: Role of the cytoskeleton in mediating cAMP-dependent protein kinase inhibi-

tion of the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3. *J Biol Chem* 276:40761, 2001

4. Chalumeau C, du Cheyron D, Defontaine N, et al: NHE3 activity and trafficking depend on the state of actin organization in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F283, 2001

5. Shenolikar S, Weinman EJ: NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F389, 2001

6. Wald FA, Figueroa Y, Oriolo AS, Salas PJ: Membrane repolarization is delayed in proximal tubules after ischemia-reperfusion: possible role of microtubule-organizing centers. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F230, 2003

7. Breton S, Brown D: Cold-induced microtubule disruption and relocalization of membrane proteins in kidney epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 9:155, 1998

8. El-Wahsh M: Liver graft preservation: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6:12, 2007

9. Hall SM, Evans J, Haworth SG: Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:106, 1993

10. Salahudeen AK: Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F181, 2004

11. Ahmad N, Hostert L, Pratt JR, et al: A pathophysiologic study of the kidney tubule to optimize organ preservation solutions. *Kidney Int* 66:77, 2004

12. de Boer J, De Meester J, Smits JM, et al: Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int* 12:447, 1999

13. Southard JH: The right solution for organ preservation. In: *North American Pharmacotherapy* 2004

14. Burg M, Grantham J, Abramow M, Orloff J: Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol* 210:1293, 1966

15. Figueiredo JF, Falkenstein D, Draibe SA, et al: The effect of Collins' solution on the function and structure of isolated proximal convoluted tubules from rabbit kidneys. *Transplantation* 42:80, 1986

16. Burg MB, Orloff J: Control of fluid absorption in the renal proximal tubule. *J Clin Invest* 47:2016, 1968

17. Silva LA, Bertels IM, Paula FS, et al: The effect of Collin's, Euro-Collin's, and University of Wisconsin solutions on the function of isolated proximal straight tubules. *Transplant Proc* 34:1108, 2002

18. Bertels IM, Gontijo JA, Figueiredo JF: AT1 receptors and the actin cytoskeleton during angiotensin II treatment. *J Nephrol* 20:29, 2007

19. Falkenstein D, Conti GT, Ajzen H, et al: Properties of the isolated rabbit proximal convoluted tubule and pars recta after long-term storage in a modified Collins solution. *Braz J Med Biol Res* 15:361, 1982

20. Stefanovich P, Ezzell RM, Sheehan SJ, et al: Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. *Cryobiology* 32:389, 1995

21. Du Z, Duan Y, Yan Q, et al: Mechanosensory function of microvilli of the kidney proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13068, 2004

22. Morgunov NS, You YD, Hirsch DJ: Response of mouse proximal straight tubule and medullary thick ascending limb to beta-agonist. *J Am Soc Nephrol* 4:1151, 1993

23. Weinstein AM: Mathematical models of renal fluid and electrolyte transport: acknowledging our uncertainty. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F871, 2003

Complete title:

**“Isolated Preserved Proximal Tubules during Angiotensin II and Losartan Treatment”**

Short title:

**“Preserved Tubules during Drugs Treatment”**

First name, middle initials and surname of authors:

**Ivone M. V. Bertels<sup>1</sup>, José A. R. Gontijo<sup>2</sup> and José F. Figueiredo<sup>1 3</sup>**

Laboratory and Institution of origin:

**<sup>1</sup> Organ Preservation Laboratories, <sup>2</sup> Department of Internal Medicine, <sup>3</sup> Department of Experimental Surgery, School of Medical Sciences, State University of Campinas - UNICAMP - Campinas - Brazil.**

Correspondence and offprint requests to:

**JOSE FRANCISCO FIGUEIREDO, MD, Ph. D.**

**Laboratório de Nefrologia Experimental**

**Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental**

**Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Cx. Postal 6.111**

**Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**

**CEP: 13083-970 - Campinas SP Brasil**

**FAX: 019 3521-7295**

**E-mail: [figueiredojf@fcm.unicamp.br](mailto:figueiredojf@fcm.unicamp.br)**

This work was supported by the following grants:

**National Council for Scientific and Technological Development (CNPq): 300190/79**

**Teaching, Research and Extension Support Foundation (FAEPEX): 00377/2004**

**State of São Paulo Research Foundation (FAPESP): 01/10735-0**

## ABSTRACT

**Background:** In renal transplantation using cold preservation solution, ischemia triggers a cascade of events in the tubular cells, which may result in decreased renal function, and this, associated with hypertension, may lead to renal dysfunction. Several drugs are used to decrease blood pressure, delaying the progress of kidney failure, Angiotensin II receptor blockers, such as losartan, are frequently used for this purpose. The aim of the present study was to determine whether proximal tubule cells interact with Angiotensin II and losartan after preservation, varying both fluid absorption ( $J_v$ ) and AT1 receptor fluorescence intensity on PCT membranes, such as in fresh renal tubules.

**Methods:** We used *in vitro* microperfusion and immunohistochemistry analysis.

**Results:** When compared to control groups, Angiotensin II increased  $J_v$ , while losartan or ANGII+losartan reduced  $J_v$  into the preservation Euro-Collins (EC) solution for 1 hour, and Belzer (UW) for 1 and 24 hours. The tubules showed no absorption into the Euro-Collins solution for 24 hours. The fluorescence pixel intensity average of AT1 receptors was more evident in the group with no drugs after 1-hour preservation (both solutions) and in the group of tubules treated with Angiotensin II after 24-hour preservation (both solutions).

**Conclusions:** Preserved proximal tubular cells responded to ANGII and losartan treatment, showing changes in fluid absorption, such as in fresh tubules, exception to Euro-Collins solution 24 hours; and the presence of AT1 receptors in tubular membrane seemed to be abundant, suggesting that cold preservation did not interfere in their distribution.

**KEYWORDS:** AT1R, Angiotensin II, Losartan, Microperfusion, Preservation solutions.

## INTRODUCTION

The organ preservation constitutes a prerequisite for organ transplantation, and hypothermic storage remains the main strategy to minimize ischemic injury and increase viability in organ preservation techniques. However, hypothermic techniques are associated with oxygen deprivation, which can lead to varied degrees of organ damages from ischemia-reperfusion upon transplantation. Nowadays, several studies involving cellular injury during ischemia and reperfusion have been developed to understand the pathophysiology of tubular cell events during posttransplantation period, which lead to decreased renal function, and beginning of acute tubular necrosis (ATN), which often represents the background of other transplanted kidney disorders (1,10,13,14,17,20,22,26,27,34,35,36).

Furthermore, Angiotensin II (ANGII) regulates blood pressure, body fluid homeostasis, as well as electrolyte metabolism (6,7,9,18). Endogenously produced and lumenally secreted in concentrations of higher magnitude than in plasma (24,25), ANGII regulates transport activity in proximal convoluted tubules (PCT), via G-protein-coupled AT1 receptors (AT1R) localized on both the apical and the basolateral cell surface (2,3,33). After ligand-associated, subsequently different signalling pathways are initiated: physiological concentrations ( $10^{-12}$  to  $10^{-10}$  mol/L) stimulate sodium ( $\text{Na}^+$ ) reabsorption through  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger type3 (NHE-3), involving protein kinase A (PKA) or protein kinase C (PKC), and modulates  $\text{NaHCO}_3$  cotransport (NBC-1) and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA), whereas pharmacological doses ( $10^{-7}$  mol/L and above) inhibit absorption through inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger type1 (NHE-1) due to phospholipase  $\text{A}_2$  (PLA<sub>2</sub>) mediated generation of arachidonic acid (AA) and cytochrome P-450 monooxygenase (P450s) (7,9,11,21,29,30,33). Besides, literature has shown that hypertension is a major health concern, facilitating renal injury. Mechanisms such as blood pressure reduction slow the progress of kidney failure

down, and ANGII receptor blockers, such losartan are frequently used for this purpose (13,28). Losartan inhibits ANGII action by binding to specific membrane AT1R, from where ANGII is displaced and is antagonized by biologic actions (6,32). Based on these reports, this study was designed to evaluate actions from ANGII and losartan, involved in fluid absorption ( $\text{Na}^+$  and water) and in the AT1R density on membranes of preserved PCT in Euro Collins (EC) and Belzer (UW) solutions.

## **MATERIALS AND METHODS**

The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. The experiments were performed on preserved isolated PCT of kidneys from male New Zealand white rabbits weighing 1.5 – 2kg.

### **Tubule Dissection and in vitro microperfusion:**

The in vitro microperfusion technique was described by Burg and Orloff (4). Kidneys were preserved 1 and 24hours using EC and UW solution, on the basolateral side (31). After that, PCT was dissected and perfused with ultrafiltrate "plasma like" obtained from Krebs Henseleit (KHA) solution modified by addition of Bovine Serum Albumin, (BSA), and added of  $^{14}\text{C}$ -Inulin.

In the bath solution was added  $10^{-12}$  mol/L ANGII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe; (SIGMA), or  $10^{-6}$  mol/L losartan (2-n-butyl-4-cloro-5-hydroxymethyl-1-[(2'-(1-H-tetrazole-5-yl) biphenyl-4-yl) methyl] imidazole); (Dupont) or ANGII+losartan simultaneously.  $^{14}\text{C}$ -Inulin concentrations were determined using a LS 5000 liquid scintillation counter (Beckman Counter). Fluid absorption ( $J_v$ ) in accordance with the equation:  $J_v = VL/L$  ( $^{14}\text{C}$ -inulin]

$L/[^{14}\text{C-inulin}]_0 - 1$ ), (5), where VL (nl/min) is the collection rate, L (mm) the perfused length of the tubule measured using an eyepiece micrometer, and  $[^{14}\text{C-inulin}]_L/[^{14}\text{C-inulin}]_0$  was the concentration ratio of the volume marker in the collected and perfused solutions, respectively.

**Immunohistochemistry Analysis: AT1 receptors and actin cytoskeleton labeling:**

Preserved isolated nonperfused PCTs were incubated with  $10^{-12}$  mol/L ANGII or  $10^{-6}$  mol/L losartan or ANGII+losartan simultaneously, for 30minutes at  $36^\circ\text{C}$ , in a humidified chamber. Sections were mounted on silanized glass slides and fixed in methanol for analysis incubated at (-)  $20^\circ\text{C}$  for 1 hour. The sections were rinsed three times using PBS, pH 7.4. Nonspecific binding of antibodies was blocked by overnight incubation sections at  $4^\circ\text{C}$ , in a humidified atmosphere, using special blocking solution containing 1% normal rabbit serum, and 3% dried milk powder in 0.1M PBS containing 2.5% BSA.

After then, the sections were incubated with a polyclonal rabbit anti-AT1 (N-10) primary antibody (Santa Cruz Biotechnology) and were covered for 2hours with monoclonal secondary antibody of donkey anti-rabbit immunoglobulin G conjugated to Cy2 (Jackson Immuno-Research). After, they were treated with phalloidin-tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate (Product Number P1951; Sigma-Aldrich) in 0.1M PBS for 20 minutes at room temperature. The usual dilution of phalloidin-tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate was 1:200 from 200 U/mL methanolic stock solutions. After being rinsed in 0.1M PBS, tubules were gently pellet and resuspended in vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA)

**Visualization of AT1 receptors and F-Actin using Laser-Scanning Confocal Microscopy:**

The tubules were imaged (Zeiss confocal microscope -LSM 510 META) and the total intensity of AT1R was quantified after background subtraction by integrating pixel intensities of tubule images over the total number of optical sections using LSM 510 software. The observation of F-actin cytoskeleton was carried out with visual analyses only.

**Statistical Analysis:**

All data were presented as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA (variance analysis) followed by multiple comparisons corrected by using the Bonferroni test for physiological data (Jv), and the Kruskal-Wallis test (Nonparametric ANOVA) for morphological data.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS:

### **Jv = (nl.mim<sup>-1</sup>.mm<sup>-1</sup>)**

In table and graph 1, we demonstrated that, after preservation in EC solution for 1hour and in UW solution for 1 and 24hours, tubular function was equally affected as occur in fresh tubules (3): ANGII increased Jv and losartan decreased Jv ( $p<0.05$ ). In tubules preserved 1hour in EC solution and treated with ANGII+losartan, the results of fluid absorption were similar to control group and also similar to tubules treated with losartan alone ( $p>0.05$ ).

The tubules preserved in UW solution 1 and 24hours, treated with ANGII+losartan, showed a statistically significant decrease on Jv when compared with the control group ( $p<0.05$ ). However, when tubules from ANGII+losartan were compared with the group treated with losartan alone, the results were similar ( $p>0.05$ ).

All the groups of tubules treated by losartan or ANGII+losartan showed a decrease in the Jv, statistically significant ( $p<0.05$ ) when compared to tubules treated with ANGII alone. However, there was an exception concerning preservation for 24hours in EC solution, which showed no fluid absorption, result highly significant ( $p<0,001$ ).

Results are summarized in table and graph 1.

### **AT1 receptor fluorescence pixel intensity average**

In table and graph 2, we demonstrated that the fluorescence pixel intensity average of AT1 receptors (AT1R) was more evident in the preserved tubules with no drugs in both preservation for 1hour, and there was a decrease of the AT1R fluorescence pixel intensity average, when ANGII or losartan or ANGII+losartan were applied; however, these differences were not as statistically significant in EC solution, as in UW solution.

In preserved tubules for 24hours with no drugs, in both solutions, there was a decrease in the AT1R fluorescence pixel intensity average, when compared with the 1hour (EC and

UW) preserved tubules with no drugs. When preserved tubules for 24hours in both solutions were treated with ANGII, there was a statistically significant increase in the AT1R fluorescence pixel intensity average, when compared with 24hours preserved tubules, with no drugs. Preserved tubules 24hours, in both solutions, treated with losartan or ANGII+losartan showed similar results with the control groups (24hours with no drugs). Results are summarized in table and graph 2.

**DISCUSSION:**

In previous work, in fresh tubules there was stimulation by ANGII and an inhibition by losartan of fluid absorption, approximately 40percent (3), and frequency of receptors on tubular membranes was in accordance with the recent publications (15,19). Fluid absorption ( $J_v = nI \cdot \text{mim}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ ) on preserved tubules, with no drugs 1hour in both solutions and 24hours in UW solution showed functional results ( $J_v$ ) similar to fresh tubules. However, in our previous studies (no published data), EC solution 24hours, in tubules with no drugs treatment, was statistically different when compared with the control and with other groups of preservation.

There are no functional studies and morphologic evaluation of AT1 receptors (AT1R) in the literature concerning preservation area, therefore we developed the present study in order to assess the tubular localization of AT1R, comparing fluid absorption in preserved PCT.

Our aim was to find a reply to renal transplant issues, taking into account that a great percent of donated kidneys are obtained from deceased patients. These kidneys need to be transported to other places for implantation into the receptor, after being submitted to cold preservation in varied solutions, depending on several circumstances, and subjected to a period of cold ischemia while waiting for tissue matching and transplantation (1,8,10,14,20). The number of patients waiting for transplantation is steadily increasing, and donated organs from deceased people, due to prolonged cold ischemia, lead to higher risk of graft dysfunction, higher recipient mortality, and higher health care costs. Thus, in our research, we evaluate AT1R considering involvement of ANGII on posttransplant hypertension. In our results, there was increase of AT1R fluorescence pixel intensity average in tubules preserved into EC and UW solution 24hours, treated with ANGII, although only tubules preserved in UW solution were viable. The high AT1R fluorescence pixel intensity average, in UW solution 24hours by ANGII treatment, could generate

concerns, since that increase of fluid absorption it would have to mean internalization and recycling of the AT1R with probable decrease of the AT1R on membrane. However, although AT1R are express in both membranes of TCP, there are differences in the rates of endocytosis and recycling (2,24,29,30,34), as well in the sequence of the amino acids of the chain ends involved in the performance of these receptors (2,16,23). In accordance with recent data, basolateral AT1R interact with G-proteins and inhibit adenosine monophosphate cyclic (cAMP) accumulation, increasing sodium transport without internalizing; while apical AT1R undergo internalization before interacting with G-proteins and inhibiting cAMP accumulation, increasing transcellular sodium transport (34). We believe that these variations of AT1R behaviour could explain the higher density of AT1R, since drugs were applied in basolateral side. Thus, in cultured PCT cells, administration of ANGII increases AT1R expression (7). However, the systemic administration of ANGII that increases systemic blood pressure does not alter total renal AT1R expression, but decreases AT1R expression in glomeruli and inner stripe of the outer medulla (2,12,29). Additionally, was demonstrated that the linking of the ANGII+AT1R stimulates the internalization and the processing of the ANGII+AT1R complex, and in TCP cells the linking of ANGII+AT1R and the endocytosis of the ANGII+AT1R complex are associated and are necessary for activation of the transduction pathways of Na<sup>+</sup> signal and transport (15,34). Internalization process is followed by recycling of the AT1R to the cell surface, a process that seems important for the regulation of the number of cell surface receptors, but the AT1R probably recycles to the membrane in a state that is uncoupled from G-proteins as indicated by the reduced the affinity of the recycled receptor for ANGII (15). In our procedures, ANGII stimulated fluid absorption in preserved tubules, except 24hours in EC solution, where PCT was not viable, similar to tubules with no drugs treatment, and thus preservation into UW solution reveals a better performance (1,14,31). In studies using

animal models from renal transplantation with acute rejection and without any immunosuppressant, the transporters NHE1, NKA and AT1R were unaltered; mRNA and protein levels for NHE3 were down regulated, while those for NBC1 were up regulated. These results favor a reduced reabsorption of Na<sup>+</sup> and H<sub>2</sub>O, and support the AT1R maintenance on tubular membrane (34). Additionally, during visual analyses, we observed in figure 2 (2I, 2J, 2K, 2L), where tubules were preserved by EC solution for 24 hours, that actin cytoskeleton seemed disrupted and less organised than in other groups of preservation. However, this analysis was carried out by visual observation and not by measured data. Based on published data, we could suppose, that there was losses of the basal membrane structure, cellular polarity and epithelial cell integrity, which could cause function loss, leading to fall of the fluid absorption (22,29). Decreased fluid absorption with losartan and ANGII+losartan are in accordance with the literature where the endogenous administration of AT1R blockers inhibits the fluid absorption in the PCT, demonstrating a higher affinity of the AT1R by losartan, and these are data that support the role playing to the AT1R located in the basolateral membrane of the PCT in the transport regulation (13,25). Nevertheless, the average of AT1R fluorescence pixel intensity, from tubules treated with losartan and ANGII+losartan in all preservation groups, seems unchanged and similar to the control group, which we could explain based on previous studies reporting that losartan binding to specific amino acids in AT1R prevented interaction with the natural ligand and that the complex losartan+AT1R did not internalize, and the receptor density on the membrane was not affected, and the lack of internalization by losartan, support the hypothesis that ANGII induce conformational change for the receptor internalization (2,15,34). In conclusion, we observed that the PCT, after exposure to cold preservation:

- undergoes changes in fluid absorption by ANGII and losartan treatment similarly to fresh tubules;
- In losartan presence, ANGII was not capable to show its action of increase in fluid absorption;
- The presence of AT1R on membranes did not guarantee effective fluid absorption, as seen in preserved tubules for EC 24hours, despite the treatment with ANGII or losartan;
- Regarding the AT1R density, it was evidenced a large amount of it on renal tubular membranes, despite the preservation solution, and of the treatment with ANGII or losartan;
- The UW solution was efficient to maintain tubular function and structures, even with 24hours of preservation time, the same did not occurred with the EC solution;
- Actin Cytoskeleton from preserved tubules in EC solution 24hours, showed an appearance injured, (observations was done by visual analysis), and the actin cytoskeleton needs to be intact to preserve AT1 receptor functions and tubular fluid absorption.

**REFERENCES:**

1. Ahmad, N.; Hostert, L.; Pratt, J. R.; Billar, K. J.; Potis, D.; Lodge, J. P. A. A pathophysiologic study of the kidney tubule to optimize organ preservation solutions. *Kidney Int.* 66:77-90; 2004.
2. Becker, B. N.; Cheng, H. F.; Hammond, T. G.; Harris, R. C. The type 1 angiotensin II receptor tail affects receptor targeting, internalization, and membrane fusion properties. *Mol. Pharmacol.* 65:362-369; 2003.
3. Bertels, I. M. V.; Gontijo, J. A. R.; Figueiredo, J. F. AT1 receptors and the actin cytoskeleton during angiotensin II treatment. *J. Nephrol.* 20:29-35; 2007.
4. Burg, M. Introduction: Background and development of microperfusion technique. *Kidney Int.* 22:417-424; 1982.
5. Burg, M.; Orloff, J. Control of fluid absorption in the renal proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 47:2016-2024; 1968.
6. Carey, R. M.; Siragy, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev.* 24:261-271; 2003.
7. Cheng, H. F.; Becker, B. N.; Burns, K. D.; Harris, R. C. Angiotensin II upregulates type1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 95:2012-2019; 1995.
8. D'Alessandro, A. M.; Odorico, J. S.; Knechtle, S. J.; Becker, Y. T.; Hoffmann, R. M.; Kalayoglu, M.; Sollinger, H. W. Simultaneous pancreas-kidney (SPK) transplantation from controlled non-heart-beating donors (NHBDs). *Cell Transplant.* 9:889-893; 2000.

9. Du, Z.; Ferguson, W.; Wang, T. Role of PKC and calcium in modulation of effects of angiotensin II on sodium transport in proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284:688-692; 2003.
10. Gilligan, B. J.; Woo, H. M.; Kosieradzki, M.; Torrealba, J. R.; Southard, J. H.; Mangino, M. J. Prolonged hypothermia causes primary nonfunction in preserved canine renal allografts due to humoral rejection. *Am. J. Transplant.* 4:1266-1273; 2004.
11. Han, H. J.; Park, S. H.; Koh, H. J.; Taub, M. Mechanism of regulation of Na<sup>+</sup> transport by angiotensin II in primary renal cells. *Kidney Int.* 57:2457-2467; 2000.
12. Harrison-Bernard, L. M.; Zhuo, J.; Kobori, H.; Ohishi, M.; Navar, L. G. Intrarenal AT1 receptor and ACE binding in ANG II-induced hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281:19-25; 2002.
13. Holgado, R.; Anaya, F.; Castillo, D. D. Angiotensin II type1 (AT1) receptor antagonists in the treatment of hypertension after renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16:117-120; 2001.
14. Hrabalova, M.; Bachleda, P.; Lubuska, L.; Kojecky, Z.; Zadrazil, J.; Krejci, K. K.; Al Jabry, S. Effect of various protective solutions on function after kidneys. *Transplantation* 147:197-202; 2003.
15. Hunyady, L.; Catt, K. J.; Clark, A. J. L.; Gáborik, Z. Mechanisms and functions of AT1 angiotensin receptor internalization. *Regul. Pept.* 9:129-144; 2000.
16. Hunyady, L.; Gáborik, Z.; Shah, B. H.; Jagadeesh, G. I.; Clark, A. J. L.; Catt, K. J. Structural determinants of agonist-induced signaling and regulation of the angiotensin AT1 receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217:89-100; 2004.
17. Keven, K.; Ozturk, R.; Sengul, S.; Kutlay, S.; Ergun, I.; Erturk, S.; Erbay, B. Renal tubular acidosis after kidney transplantation—incidence, risk factors and clinical implications. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:906-910; 2007.

18. Kobori, H.; Masaomi, N.; Navar, L. G.; Nishiyama, A. The intrarenal renin-angiotensin system: From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol. Rev.* 59:251-287; 2004.
19. Kolb, R. J.; Woost, P. G.; Hopfer, U. Membrane trafficking of angiotensin receptor type1 and mechanical signal transduction in proximal tubule cells. *Hypertension* 44:352-359; 2004.
20. Kusaka, M.; Kuroyanagi, Y.; Mori, T.; Nagaoka, K.; Sasaki, H.; Maruyama, T.; Hayakawa, K.; Shiroki, R.; Kurahashi, H.; Hoshinaga, K. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Cell Transplant.* 16:129-134; 2008.
21. Li, X. C.; Carretero, O. A.; Navar, L. G.; Zhuo, J. L. AT1 receptor-mediated accumulation of extracellular angiotensin II in proximal tubule cells: Role of cytoskeleton microtubules and tyrosine phosphatases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291:375-383; 2006.
22. Molitoris, B. A.; Geerds, A.; Dahi, R. H. Ischemia-induced loss of epithelial polarity. Role of the tight junction. *J. Clin. Invest.* 84:1334-1339; 1989.
23. Monnot, C.; Bihoreau, C.; Conchon, S.; Curnow, K. M.; Corvol, P.; Clauser, E. Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. *J. Biol. Chem.* 271:1507-1513; 1996.
24. Navar, L. G.; Harrison-Bernard, L. M.; Nishiyama, A.; Kobori, H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 39:316-322; 2002.
25. Quan, A.; Baum, M. Endogenous production of angiotensin II modulates rat proximal tubule transport. *J. Clin. Invest.* 97:2878-2882; 1996.
26. Salahudeen, A. K. Cold Ischemic injury of transplanted kidneys: New insights from experimental studies. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287:181-187; 2004.

27. Salehi, P.; Mirbolooki, M.; Kin, T.; Tsujimura, T.; Shapiro, A. M. J.; Churchill, T. A.; Lakey, J. R. T. Ameliorating injury during preservation and isolation of human islets using the two-layer method with Perfluorocarbon and UW solution. *Cell Transplant.* 15:187-194; 2006.
28. Satia, M. C.; Gandhi, T. P.; Goyal, R. K. Losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and a few of its congeners: A new therapeutic class in the management of hypertension. *Indian J. Pharmacol.* 27:142-151; 1995.
29. Schelling, J. R.; Hanson, A. S.; Marzec, R.; Linas, S. L. Cytoskeleton-dependent endocytosis is required for apical type 1 angiotensin II receptor-mediated phospholipase C activation in cultured rat proximal tubule cells. *J. Clin. Invest.* 90:2472-2480; 1992.
30. Schuster, V. L.; Kokko, J. P.; Jacobson, H. R. Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J. Clin. Invest.* 73:507-515; 1984.
31. Silva, L. A. C. V.; Bertels, I. M. V.; Paula, F. S. A.; Falkenstein, D.; Figueiredo J. F. The effect of Collins, Euro-Collins and University of Wisconsin solutions on the function of isolated proximal straight tubules. *Transplant. Proc.* 34:1108-1110; 2002.
32. Siragy, H. M. AT1 and AT2 receptors in the kidney: Role in disease and treatment. *Am. J. Kidney Dis.* 36:4-9; 2000.
33. Thekkumkara, T.; Linas, S. L. Role of internalization in AT1A receptor functions in proximal tubule epithelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:623-629; 2002.
34. Velic, A.; Hirsch, J. R.; Bartel, J.; Thomas, R.; Schröter, R.; Stegemann, H.; Edemir, B.; August, C.; Schlatter, E.; Gabriëls, G. Renal transplantation modulates expression and function of receptors and transporters of rat proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:967-977; 2004.

35. You, Y.; Hirsch, D. J.; Morgunov, N. S. Functional integrity of proximal tubule cells: effects of temperature and preservation solutions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3:1900-1912; 1993.
36. Zieger, M. A. J.; Gupta, M. P. Endothelial cell preservation at 10°C minimizes catalytic iron, oxidative stress, and cold-induced injury. *Cell Transplant.* 15:499-510; 2006.

Legends of Figures:

**FIGURE 1:**

Representative images of several preserved isolated nonperfused PCTs submitted to immunohistochemical analysis for AT1 receptors with polyclonal primary anti-ANGII AT1 receptor antibody, followed by secondary CY2-conjugated Affinipure donkey anti-rabbit IgG.

Control group: preserved tubules with no drug treatment: EC 1hr, UW 1hr, EC 24hrs, UW 24hrs (Images A, E, I and M respectively).

Treatments in the preserved tubules in EC 1hr, UW 1hr, EC 24hrs and UW 24hrs respectively:

ANGII (Images B, F, J and N);

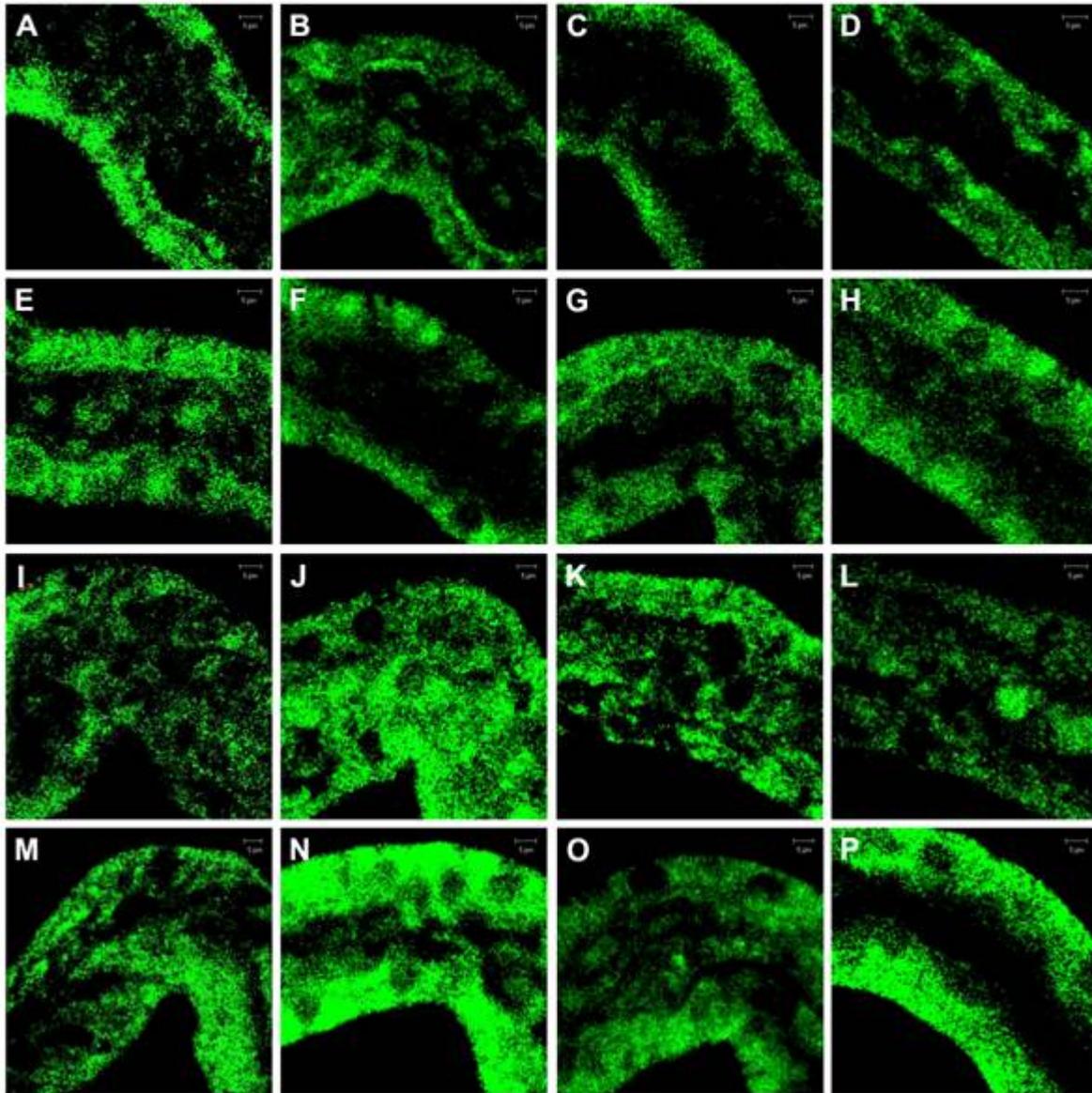
Losartan (Images C, G, K and O);

ANGII+losartan (Images D, H, L and P).

In both preservation solutions (1hr), with no drug treatment (control group), image A (EC solution) and image E (UW solution) AT1 receptor fluorescence pixel intensity, appeared with greater evidence than other groups preserved 1hr, after drug treatment, in accordance to fluorescence pixel intensity average.

However, in preserved tubules in EC and UW solution (24hrs) treated by ANGI (images J and N) we observed an increase in AT1 receptors fluorescence pixel intensity average, when compared to control group (with no drug treatment) and also to preserved tubules, treated with losartan and ANGI+losartan.

Nevertheless, in all preserved groups, AT1 receptors were widely visualized and their distribution was demonstrated on the basal and luminal membranes.



**FIGURE 2:**

Representative images of several preserved isolated nonperfused PCT submitted to immunohistochemical analysis for F-Actin cytoskeleton staining, after treatment by phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate.

Control group: preserved tubules with no drug treatment: EC 1hr, UW 1hr, EC 24hrs, UW 24hrs (Images A, E, I and M respectively).

Treatments in the preserved tubules in EC 1hr, UW 1hr, EC 24hrs and UW 24hrs respectively:

ANGII (Images B, F, J and N);

Losartan (Images C, G, K and O);

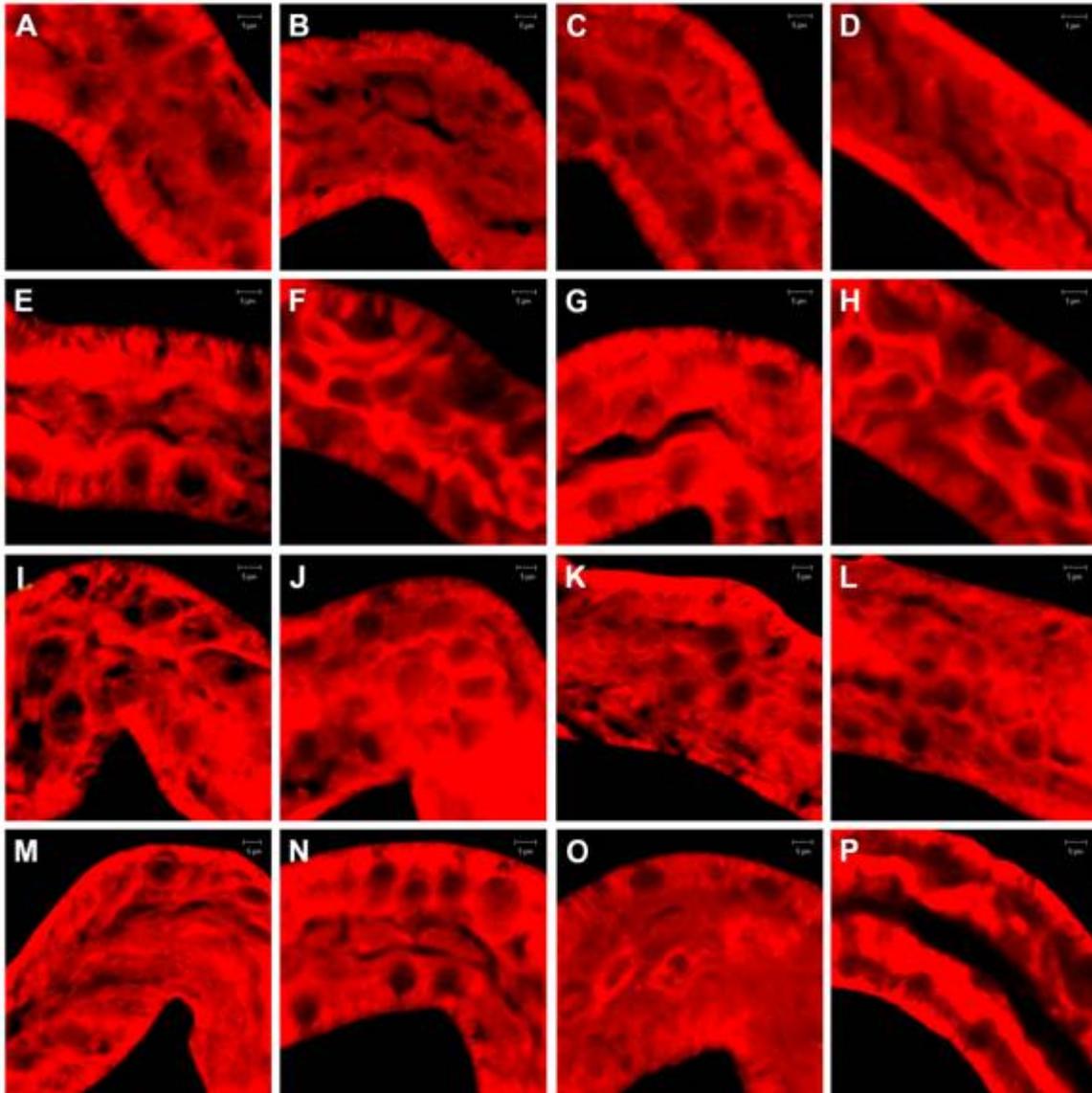
ANGII+losartan (Images D, H, L and P).

In both preservation solutions (1hr), after drug treatment, images B, C and D (EC solution) and images F, G, and H (UW solution), the structure can be well observed, suggesting maintenance, despite drug treatment.

However, in preserved tubules in EC solution (24hrs), a F-actin cytoskeleton disorganization (I, J, K and L) was observed in all tubules of this time preservation, including control group (image I).

Nevertheless, the structure was better maintained in the preserved tubules UW 24hrs (N, O and P) than EC 24hrs (J, K and L).

In all preserved tubules, the actin cytoskeleton distribution was preferentially placed at the lumen of PCT, and was responsible for the brush border structure.



**FIGURE 3**

AT1 receptors and actin cytoskeleton together.

Representative images of several preserved isolated nonperfused PCTs submitted to immunohistochemical analysis for AT1 receptors with polyclonal primary anti-AngII AT1 receptor antibody, followed by secondary CY2-conjugated Affinipure donkey anti-rabbit IgG, and immunohistochemical analysis for F-actin cytoskeleton staining, after treatment with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate.

Control group: preserved tubules with no drug treatment: EC 1hr, UW 1hr, EC 24hrs, UW 24hrs (Images A, E, I and M respectively).

Treatments in the preserved tubules in EC 1hr, UW 1hr, EC 24hrs and UW 24hrs respectively: ANGII (Images B, F, J and N); losartan (Images C, G, K and O); ANGII+losartan (Images D, H, L and P).

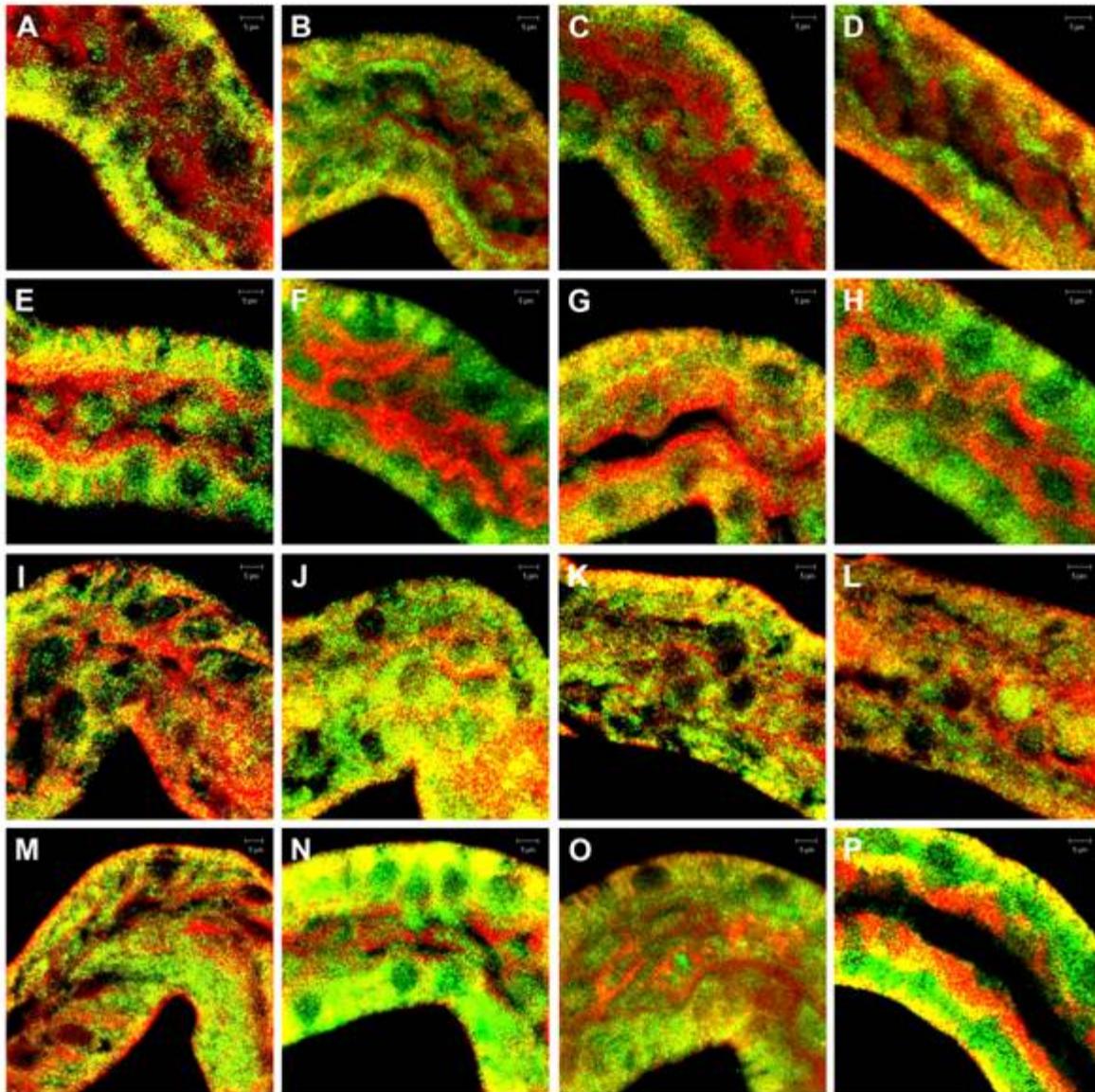


FIGURE 4 – Graph 1

Physiological data:  $J_v = (\text{nl.mim}^{-1}.\text{mm}^{-1})$ .

(\*) significance related to control.

(&) significance between preservation groups.

FIGURE 4: GRAPH 1

EFFECT OF ANGIOTENSIN II AND LOSARTAN ON FLUID ABSORPTION ON PRESERVED PCT  
( $J_v = (\text{nl.mim}^{-1}.\text{mm}^{-1})$ ).

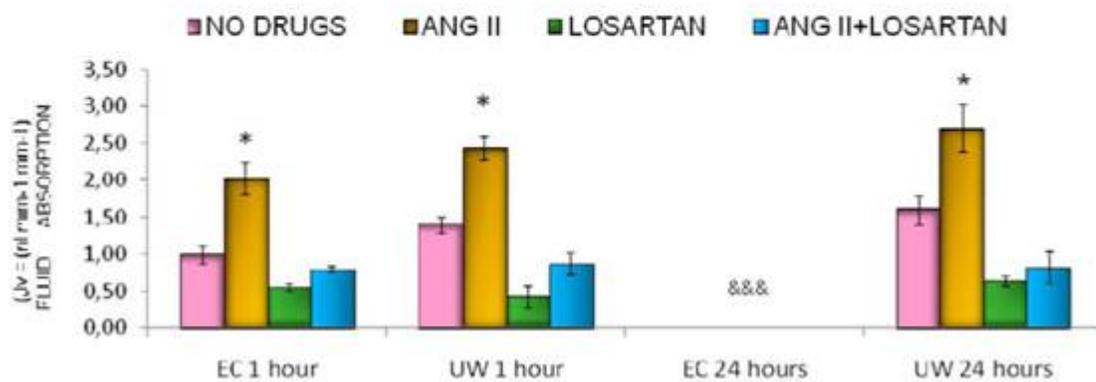


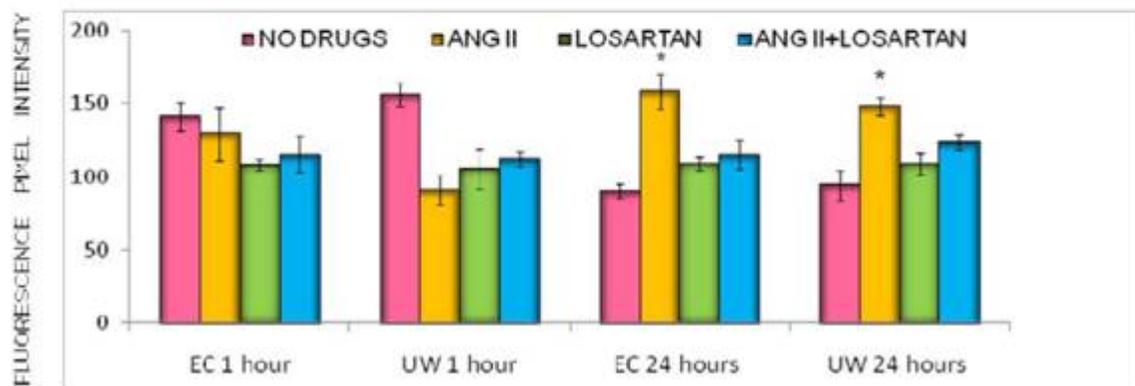
FIGURE 5: Graph 2

**Morphological data: fluorescence pixel intensity**

(\*) Significance related to control.

FIGURE 5. GRAPH 2

EFFECT OF ANGIOTENSIN II AND LOSARTAN ON AT1 RECEPTOR FLUORESCENCE PIXEL INTENSITY AVERAGE ON PRESERVED PCT



**TABLE I : Physiological data:  $J_v = (\text{nl.mim}^{-1}.\text{mm}^{-1})$ .**Effect of ANGII and losartan on fluid absorption ( $J_v$ ) on preserved PCT.

	<b>NO DRUGS (C)</b>	<b>ANGII</b>	<b>LOSARTAN</b>	<b>ANGII+LOSARTAN</b>
<b>EC 1 hr</b>	1.00±0.12 (n=7)	2.03±0.22 (n=7)	0.55±0.05 (n=6)	0.80±0.04 (n=5)
<b>UW 1 hr</b>	1.41±0.11 (n=6)	2.44±0.15 (n=4)	0.43±0.14 (n=4)	0.88±0.15 (n=5)
<b>EC 24 hrs</b>	$J_v \leq 0$	$J_v \leq 0$	$J_v \leq 0$	$J_v \leq 0$
<b>UW 24 hrs</b>	1.56±0.20 (n=7)	2.71±0.33 (n=7)	0.64±0.07 (n=4)	0.82±0.22 (n=4)

Analysis showed, in all preservation groups, except to EC 24hrs, an increase in  $J_v$  in the tubules treated with ANGII when compared with control group (C); And a decrease in  $J_v$  in tubules treated with losartan, and ANGII + losartan when compared with control group and with tubules treated with ANGII.

Tubules preserved for 24 hrs in EC solution showed results statistically different, highly significant when compared with all preservation groups.

Data reported as means  $\pm$  SEM for at least 4 PCTs per group, compared with control group (ANOVA), followed by multiple comparisons corrected with the Bonferroni adjustment;

**TABLE II: Morphological data:**

Effect of ANGII and losartan on AT1 receptor fluorescence pixel intensity average on preserved PCT.

	<b>NO DRUGS(C)</b>	<b>ANGII</b>	<b>LOSARTAN</b>	<b>ANGII+LOSARTAN</b>
<b>EC 1 hr</b>	141 ±10 (n=6)	129±8 (n=5)	108±5 (n=5)	115±10 (n=5)
<b>UW 1 hr</b>	156±18 (n=6)	91±10 (n=6)	105±12 (n=6)	112±6 (n=6)
<b>EC 24 hrs</b>	90±4 (n=4)	158±14 (n=5)	109±5 (n=5)	115±7 (n=10)
<b>UW 24 hrs</b>	94±12 (n=5)	148±5 (n=11)	109±10 (n=5)	123±5 (n=8)

Effect of ANGII and losartan on AT1 receptors demonstrated by pixel intensity on preserved rabbit PCTs, using polyclonal primary anti-AngII AT1 receptor antibody, followed by secondary CY2-conjugated Affinipure donkey anti-rabbit IgG.

Analysis showed that the preserved tubules 1 hr in both solutions, with no drug treatment, exhibited values of AT1 receptors fluorescence pixel intensity average higher than when ANGII or losartan or ANGII+losartan were applied; however, in EC solution these differences were not statistically significant, as in UW solution ( $p < 0.05$ ). Likewise, preserved tubules for 24 hrs in both solutions, treated with ANGII showed an increase in AT1 receptors fluorescence pixel intensity average

when compared to preserved tubules 24 hrs, with no drugs ( $p < 0.05$ ). These results suggest that AT1 receptors appear in high concentration in tubular membrane, even after cold preservation by solutions, and also in the absence and presence of ANGII and losartan.

## **4- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL**

---

Nesse trabalho, analisamos a capacidade de absorção de fluidos, a frequência de receptores AT1 de AII, e também o citoesqueleto de actina em túbulos proximais (P1-P2), conservados por períodos de tempo em soluções eletrolíticas a frio utilizadas em transplante renal (6, 7, 9, 15-17, 19, 20). Numa segunda etapa, estes túbulos conservados foram submetidos ao tratamento com AII e com losartan, verificando-se os mesmos parâmetros.

Os resultados obtidos mostraram que a conservação durante 1 hora, com as soluções de ECO e de UW foi semelhante. No entanto, quando a conservação foi prolongada para 24 horas, a solução de UW mostrou melhor desempenho. A própria hipotermia pode desencadear eventos lesivos para o tecido em conservação, como mostrado em diversos trabalhos (5, 6, 8, 10, 12). Porém, 24 horas de conservação a frio mostrou resultados diferentes entre as duas soluções, sendo melhores os resultados obtidos para conservação em UW. Na literatura, há relato de edema e deterioração do potencial transepitelial em células tubulares conservadas em ECO seguidas de aquecimento. O mesmo procedimento com solução de UW (aquecimento de UW de 22 a 37°C) não provocou danos celulares (147). Assim, a presença de ECO no interstício renal, durante a fase de reperusão (aquecimento), poderia contribuir, significativamente, para os danos no pós-transplante; inclusive poderia ser um dos motivos de queda de absorção de fluidos em nossos experimentos.

Em nossos experimentos, túbulos conservados em ECO e UW 24 horas apresentaram diminuição da média de intensidade de pixel de fluorescência de actina, no entanto só os conservados em ECO 24h, mostraram a distribuição da actina de modo desorganizado, coincidindo com pior desempenho de absorção de fluidos. A literatura tem mostrado que, durante a isquemia, pode haver perdas da estrutura basal, da polaridade da membrana celular e da integridade da célula epitelial, causando perda da função e da absorção de fluidos (52, 57, 58, 60, 66).

Após a conservação em ECO e UW 1h e em UW 24h, verificou-se que os resultados de Jv estavam dentro da normalidade e os microfilamentos de actina estavam organizados e com aparência similar aos encontrados em túbulos frescos, dando-nos indícios de que não houve comprometimento deste componente celular. Porém, os túbulos conservados em ECO 24h apresentaram alteração de citoesqueleto de actina, quando analisados por observação visual.

O citoesqueleto de actina é um mediador-chave para a transdução de força hidrodinâmica nas microvilosidades e está relacionado à alteração da densidade de NHE3, principal proteína envolvida na reabsorção de Na<sup>+</sup> nas células da membrana luminal (55, 63, 148, 149).

No transporte epitelial renal, o fluido move-se através das junções oclusivas (TJ) do espaço celular lateral e posterior do lúmen tubular com uma perda de soluto estimada entre 15 e 20%, a qual poderia ser aumentada em razão das alterações da membrana celular e das junções oclusivas, e também em razão da desorganização do citoesqueleto, eventos significativos que poderiam conduzir às perdas absorptivas (50, 52-54).

Os resultados de intensidade dos receptores AT1, em túbulos frescos (controle), estavam de acordo com resultados encontrados na literatura, com densidade e distribuição elevadas (98, 103-105). Em túbulos conservados 1 hora, os resultados de receptores eram semelhantes aos túbulos sem conservação (frescos), sendo que em UW houve um discreto aumento da intensidade desses receptores. Porém na conservação por 24 horas, em ambas as soluções, houve redução na intensidade de pixel, no entanto, somente túbulos conservados em ECO 24 horas apresentaram queda de absorção de fluidos.

A partir desses resultados adquiridos de túbulos frescos e conservados, sem estimulação ou inibição por drogas, fomos investigar o comportamento de túbulos conservados durante o tratamento, pelo lado basolateral (150), com AII (principal substância vasoativa para a homeostase da pressão arterial e hidro-salina, citocina pró-fibrinogênica e pró-inflamatória, quando ligada a receptores AT1) e com losartan (clássico antagonista não peptídico de AII, agindo por bloqueio ao receptor AT1) (72, 89, 111, 123).

Quando o tratamento com AII e com losartan foram testados, com exceção de ECO 24 horas, houve aumento significativo do J<sub>v</sub> na presença de AII e diminuição do J<sub>v</sub> com losartan, demonstrando que, mesmo com o tempo de conservação prolongado, as células tubulares foram capazes de responder ao estímulo da AII em dose picomolar, 10<sup>-12</sup> M (fisiológica) e ao seu bloqueio pelo losartan, 10<sup>-6</sup>M. A estimulação pela AII e

inibição pelo losartan em células tubulares frescas, não submetidas à conservação, era esperado, considerando dados da literatura consultada (131, 133-139). No entanto, em relação ao tecido conservado, a literatura é restrita de informações, existindo poucos trabalhos que avaliem *in vitro*, o comportamento desses tecidos. São encontrados estudos clínicos realizados no período pós-transplante que avaliam o paciente pela diurese, pela evolução da creatinina plasmática, pelo “clearance” de creatinina (24 h), por “clearances” de outros parâmetros com marcadores radioativos, ou por análises de tecidos obtidos através de biópsias.

Em nosso trabalho, o estudo do citoesqueleto de actina demonstrou que quando a AII foi administrada para túbulos conservados na solução de ECO 1 e 24 horas, houve queda nos resultados de intensidade de fluorescência em pixels. Entretanto, na análise visual, embora esta tenha limitações, notamos que a actina se concentra no lúmen tubular. No entanto, o tratamento com losartan, mesmo quando associado à AII não diminuiu a média de intensidade de pixel de fluorescência e, portanto, ao que parece não determinou alterações na agregação e desagregação da actina (56, 57). Na literatura, os dados sobre conservação de órgãos são escassos para estudos funcionais e celulares, e em especial sobre avaliações morfológicas de citoesqueleto de actina e de receptores AT1.

Os resultados de intensidade de pixel de receptores AT1 em túbulos conservados 24 horas em UW e tratados com AII estavam mais altos e significantes, quando comparados ao controle, e neste grupo, a absorção de fluidos também estava aumentada, o que poderia gerar discussão, pois aumento de  $J_v$  deveria significar internalização e reciclagem com provável diminuição dos receptores AT1 na membrana (109, 111, 118, 119). Entretanto, há dados na literatura onde é mostrado que, embora exista expressão de receptores AT1 em ambas as membranas do TCP, experimentos em tecidos não conservados mostram diferenças nas taxas de endocitose e de reciclagem dos receptores das membranas apical e basolateral, assim como outros dados da literatura mostram diferenças na seqüência dos aminoácidos das extremidades das cadeias envolvidas no desempenho destes receptores (95, 103, 106, 109, 111, 113-115, 117-119).

Dessa forma, a explicação para valores altos na média da intensidade do pixel de fluorescência de receptores AT1, nos túbulos conservados em UW 1h, sem tratamento com drogas, e nos conservados 24 horas tratados com a AII, em ambas as soluções, vai depender de maiores estudos, analisando outras proteínas envolvidas na absorção de fluidos, como por exemplo, a proteína NHE3, ou proteínas envolvidas na manutenção do citoesqueleto de actina, principal responsável pela fixação dos receptores em espaços específicos da membrana, ou ainda, de estudos com estes receptores, focados em sua internalização e reciclagem para a membrana (56, 57, 106, 109, 111, 118).

De acordo com dados recentes, em tecidos não conservados, receptores AT1 da membrana basolateral interagem com proteínas-G e inibem o acúmulo de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), aumentando o transporte do Na<sup>+</sup> sem internalizar, enquanto receptores AT1 da membrana apical submetem-se à internalização antes de interagir com proteínas-G e inibem o acúmulo de AMPC também, aumentando o transporte transcelular do Na<sup>+</sup> (111).

Estas variações de mecanismos poderiam explicar a densidade mais elevada de receptores AT1, no lado basolateral, em nossos experimentos, mesmo em presença de AII.

Em células de TCP cultivadas, os dados da literatura mostram que a administração de AII aumentou a expressão de receptores AT1 (151), entretanto, a administração sistêmica de AII *in vivo* aumentou a pressão arterial, mas não alterou a expressão renal de receptores AT1(152).

Em estudos usando modelos animais de transplante renal com rejeição aguda sem uso de imunossupressores, os transportadores NHE1, NKA e receptores AT1 ficaram inalterados; os níveis da proteína NHE3 e de seu mRNA estavam diminuídos; os níveis de NBC-1 estavam aumentados. Estes resultados favorecem uma redução na reabsorção de Na<sup>+</sup> e H<sub>2</sub>O, explicando a manutenção de receptores AT1 na membrana tubular, como encontrado nos nossos experimentos (153).

A absorção de fluidos diminuída com o losartan e AII+losartan, em túbulos frescos e conservados, com exceção dos túbulos mantidos em ECO 24h, estão de acordo com a literatura para tecidos normais, onde a administração endógena de bloqueadores de

AT1 inibe a absorção de fluidos no TCP. Isto mostra uma afinidade mais elevada do AT1 por losartan, documentando o papel desempenhado pelo AT1 situado na membrana basolateral do TCP na regulação do transporte (107, 124, 125).

Não obstante, a média da intensidade do pixel de fluorescência de AT1 está inalterada e similar ao grupo-controle (sem conservação e sem drogas), em túbulos tratados com o losartan e com o AII+losartan em todos os grupos de conservação, ECO e UW 1 e 24 horas. Estes dados estão de acordo com a literatura que mostra que o bloqueio feito pela ligação do losartan a aminoácidos específicos do AT1 impede a interação do ligante natural (AII) com receptores AT1. O complexo losartan+AT1 não internaliza, por isso a densidade do receptor na membrana não é afetada (107, 111, 124, 125).

Portanto, o losartan complexado ao receptor AT1, ao impedir a ligação de AII, indiretamente impede que AII seja internalizada e que exerça sua ação no tecido renal, impedindo também sua degradação nos lisossomos, o que deixaria AII livre em excesso, mas sem função estimulatória, e sugere-se uma possível ligação dessa AII aos receptores AT2, potencializando o efeito inibitório atribuído a estes receptores.

A ausência de internalização dos receptores AT1, quando ligados ao losartan, suporta a hipótese de que a ligação de AII ao receptor AT1 induz o receptor a uma mudança de conformação para favorecer a internalização (107, 124, 125).

A internalização dos receptores associados ao ligante é necessária para a reciclagem dos receptores, porém estudos *in vitro*, em tecido não conservado, demonstraram que os receptores AT1 que internalizam com AII, assim que retornam à membrana, estão incapacitados de interagir novamente com o ligante (AII), talvez por retornarem à membrana, desacoplados da proteína-G (106, 111, 124).

Em conjunto, nossos resultados são consistentes com a hipótese de que:

- As variações na absorção de fluidos, com estimulação pela AII e inibição pelo losartan em túbulos conservados, foram similares às encontradas em túbulos frescos;
- Em presença de AII + losartan, lado basolateral, há prevalência da ação do losartan, inibindo a resposta estimulatória de AII;

- Túbulos conservados em solução de ECO 24h, não apresentaram absorção de fluidos, apesar da presença inalterada de AT1 nas membranas;
- De uma maneira geral, todos os grupos experimentais apresentam densidade elevada de receptores AT1 e distribuição uniforme nas membranas tubulares;
- A solução de UW foi eficiente para a manutenção da função tubular e da estrutura do citoesqueleto na conservação por 24 horas, diferente da solução de ECO;
- O citoesqueleto de actina dos túbulos conservados na solução de ECO 24 horas apresentou alterações, o que favoreceria a hipótese da diminuição de fluidos por desfiguração estrutural da actina, embora esta observação se deva apenas à análise visual.

Dessa forma, nossos resultados indicam que, nas nossas condições experimentais, na conservação do túbulo renal, as diferenças entre as soluções e o tempo de conservação utilizado podem determinar alterações morfológicas na distribuição dos receptores AT1 e no citoesqueleto de actina, proteínas envolvidas e responsáveis pela absorção de fluido ( $J_v$ ) no túbulo proximal.

## **5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- 1- Van der Hoeven JA, Lindell S, van Schilfgaarde R, Molema G, Ter Horst GJ, Southard JH, et al. Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr. *Transplantation*. 2001 Nov 27;72(10):1632-6.
- 2- D'Alessandro AM, Odorico JS, Knechtle SJ, Becker YT, Hoffmann RM, Kalayoglu M, et al. Simultaneous pancreas-kidney (SPK) transplantation from controlled non-heart-beating donors (NHBDs). *Cell transplantation*. 2000 Nov-Dec;9(6):889-93.
- 3- van den Eijnden MM, Leuvenink HG, Ottens PJ, t Hart NA, van Oeveren W, Morariu AM, et al. Effect of brain death and non-heart-beating kidney donation on renal function and injury: an assessment in the isolated perfused rat kidney. *Exp Clin Transplant*. 2003 Dec;1(2):85-95.
- 4- Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RW, Najarian JS, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation*. 1995 Apr 15;59(7):962-8.
- 5- Quiroga I, McShane P, Koo DD, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Jun;21(6):1689-96.
- 6- Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JF, Russel FG, Groot H, Rauen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology*. 2003 Aug;47(1):82-91.
- 7- Hrabalova M, Bachleda P, Lubuska L, Kojecy Z, Zadrazil J, Krejci K, et al. Effect of various protective solutions on function after kidney transplantation. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2003 Dec;147(2):197-202.
- 8- Chandraker A. Ischemia-reperfusion injury in experimental models of organ transplantation. *Transplantation proceedings*. 1999 Aug;31(5):2073.
- 9- Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annual review of medicine*. 1995; 46:235-47.

- 10- Bryan CF, Luger AM, Martinez J, Muruve N, Nelson PW, Pierce GE, et al. Cold ischemia time: an independent predictor of increased HLA class I antibody production after rejection of a primary cadaveric renal allograft. *Transplantation*. 2001 Apr 15;71(7):875-9.
- 11- Gilligan BJ, Woo HM, Kosieradzki M, Torrealba JR, Southard JH, Mangino MJ. Prolonged hypothermia causes primary nonfunction in preserved canine renal allografts due to humoral rejection. *Am J Transplant*. 2004 Aug;4(8):1266-73.
- 12- Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007 May 27;83(10):1289-98.
- 13- Tandon V, Botha JF, Banks J, Pontin AR, Pascoe MD, Kahn D. A tale of two kidneys-- how long can a kidney transplant wait? *Clinical transplantation*. 2000 Jun;14(3):189-92.
- 14- Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *The American journal of physiology*. 1998 Jan;274(1 Pt 2):F79-90.
- 15- Ahmad N, Hostert L, Pratt JR, Billar KJ, Potts DJ, Lodge JP. A pathophysiologic study of the kidney tubule to optimize organ preservation solutions. *Kidney international*. 2004 Jul;66(1):77-90.
- 16- de Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, van der Velde O, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int*. 1999;12(6):447-53.
- 17- Figueiredo JF, Falkenstein D, Draibe SA, Sigulem D, Ramos OL. The effect of Collins' solution on the function and structure of isolated proximal convoluted tubules from rabbit kidneys. *Transplantation*. 1986 Jul;42(1):80-3.
- 18- Janssen H, Janssen PH, Broelsch CE. Value of energy substrates in HTK and UW to protect human liver endothelial cells against ischemia and reperfusion injury. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung*. 2004 Jan-Feb;36(1):26-32.

- 19- Ko W, Zelano JA, Lazenby WD, Isom OW, Krieger KH. Compositional analysis of a modified University of Wisconsin solution for extended myocardial preservation. A study of the left ventricular pressure-volume relation. *Circulation*. 1992 Nov; 86(5 Suppl):II326-32.
- 20- Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL, et al. Important components of the UW solution. *Transplantation*. 1990 Feb; 49(2):251-7.
- 21- Collins GM, Barry JM, Maxwell JG, Sampson D, Vander Werf BA. The value of magnesium in flush solutions for human cadaveric kidney preservation. *The Journal of urology*. 1984 Feb;131(2):220-2.
- 22- Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, Fukuda Y, Dohi K. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation*. 1991 Mar;51(3):589-93.
- 23- Mees N, Southard JH, Belzer FO. Inhibition of ischemic induced cellular swelling in kidney cortex tissue by lactobionate anions. *The Journal of trauma*. 1982 Feb;22(2):118-20.
- 24- Sumimoto R, Jamieson NV, Kamada N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplantation*. 1990 Oct;50(4):573-6.
- 25- Schlumpf R, Morel P, Loveras JJ, Condie RM, Matas A, Kurle J, et al. Examination of the role of the colloids hydroxyethylstarch, dextran, human albumin, and plasma proteins in a modified UW solution. *Transplantation proceedings*. 1991 Oct;23(5):2362-5.
- 26- Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *The Journal of clinical investigation*. 1987 Jun;79(6):1564-70.

- 27- Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1984 Oct;74(4):1156-64.
- 28- Polyak MM, Arrington BO, Kapur S, Stubenbord WT, Kinkhabwala M. Glutathione supplementation during cold ischemia does not confer early functional advantage in renal transplantation. *Transplantation*. 2000 Jul 15;70(1):202-5.
- 29- Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1998 Mar;29(3):705-18.
- 30- Sasaki S, Yasuda K, McCully JD, LoCicero J, 3rd. Calcium channel blocker enhances lung preservation. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Feb;18(2):127-32.
- 31- Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Seminars in nephrology*. 1998 Sep;18(5):490-7.
- 32- Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney international*. 1993 May;43(5):1160-78.
- 33- Culic O, Sabolic I, Zanic-Grubisic T. The stepwise hydrolysis of adenine nucleotides by ectoenzymes of rat renal brush-border membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 1990 Nov 30;1030(1):143-51.
- 34- Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2006 Jan;15(1):72-7.
- 35- Ito H, Kasagi N, Shomori K, Osaki M, Adachi H. Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling. *Transplantation*. 1995 Oct 27;60(8):794-8.
- 36- Ortiz A. Nephrology forum: apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney international*. 2000 Jul;58(1):467-85.
- 37- Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, et al. Molecular executors of cell death--differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation*. 1996 Dec 27;62(12):1860-6.

- 38- Clement MV, Legros-Maida S, Israel-Biet D, Carnot F, Soulie A, Reynaud P, et al. Perforin and granzyme B expression is associated with severe acute rejection. Evidence for in situ localization in alveolar lymphocytes of lung-transplanted patients. *Transplantation*. 1994 Feb;57(3):322-6.
- 39- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
- 40- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.
- 41- Sasaki H, Matsuno T, Nakagawa K, Tanaka N. Induction of apoptosis during the early phase of reperfusion after rat liver ischemia. *Acta Med Okayama*. 1997;51(6):305-12.
- 42- Benítez-Bribiesca L, Gómez-Camarillo M, Castellanos- Juárez E, Mravko E, Sánchez-Suárez P. Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia. *Ann NY Acad Sci*. 2000;926:165-79.
- 43- Cattell V. Nitric oxide and glomerulonephritis. *Seminars in nephrology*. 1999 May;19(3):277-87.
- 44- Nath AK, Madri JA. The roles of nitric oxide in murine cardiovascular development. *Developmental biology*. 2006 Apr 1;292(1):25-33.
- 45- Becker BN, Harris RC. A potential mechanism for proximal tubule angiotensin II-mediated sodium flux associated with receptor-mediated endocytosis and arachidonic acid release. *Kidney Int Suppl*. 1996 Dec;57:S66-72.
- 46- Slimane MA, Ferlicot S, Conti M, Droupy S, Cosson C, Paradis V, et al. Expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin E synthase after renal ischemia-reperfusion. *Transplantation proceedings*. 2002 Nov;34(7):2841-2.
- 47- Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney international*. 1997;51(5):201-7.

- 48- Shoskes AD, Parfrey NA, Halloran PF. Increased major histocompatibility complex xantigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation*. 1990;49(1):201-7.
- 49- Bacallao R, Fine LG. Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: from nephrogenesis to regeneration. *The American journal of physiology*. 1989 Dec;257(6 Pt 2):F913-24.
- 50- Cantiello HF. Role of actin filament organization in cell volume and ion channel regulation. *The Journal of experimental zoology*. 1997 Dec 1;279(5):425-35.
- 51- Kennedy CR, Burns KD. Angiotensin II as a mediator of renal tubular transport. *Contributions to nephrology*. 2001(135):47-62.
- 52- Kellerman PS, Clark RA, Hoilien CA, Linas SL, Molitoris BA. Role of microfilaments in maintenance of proximal tubule structural and functional integrity. *The Journal of experimental zoology*. 1997;279:425-35.
- 53- Rogers SL, Gelfand VI. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr Biol*. 1998 Jan 29;8(3):161-4.
- 54- Szaszi K, Grinstein S, Orłowski J, Kapus A. Regulation of the epithelial Na(+)/H(+) exchanger isoform by the cytoskeleton. *Cell Physiol Biochem*. 2000;10(5-6):265-72.
- 55- Watts BA, 3rd, George T, Good DW. The basolateral NHE1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulates transepithelial HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption through actin cytoskeleton remodeling in renal thick ascending limb. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Mar 25;280(12):11439-47.
- 56- Atkinson SJ, Hosford MA, Molitoris BA. Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Feb 13; 279(7):5194-9.
- 57- Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):453-65.

- 58- Coux G, Trumper L, Elias MM. Renal function and cortical (Na<sup>+</sup>)+K<sup>+</sup>)-ATPase activity, abundance and distribution after ischaemia-reperfusion in rats. *Biochimica et biophysica acta*. 2002 Jan 2;1586(1):71-80.
- 59- Figueiredo JF, Falkenstein D, Santo LE, Martinez T, Ribeiro RC, Moura LA, et al. Release of lactate dehydrogenase activity by rabbit renal cortex slices during storage in solutions used for kidney transplantation. *Brazilian journal of medical and biological research*. 1986;19(2):303-9.
- 60- Molitoris BA, Falk SA, Dahl RH. Ischemia-induced loss of epithelial polarity. Role of the tight junction. *The Journal of clinical investigation*. 1989 Oct;84(4):1334-9.
- 61- Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney international*. 2002 Nov;62(5):1539-49.
- 62- Wagner MC, Molitoris BA. ATP depletion alters myosin I beta cellular location in LLC-PK1 cells. *The American journal of physiology*. 1997 May;272(5 Pt 1):C1680-90.
- 63- Molitoris BA, Geerdes A, McIntosh JR. Dissociation and redistribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular ATP depletion. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Aug;88(2):462-9.
- 64- Kellerman PS, Bogusky RT. Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney international*. 1992 Oct;42(4):896-902.
- 65- Low SH, Miura M, Roche PA, Valdez AC, Mostov KE, Weimbs T. Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity. *Molecular biology of the cell*. 2000 Sep;11(9):3045-60.
- 66- Molitoris BA. Putting the actin cytoskeleton into perspective: pathophysiology of ischemic alterations. *American journal of physiology*. 1997;272:F430-F3.
- 67- Ashworth SL, Sandoval RM, Hosford M, Bamburg JR, Molitoris BA. Ischemic injury induces ADF relocalization to the apical domain of rat proximal tubule cells. *American journal of physiology*. 2001 May;280(5):F886-94.

- 68- Ashworth SL, Wean SE, Campos SB, Temm-Grove CJ, Southgate EL, Vrhovski B, et al. Renal ischemia induces tropomyosin dissociation-destabilizing microvilli microfilaments. *American journal of physiology*. 2004 May;286(5):F988-96.
- 69- Toback FG. Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney international*. 1992 Jan;41(1):226-46.
- 70- Lewers DT, Mathew TH, Maher JF, Schreiner GE. Long-term follow-up of renal function and histology after acute tubular necrosis. *Annals of internal medicine*. 1970 Oct;73(4):523-9.
- 71- Yarden Y, Ullrich A. Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry*. 1988 May 3;27(9):3113-9.
- 72- Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine reviews*. 2003 Jun;24(3):261-71.
- 73- Taugner R, Hackenthal E, Inagami T, Nobiling R, Poulsen K. Vascular and tubular renin in the kidneys of mice. *Histochemistry*. 1982;75(4):473-84.
- 74- Harris PJ, Hiranyachattada S, Antoine AM, Walker L, Reilly AM, Eitle E. Regulation of renal tubular sodium transport by angiotensin II and atrial natriuretic factor. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 1996;3:S112-8.
- 75- Ren Y, Liu R, Carretero OA, Garvin JL. Increased intracellular Ca<sup>++</sup> in the macula densa regulates tubuloglomerular feedback. *Kidney international*. 2003 Oct;64(4):1348-55.
- 76- Rosivall L, Narkates AJ, Oparil S, Navar LG. De novo intrarenal formation of angiotensin II during control and enhanced renin secretion. *The American journal of physiology*. 1987 Jun;252(6 Pt 2):F1118-23.
- 77- Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature*. 1987 Apr 16-22;326(6114):697-8.

- 78- Touyz RM, Schiffrin EL. Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin II-mediated calcium hyper-responsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1997 Dec;15(12 Pt 1):1431-9.
- 79- Navar LG, Imig JD, Zou L, Wang CT. Intrarenal production of angiotensin II. *Seminars in nephrology*. 1997 Sep;17(5):412-22.
- 80- Burns KD. The emerging role of angiotensin-converting enzyme-2 in the kidney. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2007 Mar;16(2):116-21.
- 81- Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2 Pt 2):316-22.
- 82- Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiological reviews*. 1996 Apr;76(2):425-536.
- 83- Navar LG, Lewis L, Hymel A, Braam B, Mitchell KD. Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *J Am Soc Nephrol*. 1994 Oct;5(4):1153-8.
- 84- Seikaly MG, Arant BS, Jr., Seney FD, Jr. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1990 Oct;86(4):1352-7.
- 85- Burns KD, Li N. The role of angiotensin II-stimulated renal tubular transport in hypertension. *Current hypertension reports*. 2003 Apr;5(2):165-71.
- 86- Mitchell KD, Mullins JJ. Enhanced tubuloglomerular feedback in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with inducible ANG II-dependent malignant hypertension. *American journal of physiology*. 2005 Dec;289(6):F1210-6.
- 87- Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron*. 2003 Jan;93(1):P3-13.

- 88- Mai M, Hilgers KF, Geiger H. Experimental studies on the role of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in hypertensive nephrosclerosis. *Hypertension*. 1996 Dec;28(6):973-9.
- 89- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*. 2001 Dec 1;38(6):1382-7.
- 90- Lagranha CJ, Fiorino P, Casarini DE, Schaan BA, Irigoyen MC. Bases Moleculares da Glomerulopatia Diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007;51(6):901-12.
- 91- Teles CPS, Tavares Filho SC, Sousa ACS, Barreto-Filho JAS. Hipertensão: um estado pró-trombótico. *Rev Bras Hipertens*. 2007;14(4):245-51.
- 92- Santos RAS, Sampaio WO. Sistema renina-angiotensina: Aspectos fisiopatológicos. *Hipertensão*. 2002;5(2):52-8.
- 93- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory peptides*. 2000 Jul 28;91(1-3):45-62.
- 94- Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Dec;289(6):H2281-90.
- 95- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*. 2000 Sep;52(3):415-72.
- 96- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, et al. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl*. 1996 Dec;14(5):S95-103.
- 97- Linas SL. Role of receptor mediated endocytosis in proximal tubule epithelial function. *Kidney Int Suppl*. 1997 Oct;61:S18-21.
- 98- Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW, Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *The American journal of physiology*. 1999 Sep;277(3 Pt 2):F437-46.

- 99- Schelling JR, Linas SL. Angiotensin II-dependent proximal tubule sodium transport requires receptor-mediated endocytosis. *The American journal of physiology*. 1994 Mar;266(3 Pt 1):C669-75.
- 100- Carey RM, Jin X, Wang Z, Siragy HM. Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT2) angiotensin receptor. *Acta physiologica Scandinavica*. 2000 Jan;168(1):65-71.
- 101- Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000 Jan; 35(1 Pt 2):155-63.
- 102- Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regulatory peptides*. 1999 May 31;81(1-3):1-10.
- 103- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*. 2000 Jan;13(1 Pt 2):31S-8S.
- 104- Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, el-Dahr SS. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *The American journal of physiology*. 1997 Jul; 273(1 Pt 2):F170-7.
- 105- Paxton WG, Runge M, Horaist C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. *The American journal of physiology*. 1993 Jun;264(6 Pt 2):F989-95.
- 106- Hunyady L, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ. Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 1994 Oct 7;269(40):24798-804.
- 107- Hunyady L, Vauquelin G, Vanderheyden P. Agonist induction and conformational selection during activation of a G-protein-coupled receptor. *Trends in pharmacological sciences*. 2003 Feb;24(2):81-6.

- 108- Perez DM, Karnik SS. Multiple Signaling States of G-Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol Rev.* 2005;57:147-61.
- 109- Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews.* 2001 Mar; 53(1):1-24.
- 110- Voltz JW, Brush M, Sikes S, Steplock D, Weinman EJ, Shenolikar S. Phosphorylation of PDZ1 domain attenuates NHERF-1 binding to cellular targets. *The Journal of biological chemistry.* 2007 Nov 16;282(46):33879-87.
- 111- Thekkumkara T, Linas SL. Role of internalization in AT(1A) receptor function in proximal tubule epithelium. *American journal of physiology.* 2002 Apr;282(4):F623-9.
- 112- Futter CE, Gibson A, Allchin EH, Maxwell S, Ruddock LJ, Odorizzi G, et al. In polarized MDCK cells basolateral vesicles arise from clathrin-gamma-adaptin-coated domains on endosomal tubules. *The Journal of cell biology.* 1998 May 4;141(3):611-23.
- 113- Becker BN, Cheng HF, Hammond TG, Harris RC. The type 1 angiotensin II receptor tail affects receptor targeting, internalization, and membrane fusion properties. *Molecular pharmacology.* 2004 Feb;65(2):362-9.
- 114- Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ. Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *The Journal of biological chemistry.* 1994 Dec 16;269(50):31378-82.
- 115 - Hunyady L, Ji H, Jagadeesh G, Zhang M, Gaborik Z, Mihalik B, et al. Dependence of AT1 angiotensin receptor function on adjacent asparagine residues in the seventh transmembrane helix. *Molecular pharmacology.* 1998 Aug;54(2):427-34.
- 116- Monnot C, Bihoreau C, Conchon S, Curnow KM, Corvol P, Clauser E. Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. *The Journal of biological chemistry.* 1996 Jan 19;271(3):1507-13.

- 117- Thomas WG, Baker KM, Motel TJ, Thekkumkara TJ. Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic face of a putative amphipathic helix. *The Journal of biological chemistry*. 1995 Sep 22;270(38):22153-9.
- 118- Becker BN, Kondo S, Chen JK, Harris RC. Tyrosine kinase inhibition affects type 1 angiotensin II receptor internalization. *Journal of receptor and signal transduction research*. 1999 Nov;19(6):975-93.
- 119- Gaborik Z, Szaszak M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt KJ, et al. Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Molecular pharmacology*. 2001 Feb;59(2):239-47.
- 120- Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Sep 16;100(19):10782-7.
- 121- Gonzalez-Villalobos R, Klassen BR, Patricia L. Allen PL, Navar LG, Hammond TG. Megalin binds and internalizes angiotensin II. *American journal of physiology*. 2005;288:F420-27.
- 122- Vane JR. The history of inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J Physiol Pharmacol*. 1999 Dec;50(4):489-98.
- 123- Ellis ML, Patterson JH. A new class of antihypertensive therapy: angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacotherapy*. 1996 Sep-Oct;16(5):849-60.
- 124- Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gaborik Z. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regulatory peptides*. 2000 Jul 28;91(1-3):29-44.
- 125- Manohar P, Pina IL. Therapeutic role of angiotensin II receptor blockers in the treatment of heart failure. *Mayo Clinic proceedings*. 2003 Mar;78(3):334-8.
- 126- Oparil S, Silfani TN, Walker JF. Role of angiotensin receptor blockers as monotherapy in reaching blood pressure goals. *Am J Hypertens*. 2005 Feb;18(2 Pt 1):287-94.

- 127- Schmidt B, Schieffer B. Angiotensin II AT1 receptor antagonists. Clinical implications of active metabolites. *Journal of medicinal chemistry*. 2003 Jun 5;46(12):2261-70.
- 128- Mire DE, Silfani TN, Pugsley MK. A review of the structural and functional features of olmesartan medoxomil, an angiotensin receptor blocker. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005 Nov;46(5):585-93.
- 129- Miura S, Saku K. Do all angiotensin II type 1 receptor blockers have the same beneficial effects? *British journal of pharmacology*. 2007 Aug;151(7):912-3.
- 130- Cheng H, Harris RC. Potential side effects of renin inhibitors--mechanisms based on comparison with other renin-angiotensin blockers. *Expert opinion on drug safety*. 2006 Sep;5(5):631-41.
- 131- Harris PJ, Young JA. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflugers Arch*. 1977 Jan 17;367(3):295-7.
- 132- Wang T, Chan YL. The role of phosphoinositide turnover in mediating the biphasic effect of angiotensin II on renal tubular transport. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1991 Jan;256(1):309-17.
- 133- Bharatula M, Hussain T, Lokhandwala MF. Angiotensin II AT1 receptor/signaling mechanisms in the biphasic effect of the peptide on proximal tubular Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Clin Exp Hypertens*. 1998 May;20(4):465-80.
- 134- Han HJ, Park SH, Koh HJ, Taub M. Mechanism of regulation of Na<sup>+</sup> transport by angiotensin II in primary renal cells. *Kidney international*. 2000 Jun;57(6):2457-67.
- 135- Robey RB, Ruiz OS, Espiritu DJ, Ibanez VC, Kear FT, Noboa OA, et al. Angiotensin II stimulation of renal epithelial cell Na/HCO<sub>3</sub> cotransport activity: a central role for Src family kinase/classic MAPK pathway coupling. *The Journal of membrane biology*. 2002 May 15;187(2):135-45.

- 136- Geibel J, Giebisch G, Boron WF. Angiotensin II stimulates both Na(+)-H+ exchange and Na+/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in the rabbit proximal tubule. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1990 Oct;87(20):7917-20.
- 137- Harris PJ. Regulation of proximal tubule function by angiotensin. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1992 Apr;19(4):213-22.
- 138- Schuster VL, Kokko JP, Jacobson HR. Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. The Journal of clinical investigation. 1984 Feb;73(2):507-15.
- 139- Liu FY, Cogan MG. Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. The Journal of clinical investigation. 1989 Jul;84(1):83-91.
- 140- Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdos EG. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1988 Dec;59(6):789-97.
- 141- Becker BN, Cheng HF, Harris RC. Apical ANG II-stimulated PLA<sub>2</sub> activity and Na<sup>+</sup> flux: a potential role for Ca<sup>2+</sup>-independent PLA<sub>2</sub>. The American journal of physiology. 1997 Oct;273(4 Pt 2):F554-62.
- 142- Bouby N, Hus-Citharel A, Marchetti J, Bankir L, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. J Am Soc Nephrol. 1997 Nov;8(11):1658-67.
- 143- Liu FY, Cogan MG. Role of protein kinase C in proximal bicarbonate absorption and angiotensin signaling. The American journal of physiology. 1990 Apr;258(4 Pt 2):F927-33.
- 144- Soleimani M, Burnham CE. Physiologic and molecular aspects of the Na<sup>+</sup>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in health and disease processes. Kidney international. 2000 Feb;57(2):371-84.

- 145- Quan A, Baum M. The renal nerve is required for regulation of proximal tubule transport by intraluminally produced ANG II. *American journal of physiology*. 2001 Mar;280(3):F524-9.
- 146- Quan A, Baum M. Renal nerve stimulation augments effect of intraluminal angiotensin II on proximal tubule transport. *American journal of physiology*. 2002 Jun;282(6):F1043-8.
- 147- You Y, Hirsch DJ, Morgunov NS. Functional integrity of proximal tubule cells: effects of temperature and preservation solutions. *J Am Soc Nephrol*. 1993 Jun;3(12):1900-12.
- 148- Szaszi K, Kurashima K, Kaibuchi K, Grinstein S, Orłowski J. Role of the cytoskeleton in mediating cAMP-dependent protein kinase inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Nov 2;276(44):40761-8.
- 149- Weinman EJ, Evangelista CM, Steplock D, Liu MZ, Shenolikar S, Bernardo A. Essential role for NHERF in cAMP-mediated inhibition of the Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> co-transporter in BSC-1 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Nov 9;276(45):42339-46.
- 150- Silva LA, Bertels IM, Paula FS, Falkenstein D, Figueiredo JF. The effect of Collin's, Euro-Collin's, and University of Wisconsin solutions on the function of isolated proximal straight tubules. *Transplantation proceedings*. 2002 Jun;34(4):1108-10.
- 151- Cheng HF, Becker BN, Burns KD, Harris RC. Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *The Journal of clinical investigation*. 1995 May;95(5):2012-9.
- 152- Harrison-Bernard LM, Zhuo J, Kobori H, Ohishi M, Navar LG. Intrarenal AT(1) receptor and ACE binding in ANG II-induced hypertensive rats. *American journal of physiology*. 2002 Jan;282(1):F19-25.
- 153- Velic A, Hirsch JR, Bartel J, Thomas R, Schroter R, Stegemann H, et al. Renal transplantation modulates expression and function of receptors and transporters of rat proximal tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Apr;15(4):967-77.

## **6- APÊNDICES**

---



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 804-1, sobre "AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FUNCIONAIS E MORFOLÓGICOS DA AÇÃO DA ANGIOTENSINA II SOBRE TUBULOS PROXIMAIS ISOLADOS DE COELHO" sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Francisco Figueiredo / Ivone Medeiros Vieira Bertels está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 06 de abril de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 804-1, entitled "THE ACTION OF 10<sup>-12</sup> ANGIOTENSIN OVER PRESERVED TUBULES", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on April 6, 2005.

Campinas, 06 de abril de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

## 6.1- Tabelas

### 6.1.1- Tabela 1

#### Solução de conservação Euro – Collins

(Adicionado-se apenas glicose. Sem os demais aditivos)

Constituintes em 1 Litro		Funções
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> (mM)	10	Tampão
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (mM)	15	K: previne perdas intracelulares de K <sup>+</sup> ; Fosfato: para tamponamento
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> (mM)	40	K: previne perdas intracelulares de K <sup>+</sup> ; Fosfato: para tamponamento
<b>KCl</b> (mM)	15	K: previne perdas intracelulares de K <sup>+</sup> Cloreto: faz manutenção do equilíbrio químico entre outros cátions e tampão com bicarbonato
<b>Glicose</b> (mM)	139	Impermeante não eletrolítico: diminui edema celular
<b>Osmolaridade</b> mOsm/KgH <sub>2</sub> O	320	Equilíbrio osmótico entre os compartimentos
pH	7,0	Acertar com HCl 1.2N ou NaOH 1N

## 6.1.2- Tabela 2

**Solução de conservação Belzer (UW): Dupont & CO. (sem aditivos)**

<b>Constituintes para 1 Litro</b>		<b>Funções</b>
<b>NaOH</b> (mM)	27	Fornece ingredientes para tampão
<b>KOH</b> (mM)	100	K <sup>+</sup> previne perdas intracelulares; OH <sup>-</sup> neutraliza ácido lactobiônico
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (mM)	25	Fornece K <sup>+</sup> para perdas intracelulares; Fosfato para tampão
<b>MgSO<sub>4</sub></b> (mM)	5	Mantém Mg <sup>2+</sup> intracelular: estabiliza a membrana; SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -tampão
<b>Ac.lactobiônico</b> (g) p/ formar lactobionato de K <sup>+</sup>	35.83	Impermeante: previne edema celular; tampão; Quela Ca <sup>2+</sup> / Fe <sup>2+</sup>
<b>Rafinose</b> (mM)	30	Impermeante não-eletrolítico: inibe edema celular; Suporte oncótico
<b>Alopurinol</b> (mM)	1	Inibe xantina-oxidase (neutraliza radicais livres)
<b>Adenosina</b> (mM)	5	Fornece substrato para síntese ATP
<b>Glutathiona</b> (mM)	3	Mantém integridade membrana; Seqüestra radicais livres
<b>HEA (amido)</b> (g)	50	Colóide, minimiza o edema intersticial
<b>Osmolaridade</b> mOsm/KgH <sub>2</sub> O	335	Equilíbrio osmótico entre os compartimentos
<b>pH</b>	7,4	20°C

## Aditivos Propostos

Usados em transplantes clínicos com a intenção de melhorar o pós-transplante, diminuindo os danos ocorridos na reperfusão.

---

<b>Penicilina</b>	40U	Antibacteriano
<b>Insulina U</b>	100	Geração energia
	8	Induz síntese lipocortina (inibe PLA <sub>2</sub> →AA:
<b>Dexametasona mg</b>		diminuição de ciclooxigenases (síntese prostaglandinas) e lipoxigenases (síntese leucotrienos)

---