
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**Disfunção Renal Induzida por Modelo
Polimicrobiano de Sepsis: Avaliação de
Componentes do Sistema Renina-Angiotensina**

Lúcio Ricardo Leite Diniz

BELO HORIZONTE

Fev/ 2011

Lúcio Ricardo Leite Diniz

**Disfunção Renal Induzida por Modelo
Polimicrobiano de Sepsis: Avaliação de
Componentes do Sistema Renina-Angiotensina**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requerimento para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira

BELO HORIZONTE

Fev/2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Maria Aparecida Ribeiro Vieira, pela paciência, ensinamentos, disponibilidade e confiança ao longo desses anos.

Aos profs. Robson Augusto Sousa dos Santos, Geovanni Dantas Cassali, Marcelo Vidigal Caliari, Mauro Texeira Martins, Jamil Assurey, Adelina Martha dos Reis, Maria Aparecida Gomes e Anderson Myoshi por colaborarem com seus conhecimentos e disponibilizarem materiais e serviços de seus respectivos laboratórios, sendo de fundamental importância nos trabalhos realizados durante o doutorado.

Aos professores e funcionários do departamento de Fisiologia e Biofísica e Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, em especial a Celinha e Adelaide pela indispensável ajuda dos seus serviços.

Aos colegas Conrado, Karine e Marilene pela imprescindível ajuda para execução de experimentos desse trabalho.

Aos colegas do departamento de Fisiologia e Biofísica, pela excelente convivência em grupo.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Renal: Ana Paula, Lílian Fernanda, Gustavo Consenza, Flavinha, Carol, Arthur e Rose pelo ótimo convívio e constante auxílio e carinho dentro e fora do laboratório.

À amiga Kátia Daniela pela indispensável ajuda na realização de trabalhos realizados durante o doutorado, mas principalmente pela amizade fiel e recíproca que sempre tivemos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À querida Vivi, por participar ativamente na realização desse trabalho e por dividir alegrias e angústia ao meu lado.

À família pelo constante apoio, confiança, compreensão e amor.

RESUMO

A sepse, uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica secundária à infecção, é a principal causa de injúria renal aguda (IRA). Uma intensa resposta inflamatória associada a distúrbios circulatórios como hipotensão sistêmica, danos vasculares e hiporreatividade a vasoconstritores estão envolvidos na patogênese da IRA promovida pela sepse. O sistema renina-angiotensina (SRA) está envolvido no controle de importantes eventos fisiológicos, tal como a regulação da pressão arterial, e na patogênese de doenças inflamatórias. Duas vias que se contra-regulam são encontradas no SRA. A via vasoconstritora clássica, formada pelo eixo ECA/Ang II/ receptor AT₁, e o bloqueio de sua atividade resultou em melhora de nefropatias decorrentes de diabetes, hipertensão e processos isquêmicos. A segunda via é formada pelo eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas, apresenta atividades vasodilatadora e antiinflamatória. Neste estudo, foi avaliada a participação de componentes do SRA na resposta inflamatória no tecido renal e na disfunção renal de ratos Wistar submetidos ao modelo polimicrobiano de sepse (grupo CLP) durante os períodos de 6, 12 e 24h pós-indução. Foi observada uma ativação dos eixos vasoconstritor e vasodilatador dos SRA no tecido renal de ratos sépticos, evidenciada pelo aumento da expressão renal do RNAm que codifica ECA e ECA 2, assim como do conteúdo renal de ang II e ang-(1-7). As relações da expressão renal ECA/ECA2 e do conteúdo renal de Ang II/Ang-(1-7) não tem diferença entre os grupos CLP e controle. Além disso, foi observada uma redução da densidade do receptor Mas no córtex e medula renal do grupo CLP. O tratamento com ang-(1-7) reduziu as concentrações renais de TNF- α , IL-6, a infiltração de neutrófilos, a poliúria, a redução do RFG e a presença de microalbuminúria observadas em animais sépticos não tratados. Alguns desses efeitos renoprotetores permaneceu por 7 dias após a administração única da Ang-(1-7). Em suma, verificamos que, assim como o eixo vasoconstritor, o eixo vasodilatador do SRA encontra-se ativado nas primeiras 24h da IRA promovida pela sepse e que a administração da ang-(1-7) teve um efeito renoprotetor, reduzindo parâmetros inflamatórios e de disfunção renal.

Palavra-Chaves – Sepse, sistema renina – angiotensina e disfunção renal

ABSTRACT

Sepsis, a systemic inflammatory response syndrome caused by infection, is the most predisposing factor for development of acute kidney injury (AKI). An intensive inflammatory response associated with circulatory disturbances characterized by hypotension, vascular damage and hyporesponsiveness to vasoconstrictors are important factors involved in the sepsis-induced AKI. The control of hemodynamic parameters, mainly blood pressure regulation, and the development of inflammatory cascade are some of the roles attributed to renin-angiotensin system (RAS). It has been reported two different axis in RAS. The first one, denominated vasoconstrictor axis, is formed by ACE - Ang II – AT1 receptor and its blocked shows renoprotector effect in renal disease promoted by hypertension, ischemia and diabetis. The second axis is composed by ACE2 - Ang - (1-7) - Mas receptor axis and produces a counter-regulatory activity, in majority of tissues, inducing opposite effects by which induced by vasoconstrictor axis. Therefore, the involvement of the counter-regulatory arm of RAS on sepsis-induced renal dysfunction and kidney inflammatory responses was evaluated 6, 12 and 24 h after Cecal Ligation and Puncture (CLP) surgery. The effects of exogenous Angiotensin-(1-7) were also investigated. Sepsis produces an increase in the components of the SRA two axis, as evidenced by increased renal expression of mRNA encoding ACE and ACE 2 as well as by increase of renal content of Ang II and Ang-(1-7). The ratios of renal expression ECA/ECA2 and renal content of Ang II / Ang - (1-7) were similar in the sham and CLP groups. A downregulation of the receptor in CLP animals, evidenced by a staining reduced intensity the cortex Mas receptor was also observed. Treatment with Ang-(1-7) reduced the renal concentrations of TNF- α , IL-6, infiltration of neutrophils, reduced urinary volume, increased clearance creatinine and decreased microalbuminuria when compared to untreated CLP animals. We have showed that renal protective effects produced by a single Ang-(1-7) administration still remained 7 days after treatment. In summary, we showed that the SRA counter-regulatory axis is activated in the sepsis-induced AKI and that the effects of administration of Ang-(1-7) exhibited anti-inflammatory and renal protective.

Keywords: Sepsis, Renin-Angiotensin System, Renal Dysfunction

LISTA DE ABREVIATURAS

A779	Antagonista do Receptor Mas da Angiotensina-(1-7)
Ang II	Angiotensina II
Ang – (1-7)	Angiotensina-(1-7)
ANOVA	Análise de Variância
AT ₁	Receptor Angiotensinérgico do Tipo 1
AT ₂	Receptor Angiotensinérgico do Tipo 2
ATPase	Enzima que hidrolisa a adenosina trifosfato
AVE 0991	Agonista do Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)
BSA	Albumina Sérica Bovina
C L P	Ligadura e Perfuração do Ceco
CARS -	Síndrome da Resposta Inflamatória Compensatória
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CH ₂ O	clearance de água livre
COsm	clearance osmolar
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EPM	Erro Padrão da Média

FEH ₂ O	fração de excreção de água
FEK ⁺	fração de excreção de potássio
FENa ⁺	fração de excreção de sódio
FSR	fluxo sanguíneo renal
FU	fluxo urinário
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio/Água Oxigenada
HCl	Ácido Clorídrico
HETAB	Brometo de Hexadecil-trimetil-amônio
i.p.	intraperitoneal
ICAM	Moléculas de Adesão do tipo intracelular
IL	Interleucina
IRA	Injúria Renal Aguda
LPS	Lipopolissacarídeos
Mas	Receptor da Angiotensina-(1-7) acoplado à proteína G
mBSA	Albumina Bovina Metilada
mmHg	milímetros de mercúrio
MODS	Síndrome da Insuficiência de Múltiplos Órgãos
MPO	Mieloperoxidase
MSF	Fluoreto de Fenilmetisulfonil
Na ₃ PO ₄	Fosfato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaF	Fluoreto de Sódio
NF-κβ	Fator de Transcrição Nuclear kapa B

NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂	Superóxido
OH	Radical Hidroxil
OPD	Di-hidroclorido de o-fenilenodiamino
PAF	Fator Ativador Plaquetário
PAM	Pressão Arterial Média
PBS	Tampão Fosfato Salino
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SIRS	Resposta Inflamatória Sistêmica
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral Beta
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VS	Versus

SUMÁRIO

	Paginas
1. INTRODUÇÃO	
<hr/>	
1.1 Definição e epidemiologia da sepse	16
1.2 Fisiopatologia da sepse	17
1.3 Modelo Animal de Sepse	20
1.4-Sepse e Injúria Renal Aguda	22
1.5-Sistema Renina – Angiotensina e Doenças Renais	24
1.6 Justificativa	27
3. OBJETIVOS	
<hr/>	
3.1 Objetivo Geral	30
.2 Objetivos Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	
<hr/>	
4.1 Grupos experimentais	
4.1.1 Modelo de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP)	32
4.2 Protocolos Experimentais	
4.2.1 – Protocolo experimental 1	34
4.2.2 –Protocolo Experimental 2	35
4.3- Métodos usados na caracterização da sepse	
4.3.1 Determinação do crescimento de bactérias no sangue e no lavado peritoneal	36
4.3.2 Mensuração e registro da pressão arterial média e frequência cardíaca.	37

4.3.3 Efeito da sepse sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta e artéria renal (Reatividade Vascular)

37

4.4 Métodos utilizados para avaliar a função renal

4.4.1-Dosagem de creatinina 39

4.4.2-Dosagem de sódio e potássio 40

4.4.3 Determinação das osmolalidades plasmática e urinária 41

4.4.4 Uréia Plasmática 41

4.4.5- Proteinúria 41

4.4.6-Microalbuminuria 42

4.5 Métodos utilizados para avaliar inflamação

4.5.1 Avaliação da migração de neutrófilos (MPO) 43

4.5.2 - Dosagem de citocinas 44

4.6 Métodos utilizados para avaliar a participação do SRA

4.6.1 - Avaliação da expressão renal do RNA mensageiro de componentes dos sistema renina-angiotensina 44

4.6.2 -Dosagem de peptídeos Angiotensin II e Angiotensina-(1-7) 47

4.6.3-Dosagem de Aldosterona e Vasopressina 52

4.6.4 Imunohistoquímica 52

4.7 Análise estatística 53

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da sepse

	12
5.1.1 Presença de bactérias no sangue e na cavidade peritoneal	56
5.1.2 Pressão arterial média e frequência cardíaca	57
5.1.3 Reatividade vascular	59
5.2 Caracterização do processo inflamatório e da disfunção renal induzida pela sepse	
5.2.1 Sepse e mediadores inflamatórios no tecido renal	60
5.2.2 Sepse e função renal	61
5.3 Sistemas renina-angiotensina na disfunção renal induzida pela sepse	
5.3.1 Via vasoconstritora do sistema renina-angiotensinas: ECA - Angiotensina II - receptor AT1	67
5.3.2 Via vasodilatadora do sistema renina-angiotensinas: ECA2 – Angiotensina(1-7) - receptor Mas	69
5.3.3 Angiotensina-(1-7) no tratamento da disfunção renal promovida pela sepse	74
6. DISCUSSÃO	82
<hr/>	
7. CONCLUSÃO	95
<hr/>	
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
<hr/>	
9. ANEXOS	110
<hr/>	

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 - Definição e epidemiologia da sepse

A sepse é definida como uma síndrome resposta inflamatória sistêmica (SRIS) decorrente de uma infecção (Annane *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2011). O processo infeccioso é causado principalmente por bactérias gram-positivas (30-50%), bactérias gram-negativas (25-30%) e infecções polimicrobianas (25%), além de fungos, vírus e parasitas (2-5%) (Martin *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2011). Em termos gerais, os sinais e sintomas da sepse podem evoluir progressivamente, iniciando com SRIS e culminando em choque séptico. A tabela abaixo ilustra alguns sintomas que caracterizam os termos utilizados na evolução do quadro clínico séptico, conforme definições estabelecidas na conferência de consenso de sepse em 1991 (Calandra *et al.*, 2005).

Tabela 1- Definições da sepse

Quadro clínico da sepse	Descrição dos sintomas
SRIS	Variação da temperatura corporal (hipo- ou hipertermia), taquipnéia, taquicardia, leucocitose ou leucopenia.
Sepse	SRIS decorrente de uma infecção por bactérias, vírus, fungos ou polimicrobiana
Sepse Grave	Sintomas da sepse associada a sinais de hipoperfusão e disfunção de órgãos
Choque Séptico	Sepse grave acrescido de uma acentuada hipotensão arterial e hiporresponsividade a ressuscitação volêmica e vasopressores. A evolução do quadro de choque séptico leva a disfunção de um ou mais órgãos (Síndrome da Falência Múltipla dos Órgãos), podendo levar o paciente a óbito

A sepse grave e choque séptico estão associados a taxas de mortalidade de 30 a 70% de pacientes que se encontram nas unidades de terapia intensiva (UTI), representando a principal causa de morte em UTI de adultos (Angus *et Wax*, 2001; Moore *et al.*, 2011) Em um estudo realizado em 198 UTIs de 24 países da Europa, foi verificado taxas de 32,2% e 54% de mortalidade em pacientes com sepse severa e choque séptico, respectivamente (Vincent *et al.*, 2006). Dados dos Estados Unidos indicam que ocorrem cerca de 500 mil casos de sepse por ano, atingindo uma taxa de mortalidade de, aproximadamente, 30% dos pacientes sépticos (Angus *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003). Dados sobre a incidência e mortalidade de pacientes com sepse no Brasil e demais países da América latina são escassos. As taxas de incidência e mortalidade de sepsis, nas UTIs brasileiras, estão entre as maiores do mundo. Dados do estudo da BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study) em 5 UTIs da região sul e sudeste do Brasil mostraram taxas de mortalidade de 33,9% dos pacientes com sepsis, 46,9% dos pacientes com sepsis severa e 53,2% de pacientes que apresentaram o quadro de choque séptico (Silva *et al.*, 2004). Recentemente, em um estudo com pacientes da UTI do hospital universitário de Londrina, Kauss *et al.* (2010) mostraram uma mortalidade variando de 32,8 a 72,2% em pacientes com sepse e choque séptico, respectivamente.

1.2– Fisiopatologia da sepse

Os diversos mecanismos adaptativos de defesa do hospedeiro para controlar a infecção são complexos e estão, ao mesmo tempo, envolvidos na fisiopatologia das manifestações clínicas dessa síndrome, dificultando assim a total compreensão dos eventos envolvidos na evolução da doença (Jean-Baptiste, 2007; Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011). Conforme ilustrado nas figuras abaixo (Fig. 1 e 2), os mecanismos que desencadeiam a resposta inflamatória sistêmica na sepse podem ser resumidos da seguinte forma: Após a exposição a um insulto infeccioso (toxinas, componentes da parede celular bacteriana, vírus ou fungos), há uma fase inicial caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, PAF), ativação dos sistemas de coagulação e complemento. Ao mesmo tempo, ocorrem recrutamento e ativação de células leucocitárias (neutrófilos, linfócitos, macrófagos entre outras), aumento da expressão de moléculas de adesão, de agentes vasoativos (endotelina,

vasopressina, angiotensina II, PGI₂, NO) e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (OH⁻, NO) (Cunha *et al.*, 1997; Cinel *et al.*, 2009, Cai *et al.*, 2010). Entre as principais conseqüências da ação conjunta desses mediadores inflamatórios estão: A) o aumento da permeabilidade vascular que leva à formação de edema, B) coagulação vascular disseminada que favorece a formação de trombos C) hipotensão sistêmica que, associada as lesões na microcirculação, causa hipoperfusão tecidual e hipoxia, que por sua vez, pode levar à disfunção múltipla de órgãos e óbito (Marshall, 2001; Cunneen *et al.*, 2004 Chvojka *et al.*, 2008; Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011).

Em paralelo à resposta inflamatória, há uma série de mecanismos de natureza antiinflamatória, cujo objetivo é contrabalancear os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios, que leva a um estado de equilíbrio. Entretanto, quando há aumento acentuado dos mediadores e mecanismos antiinflamatórios, tais como citocinas antiinflamatórias (IL-10, -4, -11), antagonista para receptor de IL-1, apoptose de linfócitos T e B, pode ocorrer a um síndrome da resposta antiinflamatória compensatória, caracterizada pela imunossupressão (Dinarello, 1997; Delsesto *et al.*, 2011).

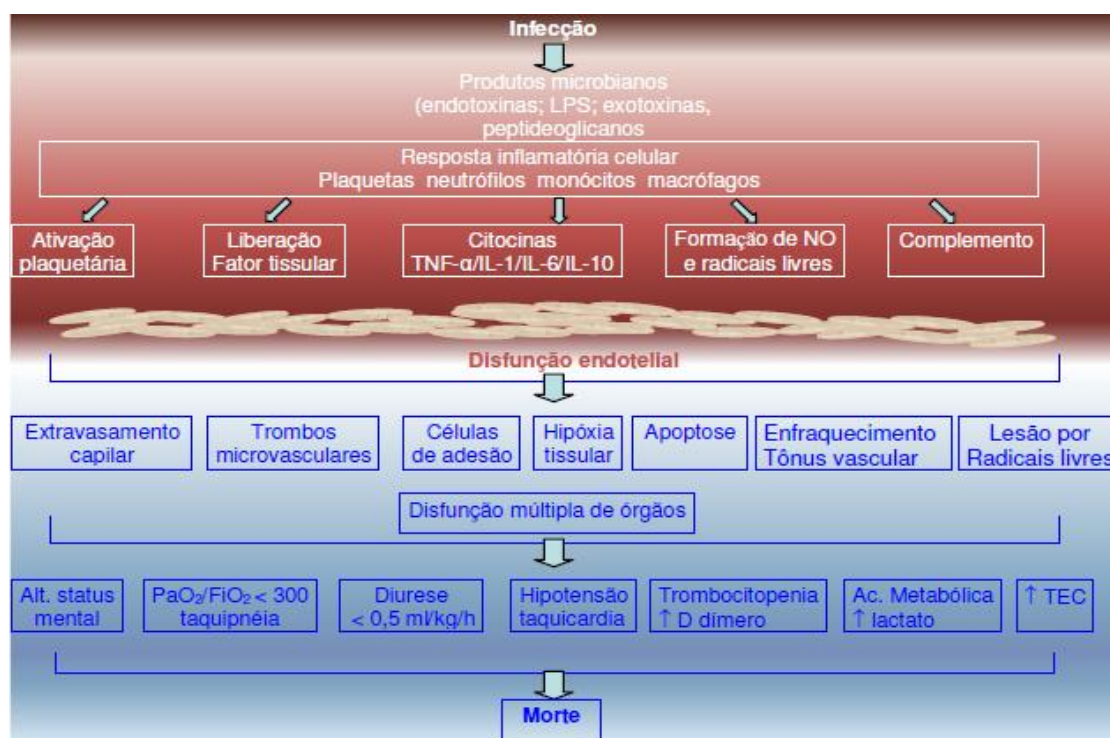


Figura 1- Esquema dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na patogênese da sepsis. **Fonte:** Cunneen *et al.*, 2004

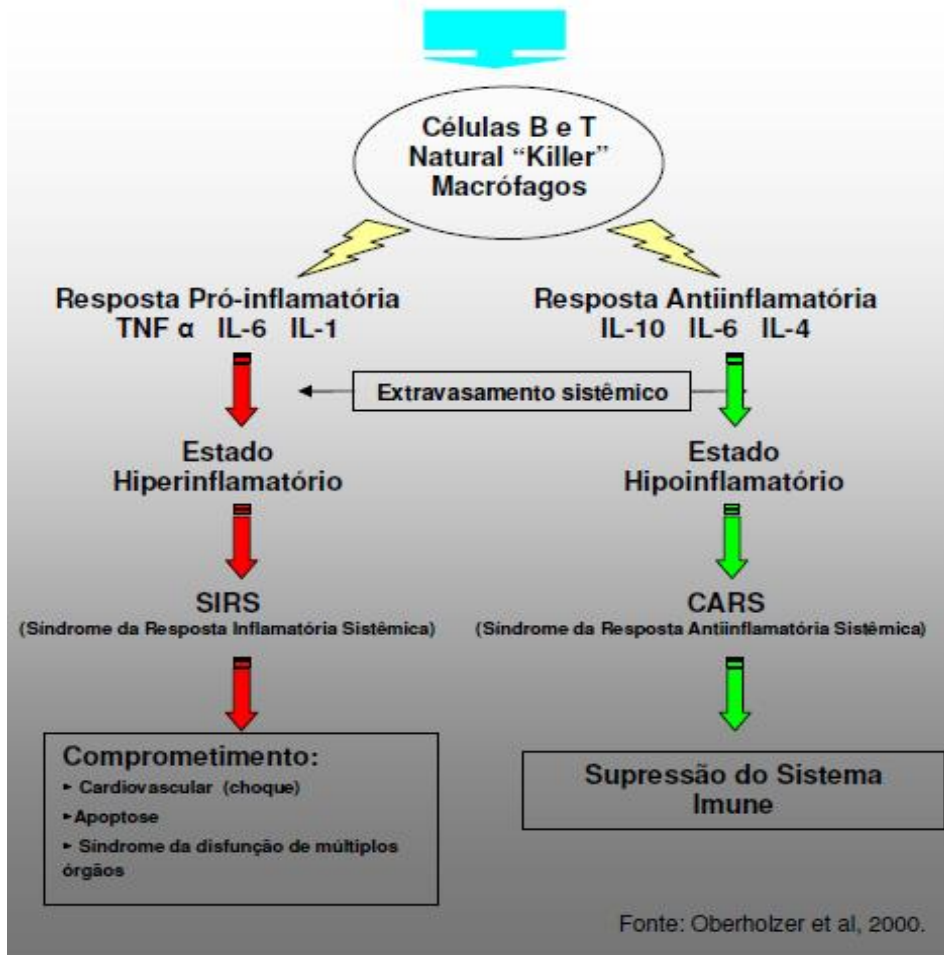


Figura 2 - Esquema que ilustra o balanço entre mecanismos inflamatórios vs mecanismos antiinflamatórios que ocorre na fisiopatologia da sepse. **Fonte:** Oberholzer *et al*, 2000.

1.3 Modelo Animal de Sepsis

Além da complexidade e multiplicidade dos mecanismos envolvidos na patogênese de um episódio da sepsis, outros fatores colaboram para a dificuldade de compreender os eventos envolvidos na evolução dessa doença. Dentre eles, o uso de modelos animais inadequados para o objetivo do estudo foi um dos principais responsáveis pela obtenção de dados enganosos, que não se assemelhavam com a apresentação dessa doença em humanos (Rittirsch et al, 2007; Zanotti-Cavazzoni & Goldfarg, 2009).

Primeiramente, é importante ressaltar que existem vários modelos experimentais de sepsis, e na condição de “modelos” sempre apresentam imperfeições, vantagens e desvantagens. Portanto, o melhor modelo é aquele que responde mais adequadamente a sua pergunta. Abaixo, seguem as principais categorias de modelo animal de sepsis, com suas respectivas vantagens e desvantagens, conforme a literatura (Wichterman *et al.*, 1991; Remick *et al.*, 2000; Zanotti-Cavazzoni *et al.*, 2009; Doi *et al.*, 2009).

Endotoxemia

Em termos de modelos experimentais, o termo endotoxemia refere-se a presença na circulação tanto de lipopolisacarídeos (LPS) quanto a endotoxina. O principal modelo de endotoxemia é:

- **Modelo de infusão intravenosa ou intraperitoneal de um bolus de LPS com ou sem nenhum tratamento de suporte**
 - Vantagem: Apenas uma variável se altera, altamente quantificável e de fácil reprodutibilidade. É um modelo útil para estudar processos inflamatórios.
 - Desvantagem: Presença de variáveis metabólicas, citocinas e outros parâmetros inflamatórios que não apresentam correlação linear com a sepsis humana. Apresentam diferenças cinéticas entre diferentes espécies.

Sepse

Os três principais modelos animais de indução da sepsé são:

A. Infusão endovenosa de bactérias vivas

- Vantagem: Conhecimento da bactéria inoculada e possibilidade de titulação da quantidade a ser injetada.
- Desvantagem: Na sepsé humana, os pacientes não são acometidos por uma invasão maciça e súbita de bactérias, mas sim por uma invasão intermitente e prolongada. Esse modelo leva a um aumento transitório e precoce dos mediadores inflamatórios, produzindo respostas inflamatórias mais intensas que a observada na sepsé humana. Além disso, é de baixa reprodutibilidade.

B. Peritonite induzida por implante de inóculo definido de bactérias .

Os modelos de peritonite são os que mais se assemelham com a sepsé humana. Esse modelo é realizado através do implante de cápsula de gelatina contendo sulfato de bário e fezes na cavidade abdominal do animal.

- Vantagens: Assim como os demais modelos experimentais de peritonite, pode reproduzir mais fidedignamente a evolução do quadro clínico de pacientes sépticos, esse modelo permite também quantificar as bactérias prevalentes no inóculo e, assim, controlar melhor o processo.
- Desvantagem: Dificil reprodutibilidade

C. Modelos de injúria do intestino com consecutiva liberação de flora microbiana:

- **Ligação e perfuração do ceco** (*cecal ligation and puncture - CLP*),
- **Introdução de cateter no cólon ascendente** (*colon ascendens stent peritonitis - CASP*).
 - Vantagem: Baixo custo, simples e fácil de reproduzir. Imita o ritmo progressão da sepse humana, com moderado e não precoce pico de mediadores inflamatório. A gravidade pode ser controlada pelo número de perfurações ou pelo calibre da agulha. É o modelo experimental mais usado para o estudo da sepse.
 - Desvantagem: Dificuldade de controlar a magnitude do insulto. Variabilidade entre espécies e idade dos animais

1.4 Sepse e Injúria Renal Aguda

A injúria renal aguda (IRA) é definida como a perda abrupta da função renal, caracterizada por redução da filtração glomerular, oligúria, lesões de células glomerulares e tubulares, acidez metabólica e alterações hidroeletrólíticas (Kellum, 2008; Lisowska-Myjak, 2010). A sepse, em especial o choque séptico, é uma das principais causa para o desenvolvimento da IRA, sendo responsável por cerca de 20 - 30% dos casos de injúria renal aguda (IRA) nas unidades de terapia intensivas (UTIs). Nessas unidades, a IRA também está associada a um aumento da taxa de mortalidade dos pacientes sépticos, que varia de cerca de 40%, em pacientes sépticos sem IRA, para aproximadamente 70%, em pacientes séptico com IRA (Andrikos *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2010).

O conhecimento da fisiopatologia da IRA na sepse é ainda incompleto e envolve uma interação complexa entre alterações hemodinâmica, lesão celular e inflamação (Ricci *et Ronco*, 2009; Dennen *et al.*, 2010). A queda da pressão arterial, causada por uma vasodilatação sistêmica intensa, leva à isquemia do tecido renal. Essa redução do fluxo sanguíneo renal promove a diminuição da filtração glomerular, alterações metabólicas com queda do estoque de ATP e GTP, apoptose e necrose de células glomerulares e tubulares (Ishikawa *et al.*, 2010; Havasi *et*

Borkan, 2011). Alguns mecanismos fisiológicos que são ativados para controlar a queda da pressão arterial, como a ativação do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona e a liberação de vasopressina, também modulam a hemodinâmica glomerular através da regulação das pressões nas arteríolas glomerulares e da área filtrante glomerular. Além disso, produzem alterações tubulares, tais necrose tubular aguda e aumento da reabsorção de água e de eletrólitos (Langenberg et al, 2006; Schimdt *et al.*, 2007; Mariano *et al.*, 2008; Wan et al, 2008; Ishikawa *et al.*, 2010).

Além das alterações hemodinâmicas, há uma grande variedade de tipos celulares e mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da IRA séptica. De forma resumida, os componentes da parede celular dos microorganismos, como lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicóico e peptideoglicanas são reconhecidos pelo TLR-4 presentes em macrófagos presente no tecido renal promovendo o recrutamento de várias tipos celulares como linfócitos B e T, que causa autofosforilação dos mesmos e a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Sherwood, 2004; Jean-Baptiste, 2007; Gonçalves *et al.*, 2010). O NF- κ B é um regulador pleiotrópico de muitos genes envolvidos na resposta imune e inflamatória. Dentre suas funções, está o controle da expressão de genes incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas induzidas, fatores de crescimento de algumas proteínas de fase aguda (Cai *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010). Associado a isso, ocorre ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas como o complemento, a coagulação e o sistema fibrinolítico, a produção e liberação de mediadores lipídicos como eicosanóides e o fator de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio também está presente na patogênese da IRA séptica (Cunha *et al.*, 1997; Dinarello, 2007; Ricci *et Ronco*, 2009; Mori *et al.*, 2010). Entre as principais conseqüências da ação conjunta desses mediadores inflamatórios estão lesões de células glomerulares e tubulares e produção proliferação e migração fibroblastos levando ao acúmulo da matriz extracelular e conseqüente fibrose e perda de néfrons (Ricci *et Ronco*, 2009; Zarjou *et Agarwal*, 2011)

1.5 Sistema Renina – Angiotensina e Doenças Renais

O sistema renina-angiotensina (SRA) constitui-se de uma cascata hormonal que envolve peptídeos, enzimas e receptores específicos, cuja ação clássica refere-se à regulação de funções cardiovasculares, renais e adrenais, mantendo o balanço de fluidos e eletrólitos do organismo, bem como controle da pressão arterial (Santos *et al.*, 2008). Conforme pode ser visualizado na figura 3 abaixo, duas vias distintas estão presentes no SRA, são elas:

- A via clássica, representada em azul na fig.3, é formada pelo eixo enzima conversora da angiotensina (ECA) - Angiotensina II - Receptor do tipo 1 de angiotensina (AT1). Essa via é dependente da ação da ECA, enzima que hidrolisa a Ang I em Ang II. A Ang II é o principal peptídeo efetor dessa via e seus efeitos biológicos são mediados por dois tipos específicos de receptores angiotensinérgicos, receptor do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2), que são membros da família de receptores acoplados à proteína G e desencadeiam mecanismos distintos de sinalização intracelular. Os efeitos clássicos do SRA são mediados pela via da Ang II acoplada ao receptor AT1 e, de forma genérica, resumem-se à vasoconstrição, disfunção endotelial, proliferação, hipertrofia, fibrose, aterosclerose e morte celular (Chappell, 2004; Santos *et al.*, 2008; Ingelfinger, 2009)
- A segunda via, representada em verde na fig.3, é formada pelo eixo ECA 2 – Angiotensina (1-7) – Receptor Mas. A ECA2, uma enzima homóloga à ECA, forma a Ang-(1-7) a partir da hidrólise da Ang II ou indiretamente, a partir da Ang I que forma Ang-(1-9) e, finalmente, é clivada a Ang-(1-7). A Ang-(1-7) possui um receptor específico, receptor Mas, que, assim como os receptores AT1 e AT2, é constituído por sete domínios transmembrana, acoplado à proteína G. A partir da interação entre este peptídeo e seu receptor, são ativados os mecanismos de sinalização intracelular que desencadeiam as seguintes ações: vasodilatação, inibição do crescimento celular, anti-trombogênicas, anti-proliferativas e anti-fibrogênicas (Chappell, 2004; Santos *et al.*, 2008; Ingelfinger, 2009)

Sistema Renina - Angiotensina

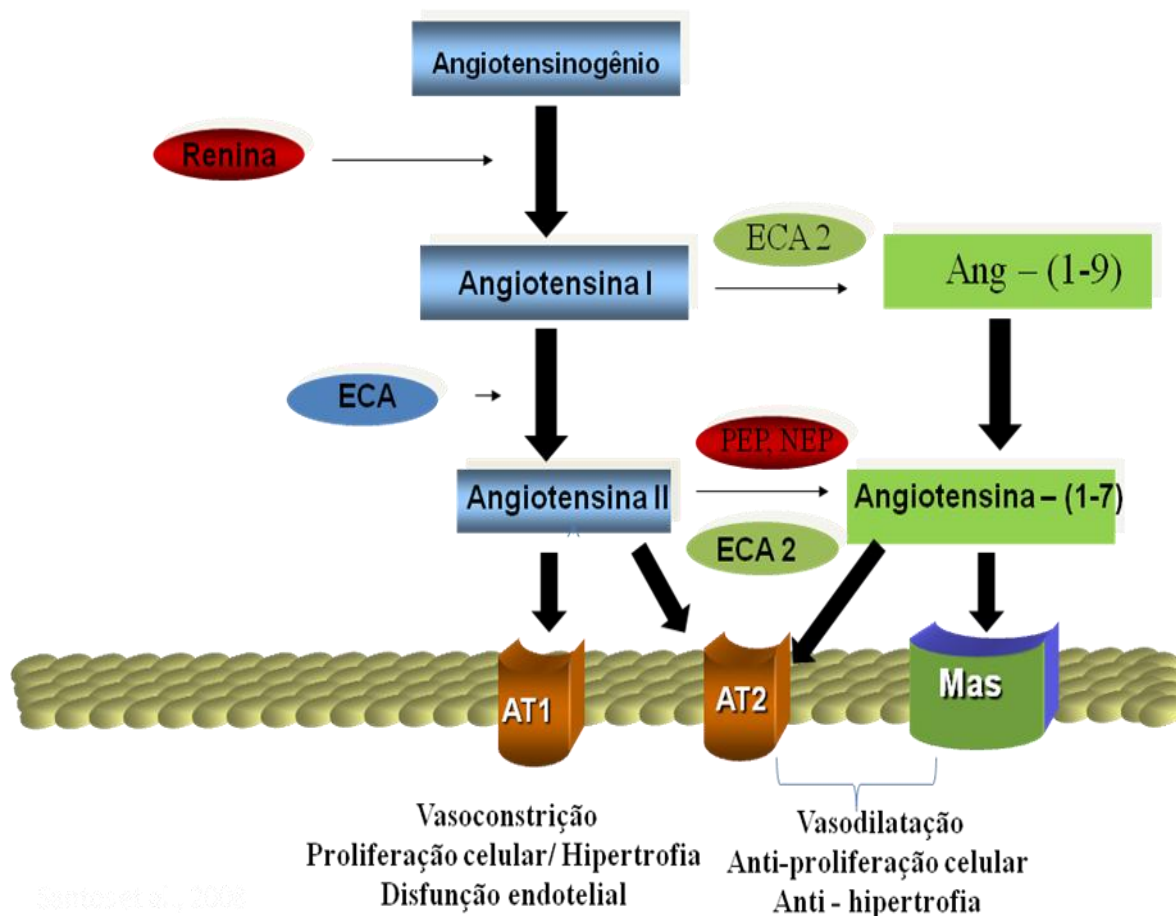


Figura 3- Representação das vias clássica vasoconstritora (azul) e contra-regulatória vasodilatadora (verde) do sistema renina-angiotensina. ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA 2, Enzima Conversora de Angiotensina 2; AT1, Receptor tipo 1 de Angiotensina; AT2, Receptor tipo 2 de Angiotensina

Além do papel importante na regulação da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico, a via vasoconstritora de SRA está envolvida na fisiopatologia de diversas doenças (Ingelfinger, 2009; Campbell *et al.*, 2011). Nas doenças renais, em especial na IRA séptica, a Ang II tem papel efetivo na modulação da hemodinâmica glomerular, assim como na progressão do processo inflamatório (Wolf, 1998; Hisada *et al.*, 1999; Carey *et al.*, 2008). Embora a atividade pressora da Ang II seja um importante mecanismo de balanço fisiológico para controlar a hipotensão que ocorre durante o choque séptico, o aumento da contração vascular promovido pela Ang II está associado ao remodelamento vascular e disfunção endotelial, contribuindo assim para o comprometimento do fluxo sanguíneo renal. Além disso, a

Ang II estimula, via NF- κ B, a produção gênica de fatores fibrinogênicos como o TGF β e de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6), induz infiltração de células leucocitárias no tecido renal e apoptose das células epiteliais dos túbulos proximais (Ruiz-Ortega et al, 2001; De Ciuceis et al, 2005; Wan Li *et al.*, 2009, Naviglio *et Pirozzi*, 2010; Gonçales *et al.*, 2011). Kontogianus *et Burns* (1998) mostraram que há uma ativação do eixo vasoconstritor da SRA, evidenciada pelo aumento dos níveis renais de Ang II acompanhado de uma redução dos níveis corticais de angiotensinogênio e de uma regulação para baixo do RNAm dos receptores AT1 nos túbulos proximais dos rins de ratos submetidos de isquemia/reperfusão renal. Além disso, já foi observado que bloqueio da ação da Ang II, através do uso de inibidores da ECA e/ou antagonistas de receptores AT1, atenuou a redução do ritmo de filtração glomerular e a progressão da lesão renal injúria renal decorrente de diabéticos, glomerulonefrites e processos isquêmicos (Taal *et Brenner*, 2000; Daí *et al.*, 2011; Villa *et al.*, 2011). Igualmente ao observado em outros modelos experimentais de nefropatias, na IRA septic é observado um aumento dos níveis plasmático de angiotensinogênio, da ECA e de Ang II, associado a uma regulação para baixo do receptor do AT1 (Baker *et al.*, 1992, Bucher *et al.*, 2001; Grzesk & Szadujkis-Szadurski, 2003). Além disso, o uso de antagonista de receptor AT1 e inibidores da ECA causaram vasodilatação renal e acentuado aumento do fluxo sanguíneo renal, assim como reduziram os níveis de superóxido nos rins de animais endotóxicos (Wan *et al.*, 2009; Nitescu et al, 2011).

O número de trabalhos que investigaram a participação do eixo contra-regulatório do SRA nas nas doenças renais é escasso. Embora Esteban *et al.* (2009) tenham mostrado que a deficiência de receptores Mas diminuiu danos renais em camundongos *knouckout* para este receptores e que a infusão de Ang (1-7) agravou a resposta inflamatória em animais selvagens, indicando assim um possível efeito inflamatório do eixo vasodilatador do SRA, a maioria dos estudos realizados têm sugerido uma ação renoprotetora da via vasodilatadora de SRA nas doenças renais. Dados obtidos de experimentos realizados com camundongos diabéticos mostraram que na nefropatia diabética há uma redução dos seus níveis renais de ECA 2 e de angiotensina (1-7) e que a administração de MLN-4760, um bloqueador de ECA 2, bem como a deleção gênica de ECA 2 aceleraram e aumentaram as lesões renais de camundongos diabéticos (Soler et al, 2007; Wong et al, 2007). Além disso, Pinheiro et al. (2009) mostraram que camundongos que não expressão receptores Mas para

angiotensina (1-7) apresentam alterações na função renal assim como uma redução do diâmetro do tufo glomerular e maior expressão de fatores fibrinogênico. Tais dados indicam um papel renoprotetor da via contra-regulatória em doenças renais.

1.6 Justificativa

A sepse, em especial o choque séptico, é responsável por cerca de 20-30% dos casos de injúria renal aguda (IRA). Nas unidades de terapia intensivas (UTIs), a sepse é a principal causa de morte e a IRA está associada a um aumento significativo dessa taxa de mortalidade. Além disso, a progressão da IRA tem um grande impacto na qualidade de vida dos sobreviventes, constituindo causa de incapacidade física e laboral na população economicamente ativa, além de gerar grande gastos dos cofres públicos em seu tratamento. Dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) indicam que são gastos cerca de R\$ 1,4 bilhão ao ano com o tratamento destes pacientes, o que representa 10% de toda a verba destinada a hospitais, médicos e medicamentos no Brasil.

Os mecanismos envolvidos na IRA decorrente da sepse são bastante complexos e ainda não totalmente estabelecidos. Entre os diversos mediadores envolvidos na fisiopatologia de doenças renais, o sistema renina-angiotensina (SRA) tem um papel efetivo na gênese e progressão de doenças renais induzidas por diferentes estímulos. Estudos experimentais mostram que há uma ativação da via clássica vasoconstritora do SRA nos rins de animais com IRA decorrentes diabetes, hipertensão e processos isquêmicos como a sepse, evidenciados pelo aumento da atividade e das concentrações plasmáticas e renais de ECA e Ang II, além de uma melhora nas lesões e na perda da função renal desses animais quando há o bloqueio desta via por inibidores da ECA e/ou antagonistas de receptores AT1. De forma oposta, estudos indicam que a via vasodilatadora do SRA possui uma ação renoprotetora, uma vez que a deleção gênica dos receptores Mas e o bloqueio da ECA2 e da Ang –(1-7) promoveram um aumento dos da nos renais.

Em particular na IRA decorrente da sepse, o conhecimento sobre a participação da via vasodilatadora contra-regulatória do SRA foi pouco investigada. Portanto, da mesma forma que a via clássica do SRA está envolvida nesses processos, é bastante plausível a hipótese de a via contra-regulatória, representada pela ECA2-Ang-(1-7)-receptor Mas, também participe dos processos fisiopatológicos

da IRA induzida pela sepse. Em síntese, será investigado o comportamento dos componentes chaves da via vasodilatadora no tecido durante as primeiras 24h (períodos de 6, 12 e 24h) após indução da sepse, assim como o efeito da administração de Ang-(1-7) sobre parâmetros de função renal e inflamatórios em ratos sépticos com IRA, tendo como objetivo contribuir para a compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos na instalação da doença, possibilitando o desenvolvimento de novas terapias para aumentar a sobrevida e a qualidade de vida e reduzir o gasto orçamentário com este tipo de enfermidade.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os componentes do eixo ECA2 – Ang-(1-7) – Mas do SRA e os efeitos renais e inflamatórios da administração de Ang-(1-7) nas fases precoces da disfunção renal induzida pela sepse em modelo de sepse polimicrobiano (Ligadura e Perfuração do Ceco).

3.2 Objetivos Específicos

1- Caracterizar a disfunção renal promovida pela sepse não letal, modelo CLP, nos períodos de 6, 12 e 24 horas após indução da sepse, através da avaliação de alterações em:

- **Parâmetros de função renal**, tais como: Ritmo de filtração glomerular, proteinúria (albuminúria), excreção de água e eletrólitos (Na^+ e K^+), capacidade de concentrar urina.
- **Perfil inflamatório** através da quantificação plasmática, urinária e no tecido renal de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, $\text{TNF}\alpha$) na IRA promovida pela sepse.
- **Alterações Hemodinâmica:** Verificar a pressão arterial média, frequência cardíaca, reatividade vascular renal à agentes vasoativos em vaso isolado de rato.

2- Medir alguns componentes do sistema renina – angiotensina durante a evolução da disfunção renal decorrente da sepse , através da expressão e distribuição de enzimas (ECA e ECA 2) e receptores do sistema (AT1 e Mas) utilizando técnicas de PCR-RT,, west-blot e/ou imuno-histoquímica. Assim como, mensurar níveis plasmáticos e teciduais das angiotensina por radioimunoensaio

3-Avaliar o efeito da modulação do eixo ECA2/angiotensina (1-7)/Mas na disfunção renal induzida pela sepse, através da análise de parâmetros de função renal, perfil inflamatório e alteração hemodinâmicas após tratamento dos ratos sépticos com com Ang-(1-7) exógena.

MATERIAIS

E

MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 250 e 320 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 14 - 10h, com livre acesso à água e ração.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número 178/08.

4.1 Grupos experimentais

4.1.1 Modelo de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A indução da sepse foi realizada pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica de cetamina 10% (15mg/Kg) e xilazina 2% (7,5mg/Kg) por via intraperitoneal.

Após a realização da tricotomia na região abdominal, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica. A assepsia local foi feita com álcool iodado. Os animais foram, em seguida, submetidos a laparotomia com incisão longitudinal de, aproximadamente, 1cm e subsequente exposição do ceco. Este foi semi-ocluído com fio de seda, na região próxima à válvula ileocecal. O ceco dos animais recebeu dez perfurações com agulha estéril (40 x 12) e, logo após, foi levemente comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Em seguida, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal, que teve sua musculatura e pele suturadas com fio de seda. Em seguida, a região abdominal foi limpa com álcool 70%. Por fim, os animais receberam hidratação com 2 ml de solução fisiológica, via subcutânea, no dorso e foram colocados em uma caixa devidamente aquecida, para recuperação da anestesia por 60 a 120 minutos.

Os animais “falso” operados ou sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo, contudo, perfurações no ceco.

Uma curva de sobrevivência (Fig.4), com ratos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da sepse descrito acima, foi construída para avaliar a porcentagem de sobrevivência desses animais durante as primeiras 72

horas após indução da sepse. Para isso, 4 seqüências de cirurgia, cada uma com 10 ratos, foram realizadas. Assim, como observado na figura 1, a taxa de mortalidade desses animais foi cerca de 35% em 72 h, sendo que nos períodos de 6, 12 e 24 h, a mortalidade foi de 0, 20 e 30% , respectivamente. Todos os animais sham sobreviveram ao procedimento cirurgico. Nenhum caso de morte foi observado no período de 48 - 72 h após cirurgia.

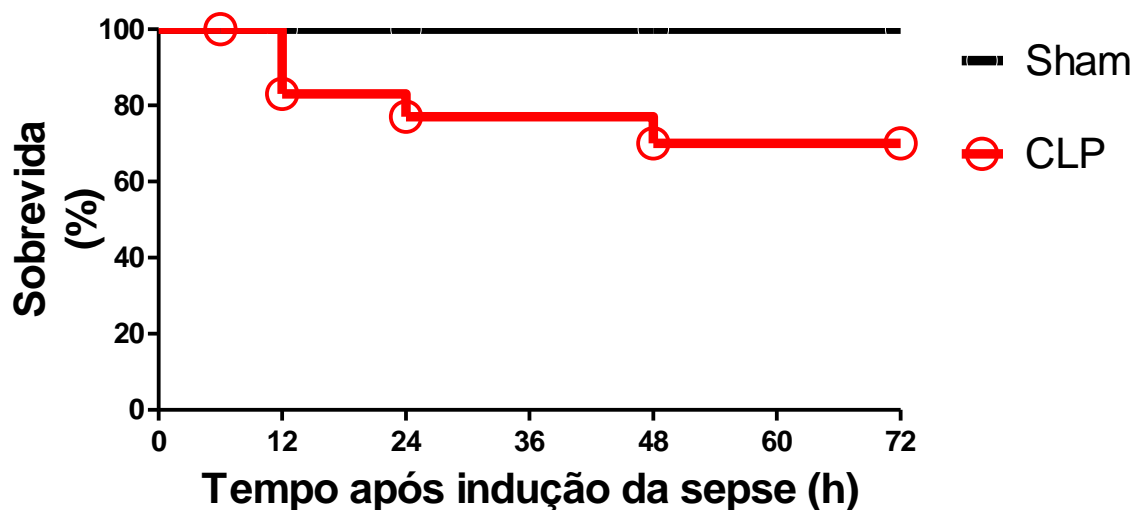


Figura 4. Curva de sobrevivência dos animais submetidos à cirurgia de indução de sepse pelo modelo CLP, que receberam 10 perfurações no ceco. Os valores estão expressos em porcentagem de sobrevivência nos tempos indicados até 72 h após a indução da sepse. Sobrevivências de 100 e 65 % nos grupos sham (N= 16) e CLP (N=24), respectivamente.

4.2 Protocolos Experimentais

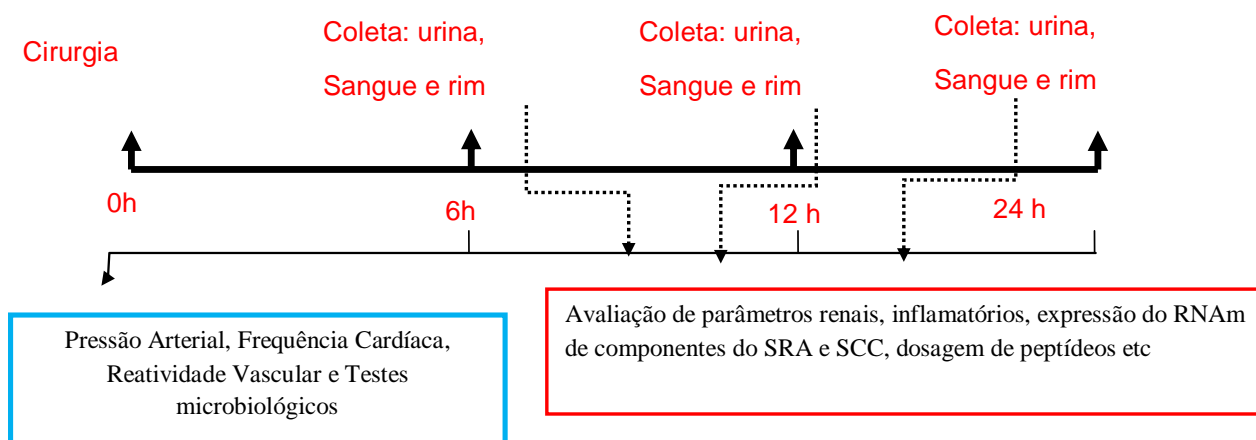
Nesse estudo, três diferentes protocolos experimentais foram realizados. A seguir, serão descritos os delineamentos experimentais utilizados em cada um dos protocolos experimentais.

4.2.1 – Protocolo experimental 1

Esse protocolo teve como objetivo avaliação do desenvolvimento de sepse e suas relações com alterações renais, inflamatórias, hemodinâmicas e com o sistema renina-angiotensina, após 6, 12 e 24 horas da cirurgia para indução da sepse no modelo CLP. Sendo assim, o protocolo foi realizado da seguinte forma:

Ratos Wistar machos (250-320g) foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da sepse, conforme descrito no item 4.1.1. Logo após, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas. Nos períodos de 6, 12 e 24 h após indução da sepse, amostras de sangue, urina e rim foram coletadas para posteriores análise de função renal, parâmetros inflamatórios, hemodinâmicos, bem como expressão, distribuição e quantificação de componentes do SRA. As medidas de pressão arterial média e frequência cardíaca foram adquiridas minutos antes de cada um desses períodos. Durante este período, a ingestão de água e produção de urina foram constantemente monitoradas. Os grupos sham e sépticos foram compostos por 4 a 12 ratos por grupo.

O esquema abaixo ilustra o delineamento experimental, mostrando os períodos de coleta de amostras e do sacrifício dos animais.



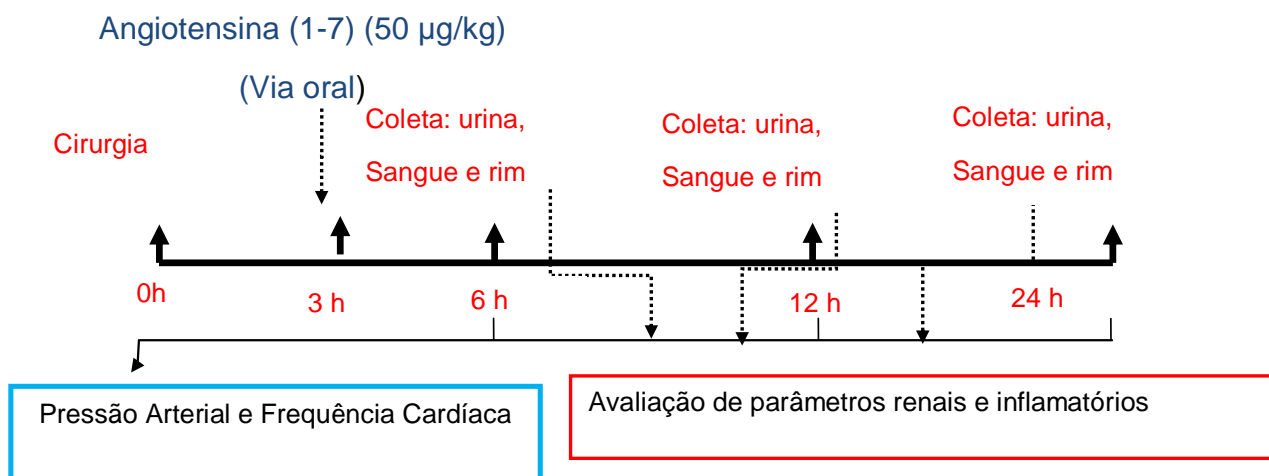
Esquema 1. Cronograma de execução do protocolo experimental para avaliação do desenvolvimento de sepse e suas relações com alterações renais, inflamatórias, hemodinâmicas e com o sistema renina-angiotensina, após 6, 12 e 24 horas após cirurgia para indução da sepse no modelo CLP.

4.2.2 –Protocolo Experimental 2

Esse protocolo teve como objetivo avaliar o efeito da administração da angiotensina (1-7) no desenvolvimento da disfunção renal induzida pela sepse através da análise alterações renais e inflamatórias. O protocolo foi realizado da seguinte forma:

De forma semelhante ao realizado no protocolo 1 (item 4.2.1), ratos Wistar machos (250-320g) foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da sepse (item 4.1.1). 3 horas após indução da sepse era feita uma administração, via oral, de Ang - (1-7) incorporada ao polímero hidropil- β - ciclodextrina, na dose de 50 μ g/kg, em seguida os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas. Nos períodos de 6, 12 e 24 h após indução da sepse, amostras de sangue, urina e rim foram coletadas para posteriores análise de função renal e parâmetros inflamatórios. Os grupos sham e sépticos foram compostos por 4 a 8 ratos por grupo.

O esquema abaixo ilustra o delineamento experimental utilizado no protocolo 2.



Esquema 2. Cronograma de execução do protocolo experimental 2 para avaliação do efeito da administração, via oral, da angiotensina (1-7) no desenvolvimento da disfunção renal induzida pela sepse através do análise alterações renais, inflamatórias e hemodinâmicas, após 6, 12 e 24 horas após cirurgia para indução da sepse no modelo CLP.

4.3- Métodos usados na caracterização da sepse

4.3.1 Determinação do crescimento de bactérias no sangue e no lavado peritoneal

O lavado peritoneal foi obtido da seguinte maneira: Após assepsia da região abdominal com álcool iodado 1%, volume de 5 ml de salina 0,9% estéril foi introduzido na cavidade abdominal e, posteriormente, cerca de 0,5 ml do conteúdo peritoneal foi coletado. O sangue foi coletado por punção da veia da cauda, previamente limpa com álcool 70% e álcool iodado 1%, utilizando cateteres e seringas estéreis. Um volume 100 µl das amostras foi semeado em placas contendo o meio de cultura ágar Mueller-Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) preparado seguindo as instruções do fabricante. Semeou-se o sangue p uro e o lavado peritoneal foi diluído 1:1000, 1:10000 e 1:100000 em salina estéril antes da semeadura. Todo o

procedimento foi feito sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24 horas a 37° C e o número de colônias foi quantificado. Os resultados foram expressos como Log 10 da Unidade Formadora de Colônias (UFC)/ml para as bactérias presentes no sangue e UFC/cavidade para as bactérias presentes no lavado peritoneal.

4.3.2 Mensuração e registro da pressão arterial média e frequência cardíaca.

A pressão arterial média e frequência cardíaca foram medida nos animais acordados, através de um sistema não invasivo, de pletismografia de cauda digital (LE 5001, Panlab S.I Barcelona, Espanha). Este sistema, a artéria da cauda foi brevemente ocluída com o auxílio de um manguito de cauda (“tail cuff”) acoplado a um sensor que detecta pulsos arteriais da cauda e envia o sinal analógico para um conversor analógico-digital. Os sinais digitais foram registrados e processados por um software apropriado (NIBPchart)

4.3.3 Efeito da sepse sobre a reatividade vascular

Vinte e quatro horas após indução da sepse, os animais sépticos e sham foram sacrificados por guilhotinamento para execução do procedimento cirúrgico. Este procedimento consistiu na abertura da cavidade torácica, e retirada de um segmento da artéria aorta descendente torácica de 2 a 3 cm, a partir do diafragma até aproximadamente o arco aórtico. Seguindo a artéria aorta descendente, alcança-se a artéria renal, da qual um outro segmento de 2 a 3 cm é retirado. Seqüencialmente, os segmentos aórtico e renais foram transferido e acondicionado em líquido nutritivo sobre uma placa de Petri para a retirada dos tecidos adjacentes, e corte transversal do segmento em anéis de 2 a 3 mm de comprimento. Posteriormente, os anéis foram fixados em suporte e haste metálicos, e transferidos para cubas de vidro (10 ml) contendo líquido nutritivo de Krebs-Henseleit (composição: NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,9; MgSO_4 1,1; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25, D-glucose 11 (mM), aquecido à $\pm 37^\circ\text{C}$ e aerado com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Os anéis foram

individualmente tracionados e mantidos sob tensão basal constante de 0,5 g. Os procedimentos de obtenção e montagem dos anéis no sistema de órgão isolado foram realizados cuidadosamente para preservação da camada endotelial. Na fase inicial de todos os experimentos, as preparações foram primeiramente submetidas a um período de equilíbrio de 60 min, com substituição de líquido nutritivo a cada 15 min, e reajuste da tensão basal dos vasos para a tensão de 0,5 g quando necessário. Ao final deste período de equilíbrio, as preparações foram submetidas à avaliação farmacológica da presença ou ausência da camada endotelial, através da verificação do efeito da acetilcolina (10 μ M) em vaso pré-contraído com fenilefrina (1 μ M). Este protocolo consiste na adição da acetilcolina por 5 minutos e, posterior avaliação da porcentagem de relaxamento da tensão contrátil da preparação. Assim, as preparações que apresentaram valor de relaxamento igual ou superior de 80% serão consideradas como anéis com endotélio íntegro, e os anéis que apresentaram valor de relaxamento igual ou inferior a 5% serão considerados como anéis sem endotélio. Esta avaliação experimental foi realizada de acordo com os procedimentos descritos previamente por Furchgott e Zawadski⁷⁵. O líquido nutritivo de Krebs-Henseleit tem a seguinte composição: (NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,9; MgSO_4 1,1; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25, D-glucose 11 (mM). As modificações do tônus vascular foram detectadas por transdutores de força isométrica (World Precision Instruments, Sarasota, FL) e registradas através de um amplificador (Modelo TMB-4; World precision Instruments) em integração com sistema operacional Windows XPTM (Microsoft Corporation, USA) através de uma placa de conversão alógico-digital[®] (AD16 JR; World Precision Instruments) e software de aquisição de dados (CVMS data acquisition, World Precision Instruments).

Após trinta minutos da avaliação experimental da presença ou da ausência de endotélio, foram construídas curvas concentração-resposta de (10^{-10} a 10^{-5} M) em anéis de aorta e artéria renal de ratos sham (controle) e séptico (CLP)

4.4 Métodos utilizados para avaliar a função renal

Amostras de sangue e urina foram coletadas durante período de 6,12 e 24 horas. Para a coleta de sangue foi realizada a punção da veia da cauda, as amostras foram coletadas em eppendorff contendo 10µl de heparina sódica (Liquemine – Roche-Brasil), utilizada como anticoagulante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 5 minutos) O plasma foi separado e armazenado a - 20°C até o momento dos ensaios. O volume de urina foi medido em proveta graduada e, assim, utilizados para expressar a diurese. Alíquotas de 1 a 2 ml de urina foram congeladas a -20°C até o momento dos ensaios

4.4.1- Dosagem de creatinina

O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado determinado por meio do *clearance* de creatinina. As dosagens de creatinina urinária e plasmática foram realizadas com o kit fornecido pela Bioclin K016 (Quibasa, Brasil) conforme instruções do fornecedor. Esse kit é composto por i) solução padrão de creatinina (3mg/dl) (reagente nº 1), ii) solução de ácido pícrico (60 mmol/l) (reagente nº 2), iii) solução de NaOH (110mmol/l), Na₂CO₃ (75 mmol/l) e surfactante (reagente nº 3) e iv) solução de CH₃COOH (12,25 mol/l) (reagente nº 4). Os meios de reação são preparados de acordo com o quadro abaixo, a seguir:

SUMÁRIO PARA A DOSAGEM DE CREATININA

	Plasma (ml)	Urina (ml)	Água destilada (ml)	Reagente 01 (ml)	Reagente 02 (ml)	Reagente 03 (ml)
Branco	-	-	0,125	-	0,250	1,0
Padrão	-	-	-	0,125	0,250	1,0
Amostra	0,125	-	-	-	0,250	1,0
		0,125	-	-	0,250	1,0

As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37 °C, por 10 min. As absorbâncias da amostra e do padrão foram lidas a 510 nm,

acertando o zero com o branco. Essa absorbância foi utilizada para a determinação da concentração de creatinina nas amostras de urina. Para as amostras de plasma, esse primeiro valor de absorbância é denominado de A1. Após a leitura de A1, às amostras de plasma e ao branco foram adicionados 0,050 ml do reagente nº 4. Após a homogeneização, uma segunda leitura de absorbância das amostras de plasma (A2) foi feita também a 510 nm, acertando o zero com o branco.

As amostras de urina foram previamente diluídas 1:25 e não passaram pela etapa de acidificação como o plasma. A concentração de creatinina, em mg/dl, é calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Creatinina (mg/dl)} = (A1 - A2 / \text{absorbância padrão}) \times 3$$

Como a reação segue a lei de Lambert-Beer, o fator de calibração pode ser usado.

Fator de calibração = concentração do padrão / absorbância do padrão

Creatinina (mg/dl) = (A1 - A2) x fator de calibração.

O Clearance de creatinina foi determinado utilizando a equação abaixo:

$$\text{CICr (ml/min)} = ([\text{Creatinina}]_{\text{urina}} \times \text{Fluxo urinário}) / [\text{Creatinina}]_{\text{plasma}}$$

4.4.2-Dosagem de sódio e potássio

As concentrações de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) nas amostras de urina e plasma foram determinadas por fotometria de chama (Kelm-140) usando padrão contendo 140 mEq/l de Na⁺ e 5 mEq/l de K⁺ preparado em água destilada. Para determinação de Na⁺ e K⁺, todas as amostras são diluídas 200 vezes em água destilada. Para isso, alíquotas de 15 µl da amostra são diluídas em 3 ml de água destilada. A dosagem em cada amostra é feita em duplicata e o fotômetro é calibrado com o padrão diluído 200 vezes em água destilada como as amostras. Para a dosagem urinária de potássio, são feitas duas diluições: Na primeira diluição, as amostras de urina são diluídas na proporção 1:30 (20µl de urina em 580 de água destilada), em seguida é realizada uma segunda diluição de 1:200 (15 µl da primeira diluição em 3 ml de água destilada) e valor lido no fotômetro é multiplicado por 30.

Conhecendo-se as concentrações plasmática e urinária de Na⁺ e K⁺, alguns parâmetros foram quantitativamente avaliados, conforme as equações:

$$FE_{Na^+} (\%) = QE_{Na^+}/QF_{Na^+} \times 100$$

$$FE_{K^+} (\%) = QE_{K^+}/QF_{K^+} \times 100$$

$$FE_{H_2O} (\%) = FU / RFG \times 100$$

Sendo: FE, fração de excreção.

4.4.3 Determinação das osmolalidades plasmática e urinária

A determinação das osmolalidades plasmática e urinária foi feita através de osmometria de congelamento usando padrões com osmolalidades apropriadas (100, 290 e 500 mOsm/Kg). Conhecendo-se as osmolalidades plasmática e urinária, os seguintes parâmetros foram quantitativamente avaliados:

$$C_{osm} (\text{ml/min}) = \text{Osmolalidade}_{urina} (\mu\text{Osm/ml}) / \text{Osmolalidade}_{plasmática} (\mu\text{Osm/ml}) \times FU (\text{ml/min})$$

$$C_{H_2O} (\text{ml/min}) = FU (\text{ml/min}) - C_{osm} (\text{ml/min})$$

Sendo: C_{H₂O} = Clearance de água livre; C_{osm} = clearance osmolar; FU= fluxo urinário

4.4.4 Uréia Plasmática

A dosagem de uréia foi feita nas amostras de plasma por meio do método colorimétrico utilizando o kit UREA UV (Labtest Diagnóstica S/A, Brasil) e de acordo com as instruções do fornecedor. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 600nm.

4.4.5- Proteinúria

A dosagem de proteína foi feita nas amostras de urina por meio do método colorimétrico verde de bromocresol utilizando o kit Sensiprot (Labtest Diagnóstica S/A, Brasil) e de acordo com as instruções do fornecedor. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 600nm.

4.4.6-Microalbuminuria

A dosagem de microalbuminuria foi feita nas amostras de urina por meio da ligação com anticorpos anti-albumina utilizando o kit Microalbuminuria Bioclin (Quibasa S/A, Brasil) e de acordo com as instruções do fornecedor. Essa técnica baseia-se na aglutinação da albumina presente nas amostras de urina com as partículas de látex recobertas com anticorpos anti-albumina. A concentração de albumina na amostra é diretamente proporcional à aglutinação obtida, que é medida por turbidimetria. Antes de iniciar o ensaio, mapeou-se a distribuição das amostras, bem como da curva padrão e do branco, na placa de Elisa. Todo o procedimento foi realizado em duplicata. Diluiu-se o padrão nº 1 para obter as concentrações de 50, 25, 10 e 5 µg/mL e construir uma curva padrão com 4 pontos. Os valores de absorvância das amostras estavam entre os pontos extremos da curva padrão, 5 e 50 µg/mL, validando o ensaio. O leitor de Elisa foi programado para leitura a 540nm.

A primeira leitura foi efetuada imediatamente após a pipetagem do reagente de trabalho da seguinte forma: Pipetou-se 7 µL do padrão diluído nos poços da placa. Em seguida, foram pipetados 7 µL de água destilada e o mesmo volume das amostras nos demais poços. Utilizando uma pipeta de repetição, 200 µL do reagente de trabalho previamente aquecido à 37°C foram adicionados aos poços. Agitou-se a placa e a primeira leitura (A1) foi realizada em, até 10 segundos após o final da reação. Após 2 minutos, nova leitura (A2) da placa à 540 nm foi realizada.

Para obter a concentração da microalbumina nas amostras, a diferença de absorção: $A2 - A1$ foi calculada. Em seguida, a diferença de absorção encontrada ($A2-A1$) foi relacionada a cada um dos pontos da curva padrão. Calculou-se, então, a equação da reta que define esta correlação e, de posse dela, interpolamos os valores de absorvância encontrados em cada amostra à equação, obtendo a quantidade de microalbumina num determinado volume de urina. A unidade utilizada foi microgramas de albumina a cada mililitro de urina (mg/mL).

4.5 Métodos utilizados para avaliar inflamação

4.5.21 Avaliação da migração de neutrófilos (MPO)

Para medir a migração de neutrófilos no rim, foi utilizado o método de quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO), como previamente descrito (De Matos et al., 1999). Antes da realização do ensaio, retirou-se um fragmento de 100 mg das amostras armazenadas a -20°C . Tal fragmento foi mantido num tubo plástico FALCON[®] de 14 ml e no gelo durante todo o processamento. Adicionou-se, então, 1.9 ml de tampão 1 (NaCl 0.1M, Na_3PO_4 0.02M, Na_2EDTA 0.015M – pH 4.7). Homogenizou-se o tecido na presença do tampão 1 e centrifuga-se o homogenato a 10.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, adicionou-se 1.5 ml de solução gelada de NaCl 0.2% ao precipitado remanescente. Após 30 segundos, adicionou-se 1.5 ml de solução gelada de NaCl 1.6% e Glicose 5%. Homogeneizou-se rapidamente o precipitado e centrifugou-se a 10.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi novamente desprezado, sendo, então, adicionados 1.9 ml de tampão 2 (Na_3PO_4 0.05M, HETAB 0.5% p/v – pH 5.4) ao precipitado remanescente. Uma nova homogeneização foi realizada, armazenou-se o homogenato a -20°C em eppendorf de 2ml até a realização do ensaio.

Para o ensaio propriamente dito, as amostras foram inicialmente descongeladas em temperatura ambiente e, em seguida, novamente congeladas em nitrogênio líquido. Descongelou-se, então, em água corrente. Os congelamentos e descongelamentos foram repetidos por 3 vezes. Após esses ciclos, as amostras descongeladas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante dessa centrifugação foi utilizado no ensaio. Adicionou-se, em duplicata, 25 μL dos sobrenadantes das amostras a uma placa de ELISA de 96 poços. Acrescentou-se, também em duplicata, 25 μL do branco (tampão 2). Prosseguiu-se o ensaio adicionando-se 25 μL de tetramethylbenzine (3.845 mg / ml em Dimetilsulfóxido) e incubando a placa a 37°C na estufa por 5 minutos. Após este período, adicionou-se 100 μL de H_2O_2 (0.002% em tampão 2) e incubou-se novamente a 37°C , por 5 minutos. Para finalizar, adicionou-se 100 μL de H_2SO_4 (1M) aos poços e foi realizada a leitura das absorbâncias em leitor de ELISA num comprimento de onda de 450 nm. Para o cálculo da atividade da mieloperoxidase

multiplicou-se a média das absorvâncias das duplicatas por 0.93, somar 0.0031 ao produto e multiplicou-se o resultado pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁵.

4.5.2 - Dosagem de citocinas

As concentrações da interleucina seis (IL-6) e do TNF α na urina, no plasma e no rim foram determinadas usando Kit ELISA Duo Set (R&D Systems, Minneapolis, MN), que emprega a técnica tipo sanduíche, ou seja, padrões, amostras e conjugados foram pipetados na placa e, em presença de IL-6 ou TNF α , estes foram apresentados como sanduíche pelos anticorpos imobilizados e pelos anticorpo monoclonal específico para a citocina. Após a lavagem para remoção de outras substâncias não ligadas ao anticorpo e/ou reagentes, um substrato ácido foi adicionado à solução e desenvolve coloração na proporção da quantidade de IL-6 ou de TNF α ligados. A intensidade da cor foi medida por leitura de densidade óptica em leitor automático de Elisa, em comprimento de onda de 450nm. As concentrações de IL-6 e TNF α na urina, plasma e no rim, foram calculadas a partir dos resultados obtidos na curva padrão do mesmo ensaio, realizada com IL-6 e TNF α recombinante para ratos.

4.6 Métodos utilizados para avaliar os componentes do SRA

4.6.1 - Avaliação da expressão renal do RNA mensageiro de receptores e enzimas do sistema renina-angiotensina.

O conteúdo renal de RNA mensageiro que codifica componentes do SRAA foi determinado utilizando a reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)

A partir da busca na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi possível selecionar a sequência dos mRNAs das proteínas do estudo em questão, em ratos. De posse da sequência completa, foram identificadas as seqüências codificantes, que foram, então, utilizadas para a seleção dos “primers” para cada uma das proteínas estudadas, relacionados na Tabela 1.

Tabela 2. Seqüência de DNA dos pares de “primers” utilizados para amplificação do cDNA das proteínas avaliadas neste estudo.

<i>Proteínas</i>	<i>Primers</i>
ECA	Sense 5'-CTTCACTGACCAAAGCTGCG-3' Anti-sense 5'-CCTAGGGTCTGTAGGGATCCG-3'
ECA 2	Sense 5'-GTGGAGGTGGATGGTCTTTCA-3' Anti-sense 5'-TTGGTCCACTGTTCTCTGGGA-3'
Receptor Mas	Sense 5'-TGACCATTGAACAGATTGCCA-3' Anti-sense 5'-TGTAGTTTGTGACGGATGGTG-3'
Receptor AT1	Sense 5'-TCTCAGCATCGATCGCTACCT-3' Anti-sense 5'-AGGCGAGACTTCATTGGGTG-3'
GAPDH	Sense 5'- ATGTTCCAGTATGACTCCACTTCACG-3 Anti- sense 5'-GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA-3'

Para a preparação das amostras para a RT-PCR foram realizadas as seguintes etapas:

1) Extração do RNA mensageiro

Para a extração do RNA mensageiro, foi utilizado um fragmento de 100 mg contendo porções do córtex e da medula renal. O fragmento foi armazenado em um tubo estéril, a – 80 °C até o momento da extração.

As amostras foram descongeladas e, a elas, adicionado 1 ml de RNazol para cada 100 mg de tecido. Em seguida, foram trituradas com a ajuda de um homogeneizador, e permaneceram em repouso por 15 min no gelo. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada ml da suspensão obtida que foi então, homogeneizada, em agitador de tubos, por 15 seg. Estes tubos foram incubados durante 2-3 min no gelo e centrifugados a 10.000 rpm, por 15 min. A fase aquosa obtida foi transferida para um novo tubo no qual adicionou-se 500 µL de isopropanol para cada ml de suspensão, procedendo-se nova homogeneização. Prosseguiu-se com sua incubação no gelo (10 min) e centrifugação (10.000 rpm, por 10 min, a 4 °C). O sobrenadante foi removido e, ao precipitado contido no tubo, acrescentou-se 1 ml de etanol 75% gelado para cada ml de suspensão. Realiza-se,

então, nova homogenização, em agitador de tubos, seguida por centrifugação (5.000 rpm, por 5 min, a 4 °C). Após esta centrifugação, o sobrenadante (fase etanólica) foi descartado, mantendo-se o tubo aberto para a secagem do precipitado à temperatura ambiente. Por fim, ressuspendeu-se o precipitado em 30 µL de uma solução de Dimetil pirocarbonato (DEPc) diluída em água Milli-Q (1:1000) .

A determinação da concentração de RNA mensageiro foi realizada em alíquotas obtidas a partir da diluição das amostras em água deionizada (1:200). A absorbância deve ser lida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV - 160 A, Japão), num comprimento de onda de 260 e 280 nm. Os tubos contendo as amostras foram mantidos a -80 °C até o momento do uso e a concentração de RNA foi obtida de acordo com a equação abaixo:

$$[\text{RNA}] = \frac{\text{Absorbância a 260 nm} \times 40 \text{ (1 O.D.RNA = 40 } \mu\text{g/ml)} \times 200 \text{ (diluição)}}{1000}$$

2) Transcrição reversa

Imediatamente antes do início da transcrição reversa, uma alíquota do RNA mensageiro extraído foi diluída em água milliQ, de forma a obter uma solução de RNA com concentração de 0.2 µg/µL. Para a transcrição, foram pipetados, em um tubo de centrífuga (tipo “eppendorf”), 1.8 µL de dNTP 10 mM, 2.5 µL de RT buffer 5X, 1.0 µL de DTT 100 mM, 0.2 µL de RNAsin 10.000 U, 1.0 µL de oligo dT (1:10) 50 ng/ml e 5 µL (1.0 µg) de RNA a 0.2 µg/µL. O tubo contendo essa mistura foi colocado no termociclador previamente programado com o seguinte protocolo: 70 °C por 5 min, 4 °C por 5 min, e 25 °C. Nesse ponto, ao atingir 25 °C, a ciclagem foi interrompida, pelo acionamento do botão “pause”, para permitir a adição de 1 µL da enzima transcriptase reversa 200U diluída 1:4. O botão “pause” foi acionado novamente para reiniciar a ciclagem: 25 °C por 5 min, 37 °C por 60 min, 70 °C por 5 min, 4 °C por 5 min. Ao cDNA obtido (12.5 µL), foram adicionados 17.5 µL de água milliQ estéril. A alíquota de 30 µl obtida foi armazenada a -20 °C.

3) PCR em tempo real (RT-PCR)

A PCR em tempo real foi realizada em placa de 96 poços apropriada para o procedimento. Para evitar pipetagens sucessivas diretamente nos poços, foi previamente feita uma mistura dos constituintes comuns a todas as reações em tubo

ependorf estéril. O volume final dessa mistura foi variável dependendo do número de reações a ser executado. Para cada poço da placa, foi transferida uma alíquota de 20 μL da mistura que consistiu de 2.5 μL de tampão Sybr 10x, 2.0 μL de uma mistura dNTPs (200 μM cada), 3 μL de MgCl_2 , 2 μL do “primer sense”, diluído 1:80 em água milliQ (100 nM), 2 μL de “primer antisense”, diluído 1:80 em água milliQ (100 nM), 0.125 μL de polimerase (Amplitaq Gold) (0.25U/ μL) e 8.725 μL de água milliQ. O cDNA (5 μL), preparado conforme descrito no item anterior, foi adicionado a cada poço da placa. O volume final em cada poço (reação) foi de 25 μL . Os poços foram cobertos com tampas apropriadas e a placa submetida à centrifugação a 1500 rpm, por 1 min, para a homogeneização das reações. Em seguida, a placa foi transferida para o equipamento de PCR em tempo real (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System – Applied Biosystems).

4.6.2 Dosagem de peptídeos Angiotensina II e Angiotensina-(1-7).

Após realização do protocolo experimental 1 apresentado acima (item 4.2.1), os animais foram sacrificados no período de 24 horas após indução da sepse para a coleta do sangue e rim. As dosagens das concentrações plasmáticas e renal de angiotensina II e Angiotensina –(1-7) foram feitas por técnica de radioimunoensaio, de acordo com o seguinte protocolo:

a) Coleta de sangue para dosagem de angiotensina II e angiotensina-(1-7)

Para cada mililitro de sangue colhido foram utilizados 140 μl de coquetel composto de: 10 μl de p-hidroxi-benzoato de mercúrio 1 mm, 50 μl de o-fenantrolina 9,1 mm, 10 μl de para-metilsulfonil fluoreto 1 mm , 50 μl de EDTA a 7,5% e 20 μl de pepstatin A 0,5 mm.As soluções de pOHHgBz e o PMSF foram preparados imediatamente antes das coletas, da seguinte forma:

- a) Pesou-se 1 mg de pOHHgBz em balança analítica, diluindo-se, a seguir, em 2,5 ml de NaCl 0,9%.
- b) Pesou-se 1,74 mg de PMSF em balança analítica, diluindo-se, a seguir, em 10 ml de MeOH a 50%.

c) Depois disso, preparou-se o coquetel de inibidores de angiotensinas logo antes do momento da coleta de sangue, utilizando-se as soluções mencionadas juntamente com pepstatin a 0,5 mm e o O-fenantrolina 9,1mm, que foram conservados em *freezer*, e EDTA a 7,5%, mantido em geladeira.

b) Obtenção das amostras de plasma

Após a coleta das amostras de sangue, os tubos foram colocados em centrífuga refrigerada e centrifugados a 2.000 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos, sob temperatura de 4°C. O plasma foi mantido em tubos em um *freezer* a - 80°C, até a extração.

c) Obtenção das amostras de rim

Os rins foram rapidamente coletados, separados e congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos a temperatura de - 80° C até o momento da homogeneização. Os rins foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador (Turax) utilizando-se 10 ml de solução de etanol ácido (HCl 0,045 N/etanol) na presença de 1.400 µl de coquetel de inibidores de proteases como descrito anteriormente e 10 µl de BSA 5% em água deionizada. Amostras dos homogenatos foram retiradas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 10.000 rpm à 4° C. O sobrenadante foi vertido para tubo de polietileno lavado com BSA 0,1 % e foi realizada liofilização em centrífuga evaporadora por 12-10 horas até formação de resíduo. Depois de liofilizado, o resíduo foi ressuscitado seqüencialmente em 750 µl de água miliq, soluções de TFA 0,2% e TFA 0,1%. Para a completa dissolução desses resíduos foi utilizado aparelho de ultra-som (Vibra Cell, Sonics e Materiasl Inc). O sobrenadante resultante foi transferido para tubo de polietileno lavado com BSA 0,1% e mantido em tubos em um *freezer* a - 80°C, até a extração.

d) Extração das amostras de plasma e rim

A extração de angiotensinas do plasma e rim foi realizada em colunas *Bond Elut* C-18. As soluções e amostras de plasma e rim foram passadas pela coluna através da adaptação de uma seringa que permitia aplicar pressão positiva à coluna. Antes disso, foram centrifugadas novamente a 4°C sob 2.000 rpm por 20 minutos. A coluna *Bond Elut* C-18 foi pré-ativada por meio da lavagem com 20 ml de acetronitrila 99,9% (ACN 99,9%)/ ácido heptafluobutírico 0,1% (HFBA 0,1%) e 20 ml de solução aquosa de HFBA 0,1%. A seguir, a coluna foi lavada seqüencialmente com 3 ml de BSA 0,1%/ HFBA 0,1%, 10 ml de ACN 10%/ HFBA 0,1% e 3 ml de HFBA 0,1%. Em seguida, foi aplicada a amostra, anotando-se o volume de plasma colocado na coluna. Posteriormente à aplicação das amostras, a coluna foi lavada com 20 ml de HFBA 0,1% e 3 ml de ACN 60%/ HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluídos com 3 ml de ACN 99,9%/ HFBA 0,1% e armazenados a -20°C em tubos de polietileno previamente lavados com BSA 0,1%. O material eluído foi submetido à secagem em centrífuga evaporadora (Eppendorf Vacufuge Speed Vac 5301, San Diego-USA) por 8-12 horas e estocado a -20°C até o processamento das amostras pelo método de radioimunoensaio.

e) Radioimunoensaio para angiotensina II

O material submetido à secagem na centrífuga evaporadora foi ressuspenso em 650 µl de tampão de Ang II para a dosagem de Ang II. Esse tampão consistiu de uma solução de NaCl a 0,9%, BSA a 0,1% e ácido acético a 0,03%. O anticorpo empregado foi produzido no Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG e foi utilizado na diluição de 1:160.000 em tampão de Tris 0,1M, EDTA 15mM e lisosima a 0,1%, com pH 7,4 para dosagem de Ang II (tampão I). A solução contendo Ang II marcada com ¹²⁵I foi utilizada num volume correspondente a 6.000 cpm, sendo diluída em tampão I para dosagem de Ang II. A curva-padrão do radioimunoensaio foi feita pelas diluições progressivas a partir de solução estoque contendo 2 mg/ml de Ang II.

Os ensaios seguiram o seguinte protocolo (Tabela 3)

Tabela 3 – Soluções e volumes utilizados para RIE de AngII

Soluções (µl)	Total	Branco	P0 ¹	Padrão	Amostra
Tampão I	1100	100	-	--	-
Tampão de ensaio	200	200	200	100	-
Pontos da Curva	-	-	-	100	-
Amostra	-	-	-	-	200
¹²⁵ IAng II ²	100	100	100	100	100
Anticorpo	-	-	100	100	100
Volume final	1400	400	400	400	400

¹Tubo Padrão “zero” – Valor de Referência

²Ang II radioiodada

Todos os tubos de ensaio receberam 100 µl de Ang II marcada com ¹²⁵I. O tubo branco recebeu 100 µl de tampão I no lugar do anticorpo e 200 µl de tampão de ensaio no lugar da amostra. O tubo padrão “zero” recebeu 100 µl de anticorpo e 200 µl de tampão II no lugar da solução padrão. Os tubos com amostra receberam 200 µl de plasma e 100 µl de anticorpo, além do peptídeo marcado. A seguir, os tubos foram incubados em agitação por 18 a 22 horas, numa temperatura de 4°C. Após a incubação, adicionou-se a todos os tubos, exceto ao “total”, suspensão de carvão ativado. O tubo total recebeu 1.100 µl de tampão I, sendo 100 µl correspondentes à solução de carvão ativado e 100 µl correspondendo ao anticorpo, 200 µl de tampão II (correspondendo às amostras ou padrões), além de 100 µl de Ang II marcada.

Depois da adição de carvão, os tubos foram agitados e centrifugados a 4°C durante 20 minutos, a 2.000 rpm. Em seguida à centrifugação, o sobrenadante foi vertido e a radioatividade contada em contador-gama. As concentrações de Ang II foram fornecidas pela programação do próprio contador de radioatividade, a partir da curva-padrão construída. Essa concentração foi, então, corrigida para o volume eluído da coluna de extração.

f) Radioimunoensaio para angiotensina - (1-7)

O material já ressuspenso anteriormente foi retirado do *freezer* -20°C e colocado para descongelar em gelo. O anticorpo empregado foi produzido no laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG, na diluição de 1:20.000 em tampão de Tris-HCl 50mM, ázida sódica 0,02% com pH 7,5 (tampão I). A solução contendo Ang-(1-7) marcada com ¹²⁵I foi utilizada num volume correspondente à contagem de 6.000 cpm, sendo diluída em tampão I. A curva-padrão do radioimunoensaio foi feita adotando-se diluições progressivas a partir de uma solução estoque contendo 2 mg/ml de Ang-(1-7).

Os ensaios seguiram o seguinte protocolo (Tabela 4)

Tabela 4 – Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang-(1-7)

Soluções (µl)	Total	Branco	P0 ¹	Padrão	Amostra
Tampão I	-	100	-	--	-
Tampão de ensaio	1300	200	200	100	-
Pontos da Curva	-	-	-	100	-
Amostra	-	-	-	-	200
¹²⁵ I Ang-(1-7) ²	100	100	100	100	100
Anticorpo	-	-	100	100	100
Volume final	1400	400	400	400	400

¹Tubo Padrão “zero” – Valor de Referência

²Ang-(1-7) radioiodada

Todos os tubos de ensaio receberam 100 µl de Ang –(1-7) marcada com ¹²⁵I. O tubo branco recebeu 100 µl de tampão II de Ang II no lugar do anticorpo e 200 µl de tampão I no lugar da amostra. O tubo padrão “zero” recebeu 100 µl de anticorpo e 200 µl de tampão II de Ang II no lugar da solução padrão. Os tubos com amostra receberam 100 µl de plasma e 100 µl de anticorpo, além do peptídeo marcado. A seguir, os tubos foram incubados em agitação por 18 a 22 horas numa temperatura de 4°C. Depois da incubação, adicionou-se a todos os tubos, exceto ao “total”, suspensão de carvão ativado. O tubo “total” recebeu 1.300 µl de tampão I, sendo 100 µl correspondentes à solução de carvão ativado e 100 µl correspondendo ao anticorpo, 200 µl de tampão II correspondendo às amostras ou padrões, além de

100 µl de Ang-(1-7) marcada. Em seguida à adição de carvão, os tubos foram agitados e centrifugados a 4°C durante 20 minutos, a 2.000 rpm. Posteriormente à centrifugação, o sobrenadante foi vertido e a radioatividade contada em contador-gama. As concentrações de Ang -(1-7) foram fornecidas pela programação do próprio contador de radioatividade a partir da curva-padrão construída. Essa concentração foi então corrigida para o volume eluído da coluna de extração e multiplicada por 0,7.

4.6.3 Dosagem de Aldosterona e Vasopressina

As dosagens dos níveis plasmáticos de aldosterona e vasopressina foram realizadas nos laboratórios Hemes Pardini utilizando a técnica de radioimunoensaio. Após realização do protocolo experimental 1 apresentado acima, os animais foram sacrificados no período de 24 horas após indução da sepse para a coleta do sangue. Em seguida, o sangue foi centrifugado (5000 rpm por 10 minuto) e plasma coletado em recipiente apropriado e enviado ao setor veterinário do laboratório Hermes Pardini. Os ensaios não foram realizados na UFMG por falta de anticorpos marcados.

4.4.13 – Imuno-histoquímica

a) Preparo do rim para imunohistoquímica.

Após realização do protocolo experimental 1 apresentado acima, os animais foram sacrificados no período de 6, 12 e 24 horas após indução da sepse. Em cada um desses períodos, foram realizadas a laparotomia e toracotomia, e procedida a perfusão dos órgãos através do ventrículo esquerdo com tampão fosfato a (PBS) 0,05M, até a clarificação total dos rins. Logo após, os animais foram perfundidos com inibidores de peptidases (fenil-metilosulfonil fluoreto 10-5181 M, Pepstatina-A 0,5 x 10-5M e EDTA a 10-5182 M, todos adquiridos da Sigma-Aldrich Corp., USA) em ácido acético 0,1M, seguido de perfusão com paraformaldeído 4% em tampão fosfato a 0,2M, pH7,4. Os rins foram mantidos na solução de paraformaldeído à 4°C por 48h, incluídos em 185 parafina, seccionados com 4µm e os cortes montados em lâminas gelatinizadas.

b) Imuno-histoquímico

Para a realização de ensaio imunohistoquímico, para avaliar expressão e distribuição do receptor Mas de angiotensina (1-7), foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO K0690). Os cortes foram desparafinizados com xilol e reidratados em uma seqüência gradual de alcoóis. Em seguida, foi empregada recuperação antigênica usando solução de citrato (DAKO), pH 6 em calor úmido durante 20 minutos. O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado com H₂O₂ 1% em metanol durante 30 minutos, seguido pelo bloqueio de sítios inespecíficos com soro de bloqueio (Ultra Vison Block, Lab Vison) durante 30 min, ambos à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *over night* com o anticorpo primário policlonal de coelho Anti-Mas (diluição de 1:1000). Em seguida, foi realizada incubação durante 30 min com anticorpo secundário (Biotin Goat, Lab Vison) e incubação com o complexo estreptavidina peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vison) por 30 min. Foi utilizado como cromógeno o DAB (Diaminobenzidina, Lab Vison), em incubação durante 3 min, e contra-coloração com hematoxilina. Os controles negativos foram realizados na ausência do anticorpo primário durante todo o processo. Os cortes foram desidratados, clarificados em xilol e montados com Entelan. A quantificação da intensidade da expressão do receptor Mas no córtex e medula renal foi realizada no programa de análise de imagem KS 400 Zeiss.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm EPM$). Para a análise estatística foram utilizados testes *two-way* ANOVA seguido pelo teste de correção de Bonferroni, *one-way* ANOVA com post-test Newman Keuls e teste *t* de *Student*, empregados de acordo com o protocolo realizado. $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5- Resultados

Para melhor compreensão dos dados obtidos nesse trabalho, os resultados serão divididos em três partes. São elas:

5.1- Caracterização da sepse: Os resultados apresentados nessa seção mostram que animais submetidos ao processo cirúrgico para indução sepse polimicrobiana (Modelo de ligadura e perfuração do ceco – CLP) desenvolveram um quadro clínico que caracteriza a sepse, mais especificamente a sepse grave. Para isso, alguns parâmetros clínico-laboratoriais, como detecção de bactérias no lavado peritonial e na circulação sanguínea e alterações hemodinâmicas. foram avaliados

5.2- Caracterização do processo inflamatório e da disfunção renal induzida pela sepse: Após constatar que os animais do grupo CLP utilizados nesse estudo desenvolveram um quadro de sepse grave, a etapa seguinte foi avaliar marcadores biológicos de processos inflamatórios e de função renal com o objetivo de verificar se nos rins desses animais havia um processo inflamatório e/ou de alteração das suas funções.

5.3 Sistema renina-angiotensina na disfunção renal: Nessa seção será ilustrado o comportamento de componentes dos eixos vasoconstritor e vasodilatador do SRA durante a fase precoce de instalação da disfunção renal promovida pela sepse. Além disso, serão mostrados os dados sobre o efeito da administração da angiotensina(1-7) sobre na disfunção renal decorrente da sepse (Modelo de ligadura e perfuração do ceco – CLP).

5.1 Caracterização da sepse

5.1.1 Presença de bactérias no sangue e na cavidade peritoneal

Conforme ilustra a figura abaixo, amostras do lavado peritoneal e do sangue de animais submetidos à CLP, coletadas 6,12 e 24 h pós-cirurgia, promoveram um crescimento de bactérias quando semeadas em meio de cultura. Esses resultados mostram a presença de elevadas quantidades de bactérias na cavidade peritoneal e na corrente sanguínea de animais do grupo CLP durante todos os períodos de avaliação utilizados nesse trabalho. No lavado peritoneal e no sangue coletados dos animais do grupo controle (*sham*) não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos períodos analisados.

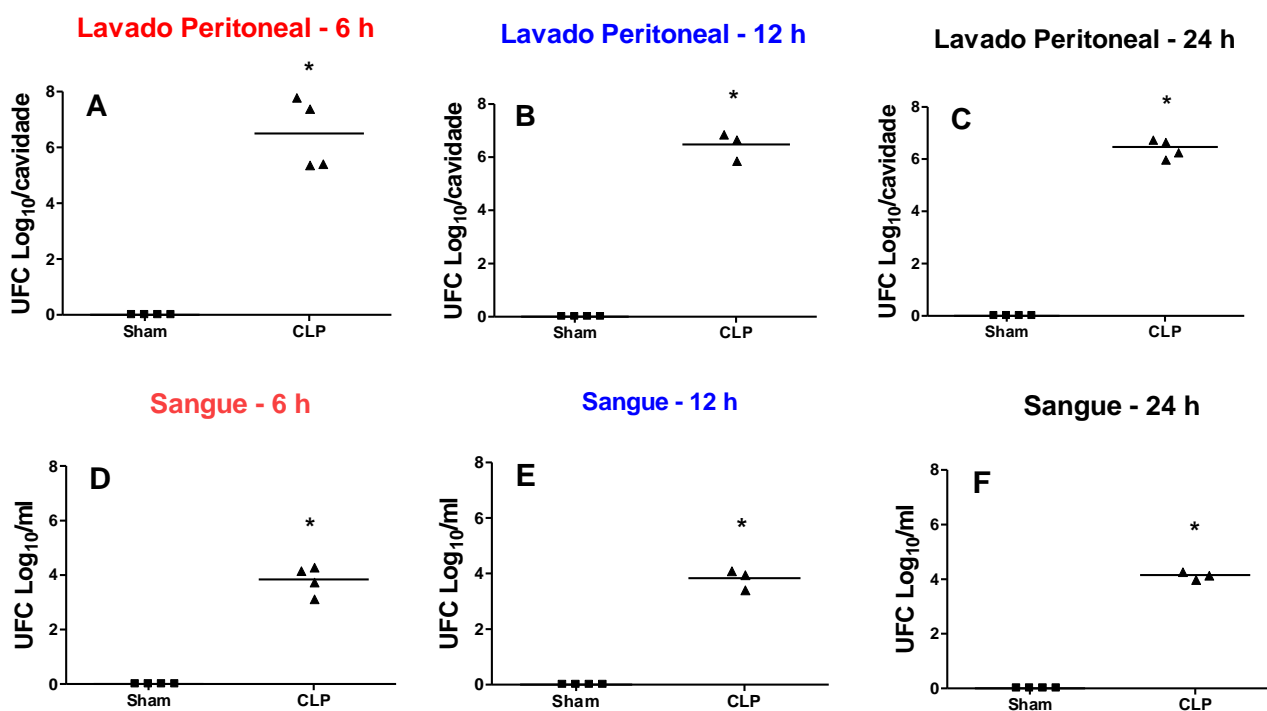


Figura 5. Quantificação de bactérias no lavado peritoneal e no sangue de ratos com sepse. Bactérias, no lavado peritoneal (A, B e C) e no sangue (D, E e F) às 6, 12 e 24 h, respectivamente, após a indução da sepse através da ligadura seguida de 10 perfurações cecais (CLP, triângulos escuros). O sangue e lavado peritoneal foram coletados sob condições estéreis, semeados em placas contendo ágar Muller-Hinton e incubados por 24 h a 37 °C. Os resultados em unidades formadoras de colônia (UFC), representam a média ± erro padrão da média (n = 4). * p < 0,05 em relação ao grupo *sham* (teste t-student, não pareado).

5.1.2 Pressão arterial média e frequência cardíaca

Igualmente ao observado em pacientes sépticos e em outros estudos de experimentação animal de sepse, foi verificado um quadro de hipotensão sistêmica acompanhada de taquicardia nos animais submetidos à CLP (grupo CLP) após 12 e 24h pós-cirurgia (Figs 6 e 7). Durante os períodos de aclimação às condições ambientais (temperatura, gaiola metabólica, pletismógrafo etc) e 6h pós-cirurgia, nenhuma diferença na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) foi verificada entre os grupos experimentais (Figs. 6 e 7A e B, respectivamente). A partir das 12 h após indução da sepse, os animais submetidos à CLP apresentaram uma queda da PAM ($72,83 \pm 1,8$ mmHg, $n = 6$), quando comparada aos valores da PAM do grupo *sham* ($103,5 \pm 3,6$ mmHg, $n = 4$) (Fig. 6C). A redução da PAM do grupo CLP foi acompanhada por aumento da FC de 357 ± 9 bpm, para 467 ± 12 bpm ($n=7$), 6 e 12 h pós-cirurgia, respectivamente (Fig. 7C). A PAM dos animais sépticos se manteve reduzida ($75 \pm 3,4$ mmHg; CLP, $n = 4$ vs $109 \pm 2,3$ mmHg; *sham*, $n = 7$) e a FC aumentada (476 ± 32 bpm; CLP ($n=4$) vs $340 \pm 4,46$ bpm; *sham*, $n= 4$) 24 h após a indução da sepse (Fig 6 e 7D). Os valores individuais de PAM e FC encontram-se nos anexos 1 e 2, respectivamente.

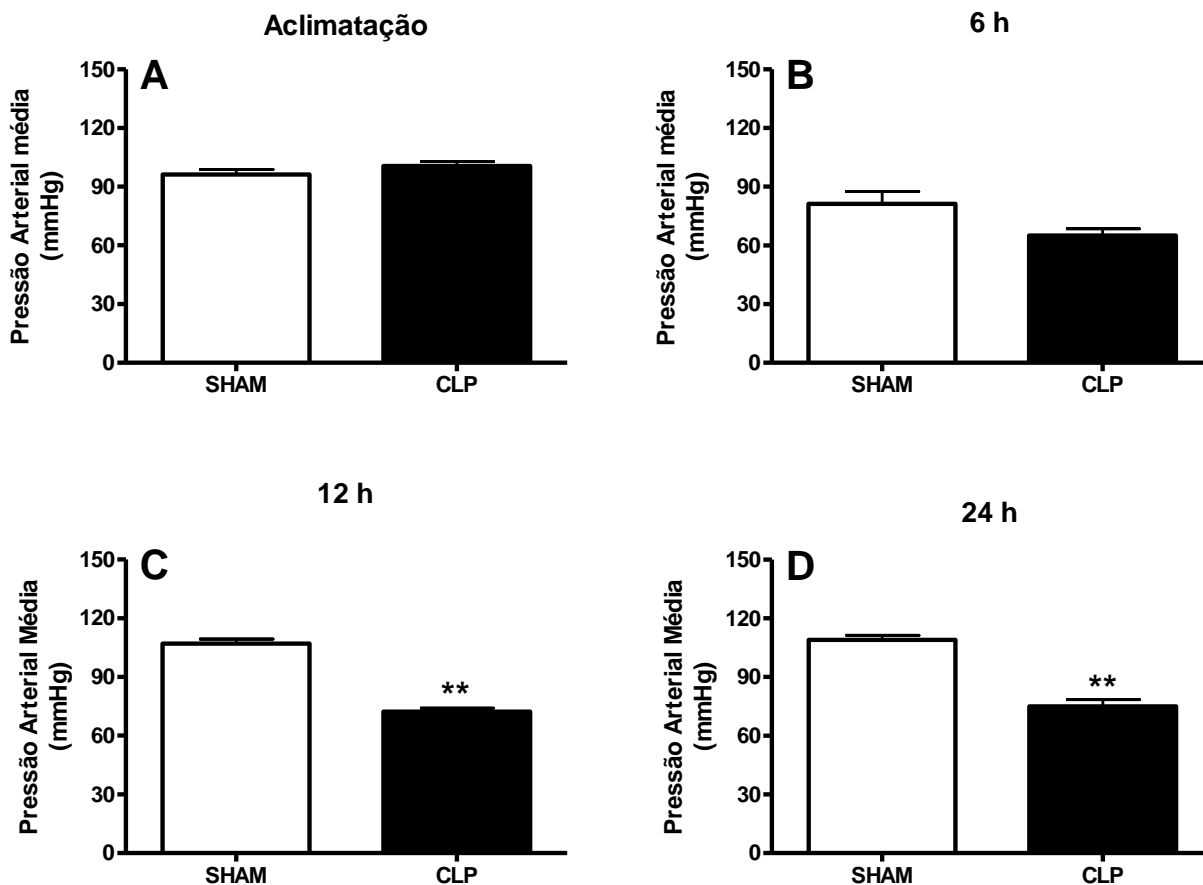


Figura 6. Pressão arterial média (PAM) após a indução da sepse por ligadura e 10 perfurações cecais (modelo CLP). Grupo CLP (ratos Wistar submetidos à CLP, barras escuras); grupo controle *sham* (ratos falso-operados, barras claras). A PAM foi medida por pletismografia de cauda durante aclimatação (A), às 6 h (B), 12 h (C) e 24 h (D) pós-cirurgia. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 4$). ** $p < 0,01$ em relação ao grupo *sham* (teste *t-student* não pareado). Anexo 1

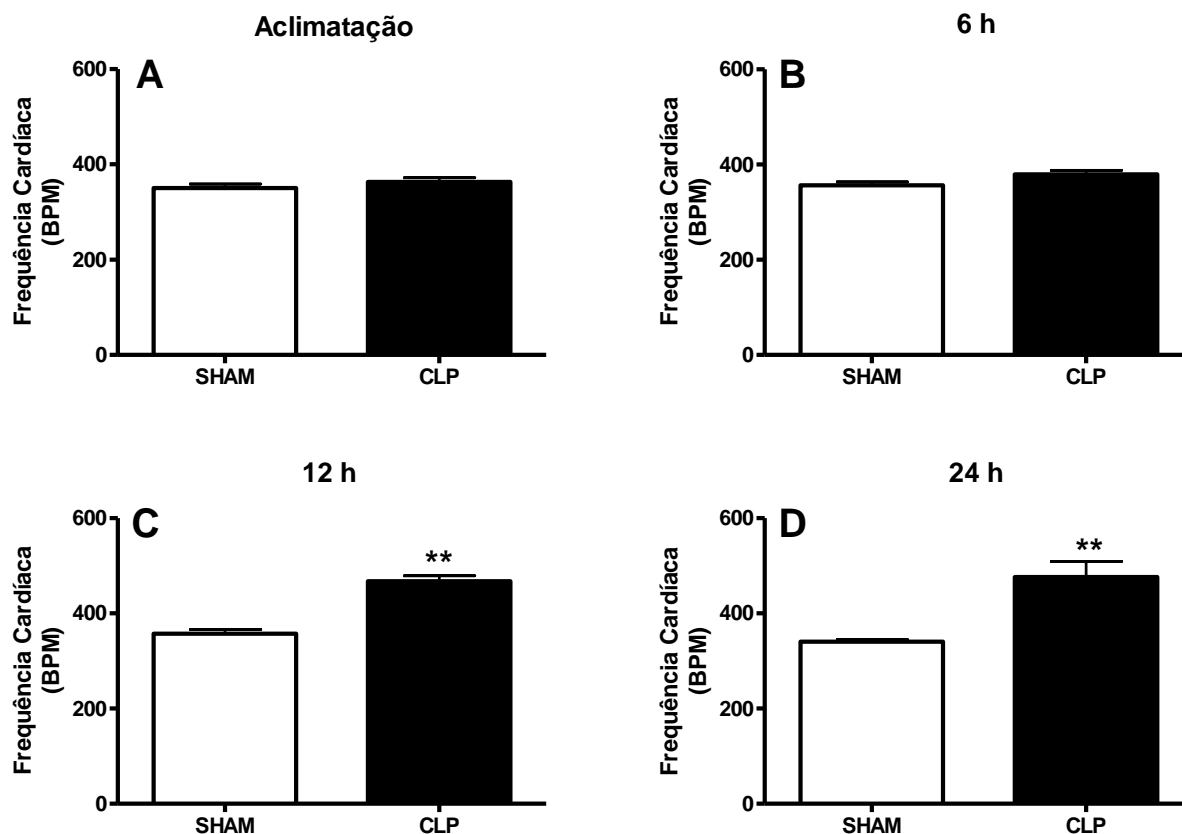


Figura 7. Frequência cardíaca de ratos após a indução da sepse através da ligadura seguida de 10 perfurações cecais pelo modelo CLP. frequência cardíaca foi medida, por pletismografia de cauda, às 6 h (B), 12 h (C) e 24 h (D). A, aclimatação; grupo *sham*, ratos falso-operados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 4-7). ** p < 0,01 em relação ao grupo *sham* (teste t-student não pareado).

5.1.3 Reatividade vascular

Como mostra figura abaixo, a reatividade vascular é alterada durante a sepse e, além disso, essas alterações possuem perfis diferentes que são dependente do leito vascular analisado. A contratilidade das artérias aortas, quando expostas crescentes concentrações do vasoconstritor α -adrenérgico fenilefrina (10^{-7} e 10^{-5} M), foi menor nas artérias aortas de ratos submetidos à CLP do que a observada no grupo Sham (Fig.8A). Contrariamente ao observado na artéria aorta, nas artérias renais a fenilefrina (10^{-7} e 10^{-5} M) promoveu maior contração desses vasos no grupo CLP, em relação a contratilidade promovida pela mesma na artéria renal dos animais do grupo sham (Fig. 8B)

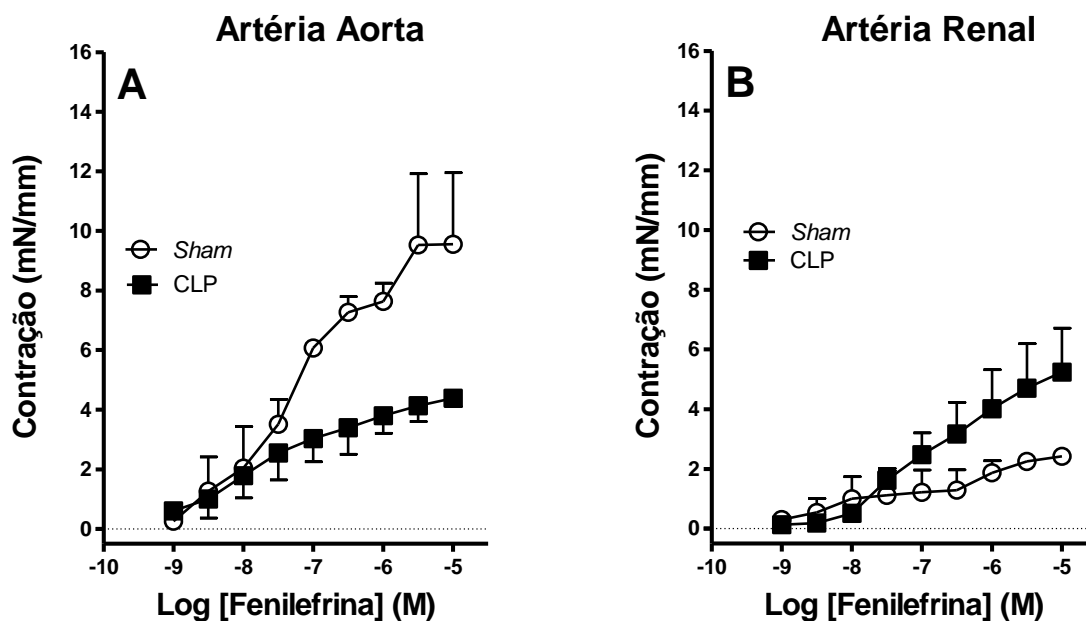


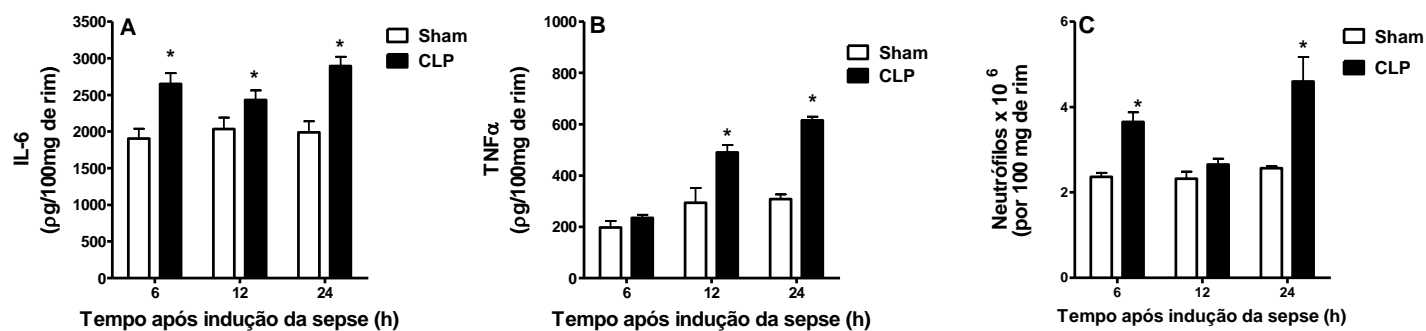
Figura 8. Contratilidade das artérias aorta (A) e renal (B) de ratos com sepse induzida por ligadura e 10 perfurações cecais (modelo CLP). Grupo CLP (barras escuras, n=3); grupo controle *sham* (ratos falso-operados, barras claras, n=4). Concentrações crescentes de fenilefrina foram incubadas com anéis de artérias aorta (A) e renal (B) de ratos, 24 h após indução de sepse. Os valores representam a média \pm erro padrão da média. (Two – way ANOVA seguida pelo *post-test* de Bonferroni).

5.2 Caracterização do processo inflamatório e da disfunção renal induzida pela sepse

5.2.1 Sepse e mediadores inflamatórios no tecido renal

A resposta inflamatória foi avaliada através da quantificação de citocinas pró-inflamatórias, IL -6 e TNF- α (Figs. 9A e B), e pelo acúmulo renal de neutrófilos, medido indiretamente através da atividade da mieloperoxidase (MPO) (Fig. 9C). De modo geral, todos os parâmetros inflamatórios avaliados estão aumentados no grupo CLP, em relação ao grupo sham. As concentrações IL -6 e MPO do tecido renal de animais submetidos à CLP estão aumentadas já nas primeiras 6h e permanece elevada até as 24h pós-cirurgia. O conteúdo renal de TNF- α está aumentado nos períodos de 12 e 24h pós-cirurgia. Os valores individuais das

dosagens encontram-se no anexo 3. As dosagens plasmáticas e urinárias desses mediadores inflamatórios foram realizadas, porém não foi possível detectar a presença dessas substâncias nesses meios biológicos em nenhum dos períodos



avaliados.

Figura 9. Conteúdo renal das citocinas IL-6 e TNF α e acúmulo de neutrófilos no rim de ratos com sepse. Após a indução da sepse pelo modelo CLP (10 perfurações cecais, barras escuras, n=5), a IL-6 (A), o TNF α (B) e o acúmulo de neutrófilo renais (C) foram determinados às 6, 12 e 24 h. Grupo *sham*, ratos falso-operados (barras claras, n=4). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 5-8). * p < 0,05 em relação ao grupo *sham* (teste t-*student* não pareado).

5.2.2 Sepse e função renal

A função renal dos animais submetidos à CLP foi avaliada através da mensuração de alguns biomarcadores clássicos de função renal (Anexo 4). De acordo com os gráficos ilustrados na figuras 10 e 11, observa-se que:

- A. Creatinina plasmática** - Nenhuma diferença significativa foi observada entre as concentrações plasmáticas de creatinina nos grupos *sham* e CLP (Fig. 10A).
- B. Uréia Plasmática**- 24 h após indução da sepse, os níveis plasmáticos de uréia do grupo CLP ($70,7 \pm 14,4$ mg/dl, n=6) estava aumentado em relação a uréia plasmática do grupo *sham* ($40,0 \pm 2,9$ mg/dl, n = 8), ver Fig. 10B.

- C. Volume urinário-** Como mostra a figura 10 C, foi observado um aumento de $0,57 \pm 0,11$ (n=39) para $19,60 \pm 2,30$ ml (n = 27) no volume urinário de animais submetidos á CLP no intervalo de 6 a 24 h pós-cirurgia. Nesse mesmo intervalo de tempo, o volume de urina produzida pelo do grupo sham variou de $0,63 \pm 0,22$ (n=18) para $5,80 \pm 0,69$ ml (n =18). O aumento da diurese no grupo CLP foi acompanhado por uma maior ingestão de água de $18,0 \pm 1,7$ para $41,0 \pm 3,4$ ml (n =15) *versus* (de $9,3 \pm 1,8$ para $29,0 \pm 3,8$ ml (n= 9) do grupo sham (Fig. 10D), refletindo num balanço hídrico que variou de $9,1 \pm 7,2\%$ (n = 6) de para $66,7 \pm 2,8\%$ (n = 11). Enquanto que os ratos *sham* apresentam um balanço hídrico relativamente constante, variando de $21,6 \pm 2,9$ para $26,9 \pm 4,8\%$, às 6 e 24 h respectivamente. (Fig. 10 E).
- D. Clearance de creatinina (CICr) -** Uma tendência redução do CICr, usado como estimativa do RFG, foi observada nos animais do grupo CLP durante todos os períodos avaliados (Fig. 10F). Os valores dos CICr encontra-se no anexo 4

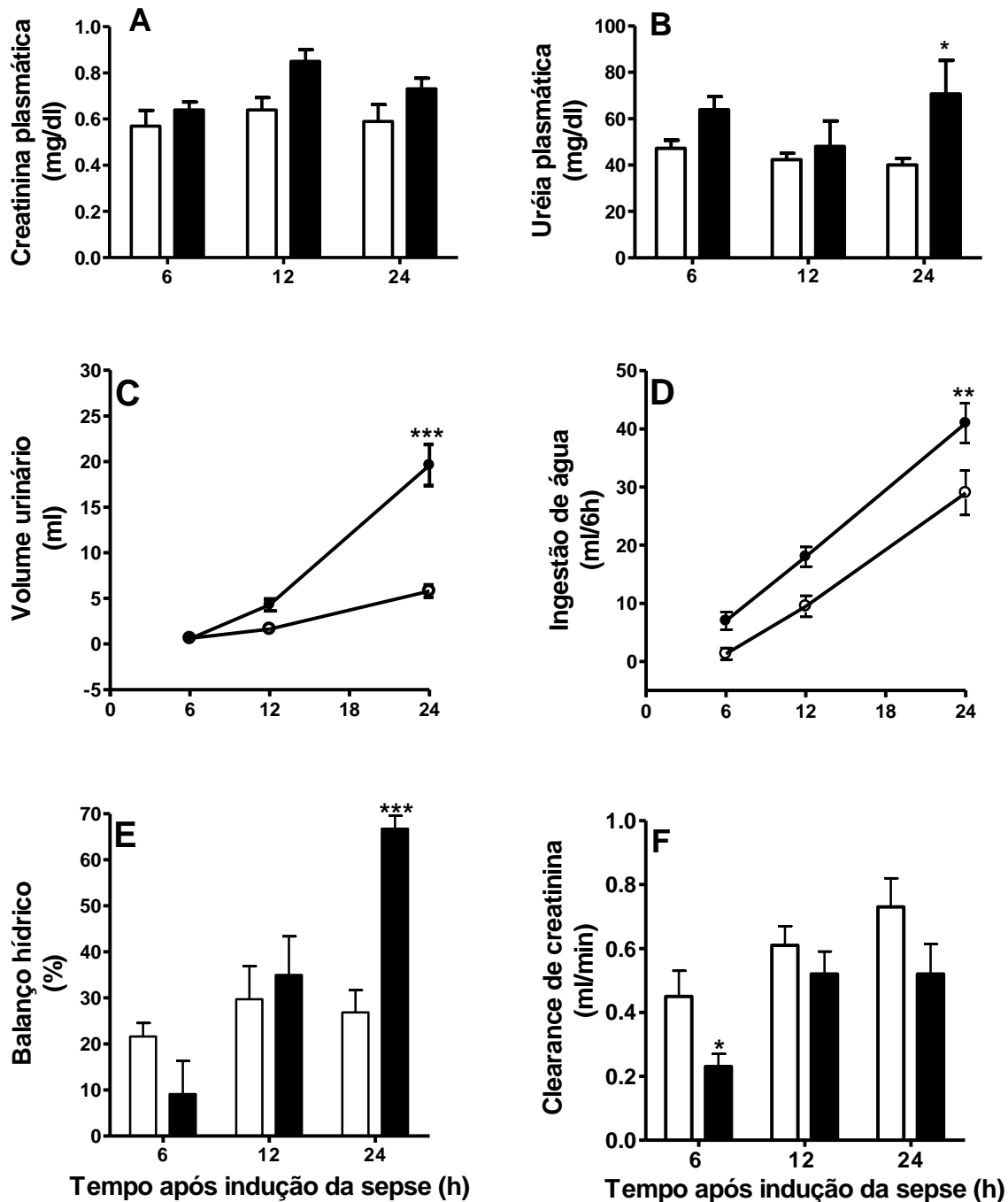


Figura 10. Efeito da sepse induzida pela ligadura e 10 perfurações cecais (Modelo CLP) sobre os seguintes parâmetros de função renal: Concentrações plasmáticas de creatinina (A) e uréia (B), volume urinário (C), ingestão de água (D) e balanço hídrico (E) e clearance de creatinina (F). Grupo CLP, ratos Wistar submetidos à CLP, está representado por círculos e barras escuras, sobre. Grupo controle ou *sham*, ratos Wistar falso-operados, está representado por círculos e barras claras. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5-8$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo *sham* (teste *t-student* não pareado).

- E- Fração de excreção de sódio (FENa⁺) e potássio (FEK⁺)-** Foi observado uma redução FENa⁺ e FEK⁺ nos animais séptico (Fig 11A e B). O valores individuais das FENa⁺ e FEK⁺ estão no anexo 4. A redução da excreção de Na⁺ é acompanhada de aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona no grupo CLP (47,0 ± 15,9; n=3 vs 5,13 ± 1,72 ng/dl, *sham*, n=4) 24h após indução da sepse (Fig.12A).
- F- Clearance Osmolar (COsm) -** O grupo CLP apresentou um valor maior de *clearance* osmolar (22,3 ± 2 ml/6h, n = 7) em relação ao grupo *sham* (9,5 ± 1,7 ml/6h, n = 9), no final das 24 h pós indução da sepse (Fig 11C). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais nos demais períodos.
- G- Clearance de água livre (CH₂O) –** Não houve diferença significativa entre os clearances de água livre entre os grupos experimentais (Fig. 12J), embora um aumento significativo da concentração plasmática de vasopressina (2,12 ± 0,07 pg/dl, *sham*; n=4) tenha sido observado nos animais sépticos (2,68 ± 0,22 pg/d; n=4) 24 h pós-cirurgia (Fig.12B).
- H- Proteinúria-** Há um aumento da excreção urinária de proteína nos animais submetidos à CLP, 24 h pós-cirurgia, evidenciado por uma relação entre as concentrações urinárias de proteína e creatinina (UP:C) maior nesses animais (1,63 ± 0,3; n=5), em relação ao grupo controle *sham* (0,60 ± 0,14; n =9), ver figura 11L. A microalbuminúria, marcador biológico de lesão glomerular precoce, também está elevada no grupo CLP (46,0 ± 8,0 mg/h, n=4) quando comparada com o grupo *sham* (10,6 ± 4,4 mg/h, n = 4) (Fig. 11M). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais nos demais períodos (Anexo 4).

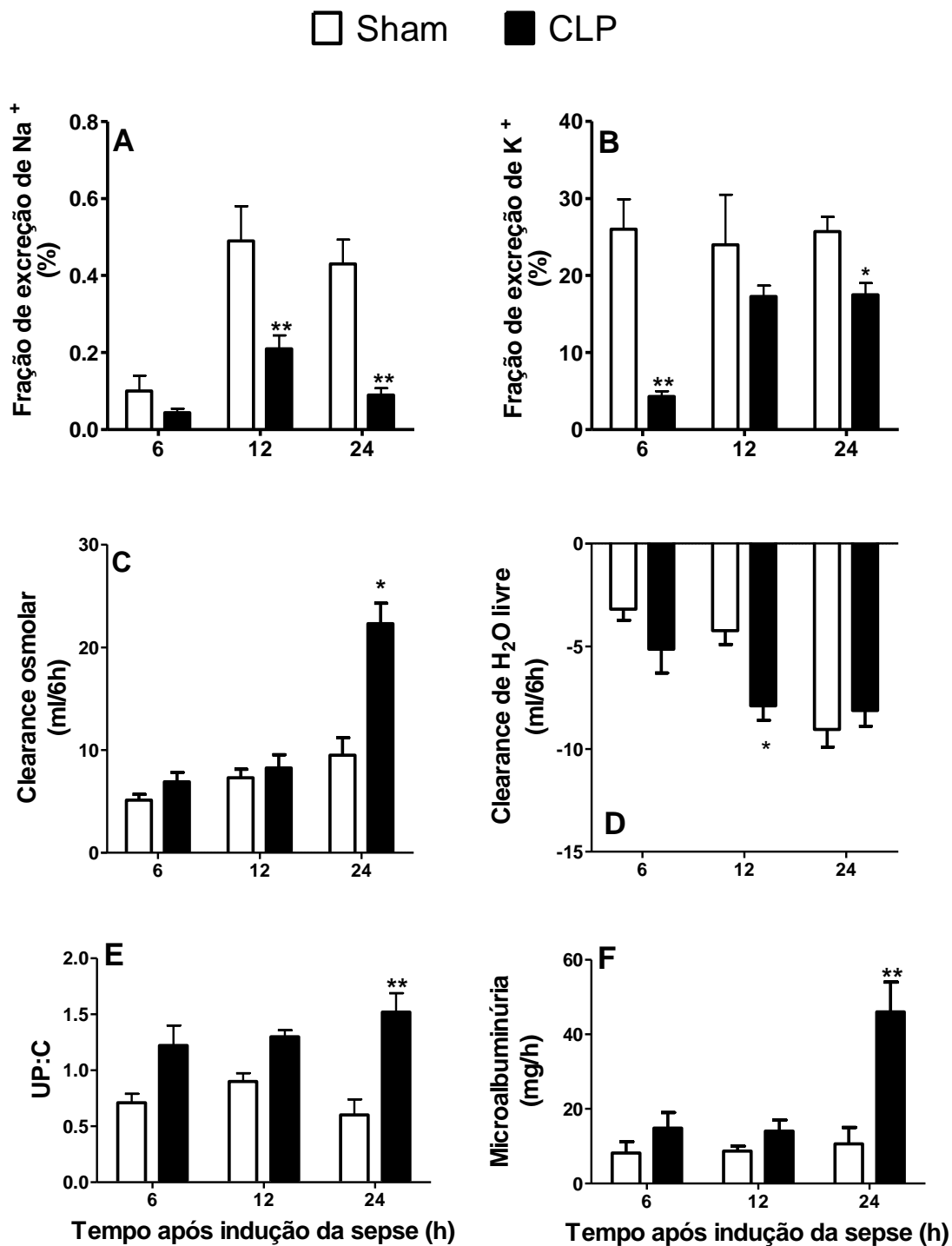


Figura 11. Efeito da sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco (10 perfurações cecais) sobre os seguintes parâmetros de função renal: Fração de excreção de sódio (G) e potássio (H), clearance osmolar (I), clearance de água livre (J), UP:C (L) e microalbuminúria (M). Grupo CLP, ratos Wistar submetidos à CLP, está representado por círculos e barras escuras, sobre. Grupo controle ou *sham*, ratos Wistar falso-operados, está representado por círculos e barras claras. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5-8$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo *sham* (teste *t-student* não pareado).

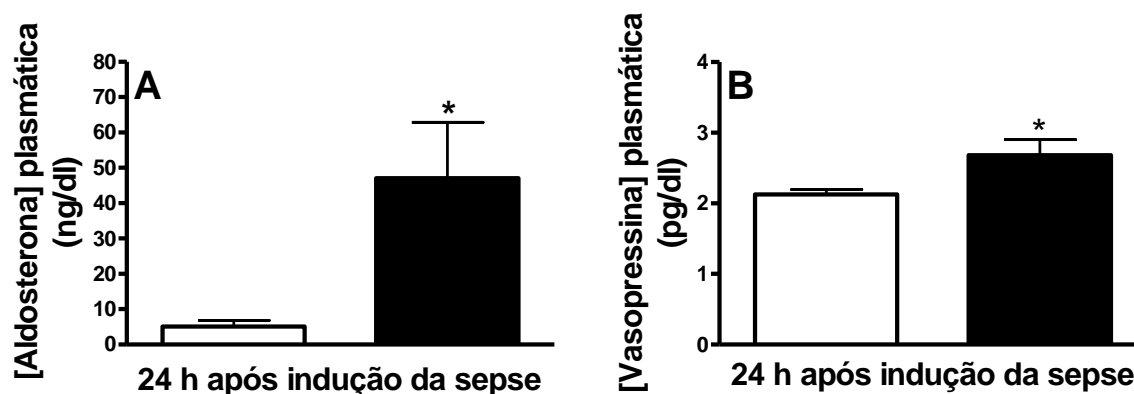


Figura 12. Concentrações plasmáticas de aldosterona (D) e vasopressina (E), 24 h após indução da sepse. As dosagens foram realizadas por radioimunoensaio. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3-4$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* (teste *t-student* não pareado).

5.3 Sistema renina-angiotensina na disfunção renal induzida pela sepse

5.3.1 Via vasoconstritora do sistema renina-angiotensina: ECA - Angiotensina II - receptor AT1

A Figura 13A mostra que a expressão de RNA mensageiro que codifica a ECA encontra-se aumentada nos rins dos animais do grupo CLP 24 h após cirurgia para indução da sepse. Os valores, em unidades arbitrárias, foram de $1,0 \pm 0,037$ ($n = 5$) nos ratos sépticos, enquanto que nos ratos *sham* foram de $0,574 \pm 0,079$ ($n = 5$). Embora uma tendência de aumento das concentrações plasmáticas de Ang II tenha sido observada no plasma de animais submetidos à CLP, não houve diferença significativa do concentrações plasmáticas de Ang II entre os grupos experimentais (Fig. 13 B). O conteúdo renal de Ang II está reduzido no grupo CLP no período de 12 h ($19,92 \pm 1,77$ pg/mg de proteína total, $n = 3$) em relação ao grupo *sham* e $46,4 \pm 1,26$ pg/mg de proteína total, $n = 3$), enquanto que no período de 24 h pós-cirurgia foi observado um aumento do conteúdo renal de Ang II no grupo CLP ($37,11 \pm 5,67$ pg/mg de proteína total *sham*; $n = 7$), quando comparado com o grupo *sham* ($22,7 \pm 3,6$ pg/mg de proteína total, $n = 7$) (Fig. 13C). Foi observada redução da expressão

de RNA mensageiro que codifica receptores AT1 de angiotensina nos rins de ratos sépticos ($0,72 \pm 0,19$ unidades arbitrárias, $n = 4$), quando comparado ao grupo *sham* ($1,2 \pm 0,1$ unidades arbitrárias, $n = 4$), 24 h após a indução da sepse (Fig. 13D).

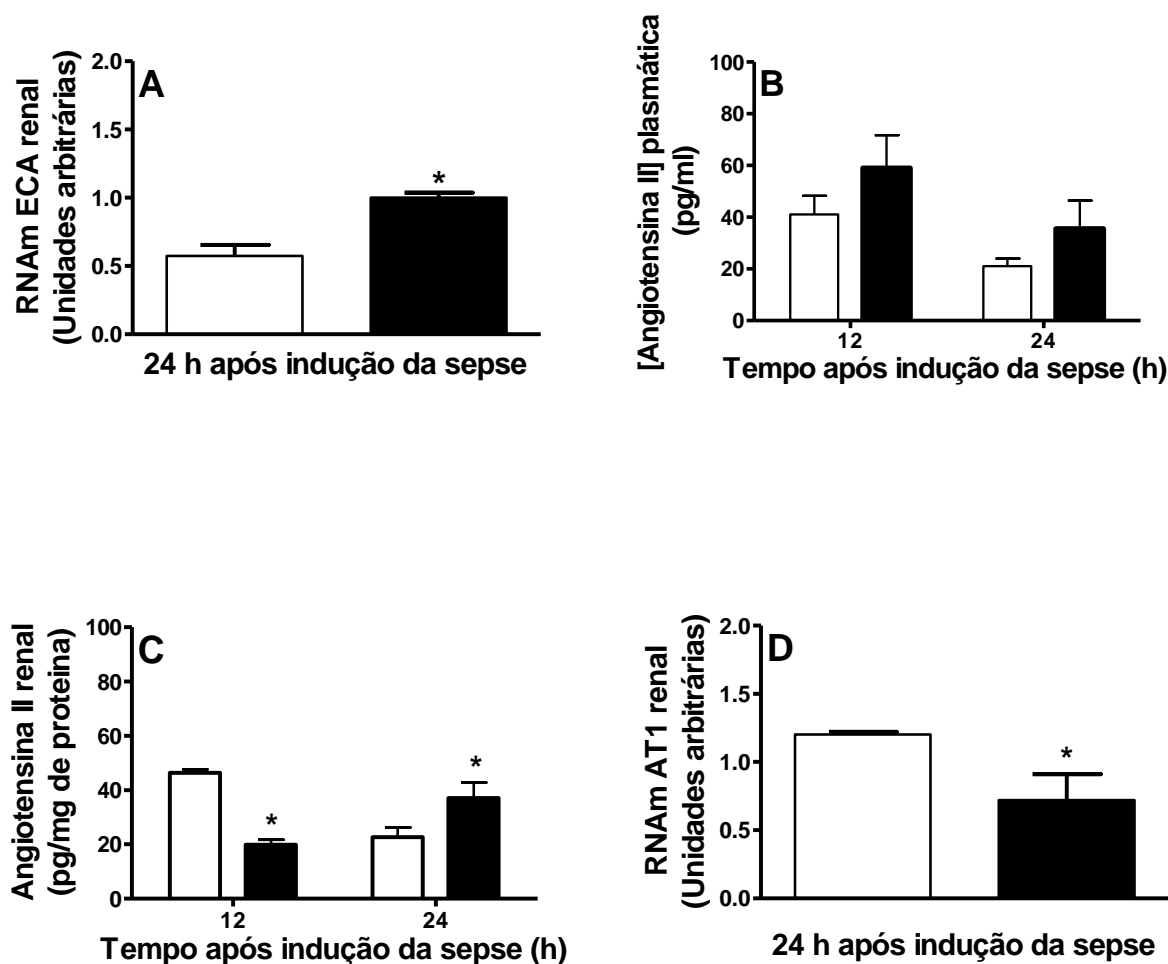


Figura 13. Efeito da sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco (10 perfurações cecais) sobre a expressão do RNAm que codifica a ECA (A) e receptor AT1 (D), sobre o conteúdo plasmático (B) e renal (C) de Ang II. A expressão de RNAm foi determinada por RT-PCR e relacionada à expressão de GAPDH. As concentrações de Ang II plasmática e renal foram determinadas por radioimunoensaio. Grupo CLP, ratos Wistar submetidos à CLP, está representado por barras escuras, sobre. Grupo controle ou *sham*, ratos Wistar falso-operados, está representado por barras claras. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* (Teste t-student não pareado).

5.3.2 Via vasodilatadora do sistema renina-angiotensina: ECA2 – Angiotensina(1-7) - receptor Mas

A Figura 14A mostra que os animais do grupo CLP apresentaram um aumento na expressão renal de RNA mensageiro que codifica a enzima ECA 2 ($1,250 \pm 0,110$ unidades arbitrárias, $n = 4$), quando comparado com a expressão da mesma no grupo *sham* ($1,000 \pm 0,035$ unidades arbitrárias, $n = 5$), 24 h após a indução da sepse. A expressão de RNA mensageiro que codifica o receptor Mas encontra-se reduzida nos rins dos ratos do grupo CLP (Fig.14B). Os valores, em unidades arbitrárias, foram de $0,680 \pm 0,072$ ($n = 5$) vs $1,000 \pm 0,124$ ($n = 5$) do grupo *sham*. Foi observado aumento da concentração plasmática de Ang-(1-7) do grupo CLP nos períodos de 12 h ($68,4 \pm 6,83$ pg/mg de proteína total, $n=3$) versus *sham* ($39,16 \pm 3,13$ pg/mg de proteína total, $n=7$) e 24 h pós-cirurgia ($44 \pm 4,47$ pg/mg de proteína total, $n = 5$) versus *sham* ($35,87 \pm 2,41$ pg/mg de proteína total, $n = 6$) (Fig. 14C). Semelhante ao observado com a expressão renal do RNA mensageiro de AT1 (Fig. 13D), foi observada uma redução da expressão do RNA mensageiro que codifica os receptores Mas nos rins dos animais sépticos ($0,68 \pm 0,07$ unidades arbitrárias, $n = 5$), quando comparado ao grupo *sham* ($1,0 \pm 0,12$ unidades arbitrárias, $n = 4$), 24 h após a indução da sepse(Fig. 14D).

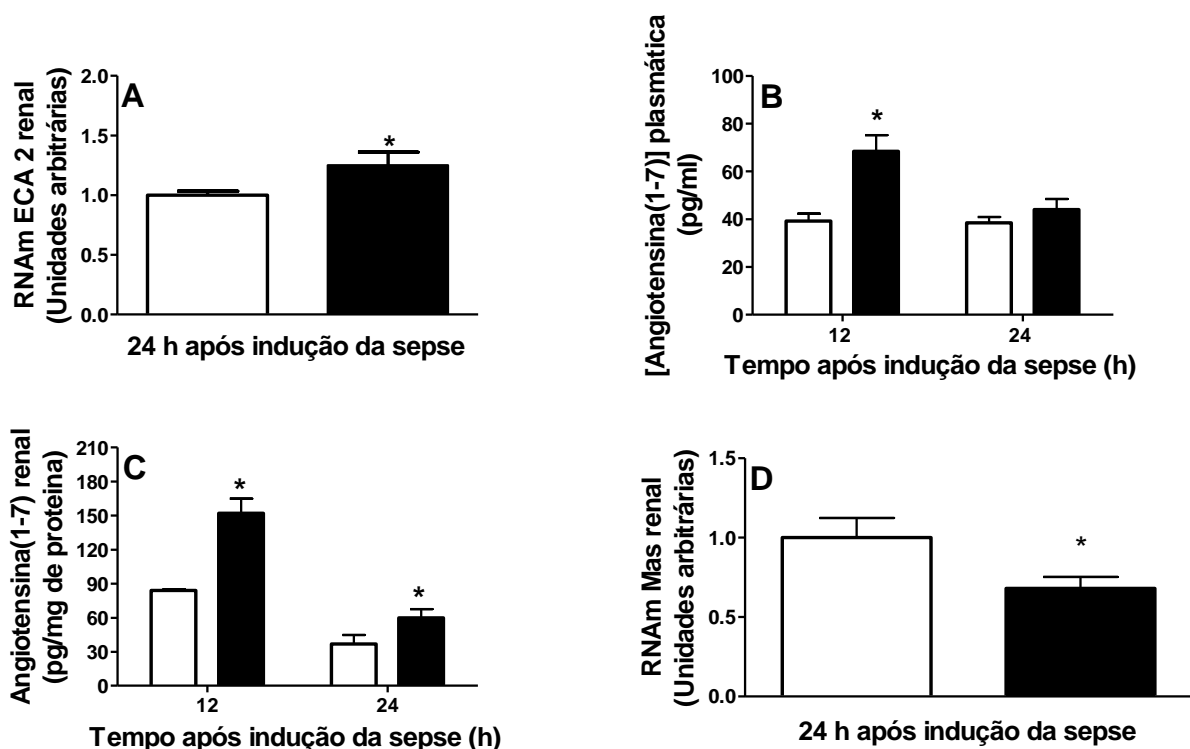


Figura 14. Efeito da sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco (10 perfurações cecais) sobre a expressão do RNAm que codifica a ECA 2 (A) e receptor Mas (D), sobre o conteúdo plasmático (B) e renal de Ang-(1-7) (C). A expressão de RNAm, 24 h pós-sepse, foi determinada por PCR em tempo real e relacionada à expressão de GAPDH. A concentração de Ang-(1-7) foi determinada por radioimunoensaio. Grupo CLP, ratos Wistar submetidos à CLP, está representado por barras escuras, sobre. Grupo controle ou *sham*, ratos Wistar falso-operados, está representado por barras claras. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* (Teste *t-student* não pareado).

Nenhuma diferença estatística nas razões ECA/ECA2 e AT1/Mas renais foi observada entre os grupos CLP e Sham (Fig. 15A e D, respectivamente). Como mostram as figuras 15B e C, a razão AngII/Ang-(1-7) plasmática encontra-se estatisticamente igual entre os grupos CLP e Sham no período de 12h pós-cirurgia e elevada nos animais sépticos ($0,96 \pm 0,3$; $n=3$) em relação ao grupo *sham* ($0,53 \pm 0,3$, $n=6$), 24h após indução da sepse. De forma inversa, a razão AngII/Ang-(1-7) renal está reduzida no período de 12 h pós-cirurgia no grupo CLP ($0,13 \pm 0,03$; $n=3$)

em relação ao grupo sham ($0,56 \pm 0,02$; $n=3$) e sem diferença estatística entre os grupos experimentais ($0,68 \pm 0,13$ Vs $0,56 \pm 0,16$ CLP e sham, respectivamente, $n=3$), no período de 24h pós-cirurgia

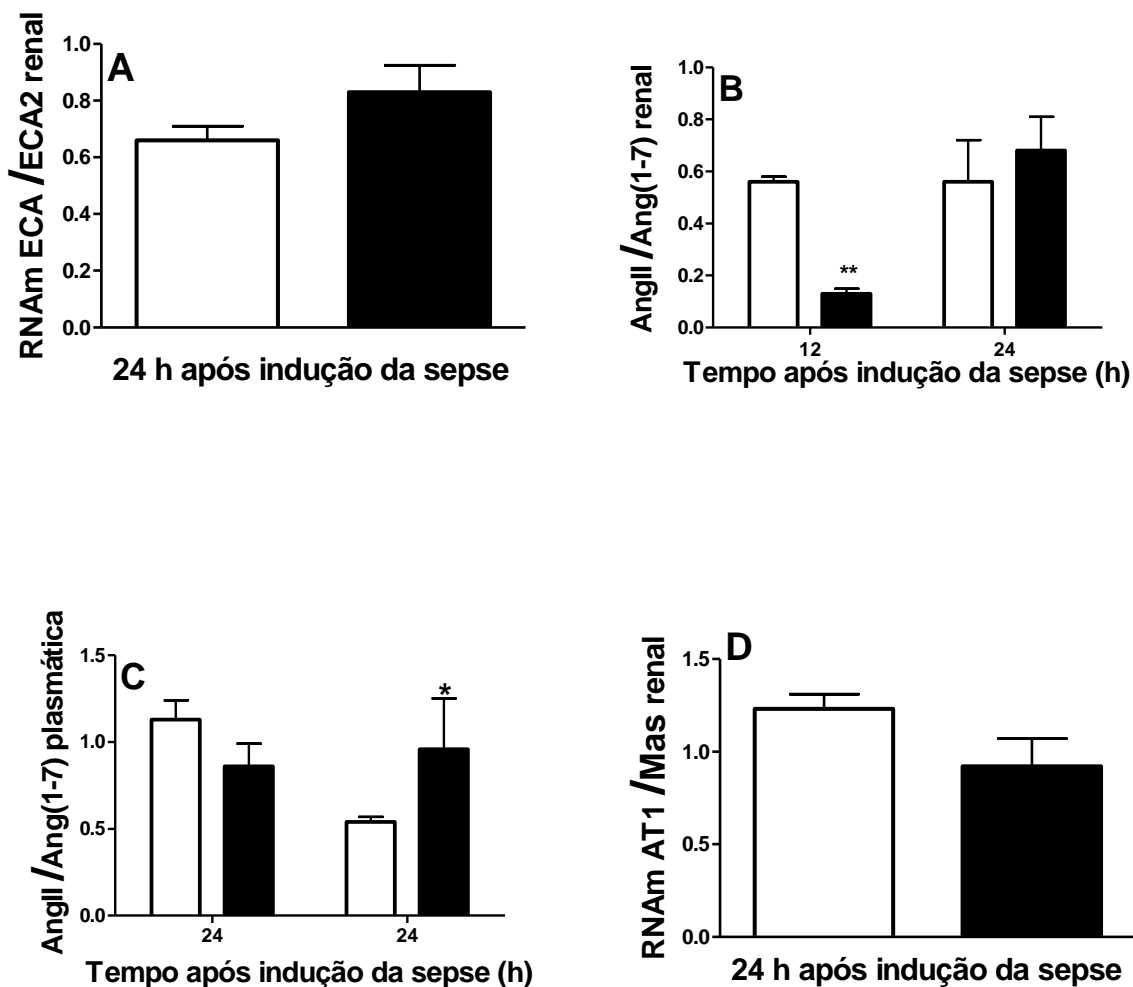


Figura 15. Razões entre o RNAm para as enzimas renais ECA/ECA2 (A) e dos conteúdos renal (B) e plasmático (C) de angiotensina II/angiotensina(1-7). Grupo CLP, ratos Wistar submetidos à CLP, está representado por barras escuras, sobre. Grupo controle ou *sham*, ratos Wistar falso-operados, está representado por barras claras. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* (Teste t-student não pareado).

As Figuras 16 e 17 apresentam resultados obtidos pela técnica de imunohistoquímica para receptores Mas na região cortical e medular de rins de ratos do grupo *sham* (coluna de lâminas à esquerda) e do grupo CLP (coluna de lâminas à direita) às 6, 12 e 24 h após a indução da sepse. Nos gráficos apresentados à direita das lâminas, está a quantificação da intensidade de expressão do receptor Mas, realizada usando o programa de análise de imagem KS 400 Zeiss. Conforme mostra a Figura 16, o receptor Mas está distribuído na membrana das células dos túbulos proximais e distais (setas pretas) e ainda, de maneira bem menos intensa, nos glomérulos (seta vermelha) de ambos os grupos. A intensidade de marcação do receptor Mas permanece relativamente constante no grupo *sham*, variando de 394 ± 40 para $310 \pm 23 \mu\text{m}^2$ no intervalo entre 6 e 24h, respectivamente. De forma diferente, no grupo CLP, a intensidade de marcação reduz de 500 ± 60 para $243 \pm 13 \mu\text{m}^2$ ($n = 4$) durante o mesmo intervalo de tempo, sugerindo redução na expressão de receptores Mas na região cortical, 24 h após indução (Fig. 13).

Em relação ao efeito da sepse sobre a expressão do receptor Mas na região medular, animais do grupo CLP apresentaram uma redução da intensidade de marcação (desses receptores, nessa região) mais intensa e precoce do aquela observada na região cortical dos mesmos. A partir das 12 h após indução da sepse, a região medular dos rins de ratos sépticos apresentou uma menor expressão de receptores Mas ($253 \pm 24 \mu\text{m}^2$, $n = 3$) em relação ao grupo *sham* ($595 \pm 40 \mu\text{m}^2$, $n=3$). Essa redução na expressão medular dos receptores Mas manteve-se até o final das 24 h ($502 \pm 133 \mu\text{m}^2$ vs, 247 ± 30 grupos *sham* e CLP respectivamente, $n = 4-3$, $p < 0,08$)

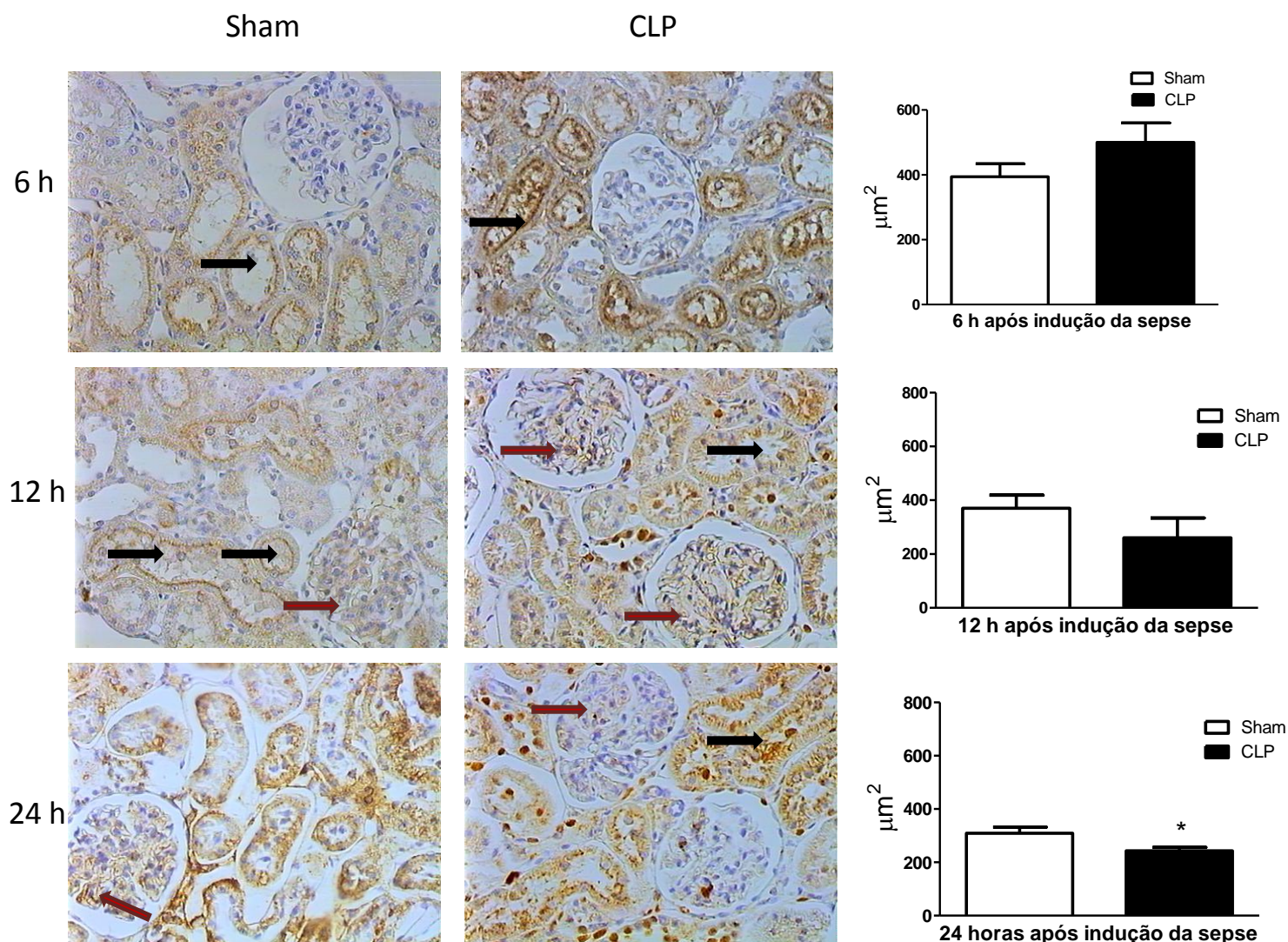


Figura 16. Cortes histológicas (40X) da região cortical de rins de ratos dos grupos *sham* (lâminas à esquerda) e CLP (lâminas à direita) após imunohistoquímica para o receptor Mas de angiotensina(1-7). As setas pretas indicam marcação de receptores Mas na membrana de células tubulares proximais e distais; setas vermelhas indicam marcação dos receptores Mas nos glomérulos. Os gráficos representam a quantificação da intensidade de expressão do receptor Mas nos períodos de 6, 12 e 24 h pós-indução da sepse. A quantificação foi feita usando o programa de análise de imagem KS 400 Zeiss. Grupo falso-operado ou sham (barras brancas) e grupo CLP (barras escuras). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n = 3-5). * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* (teste t-student, não pareado).

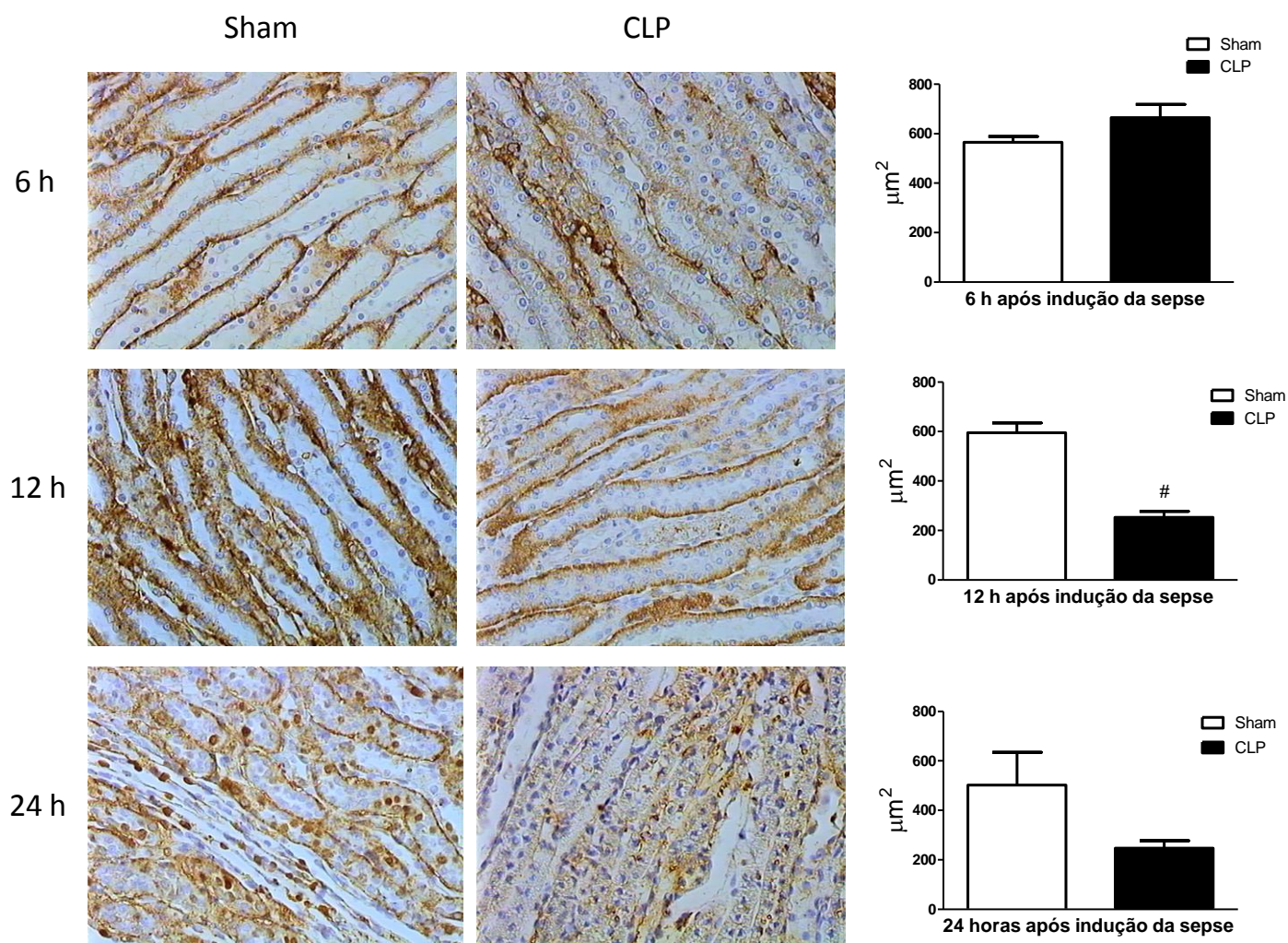


Figura 17. Cortes histológicos (40X) da região medular de rins de ratos dos grupos *sham* (lâminas à esquerda) e CLP (lâminas à direita) após imunohistoquímica para o receptor de angiotensina(1-7), Mas. Os gráficos representam a quantificação da intensidade de expressão do receptor Mas nos períodos de 6, 12 e 24 h pós-indução da sepse. A quantificação foi feita usando o programa de análise de imagem KS 400 Zeiss. Grupo falso-operado ou sham (barras brancas) e grupo CLP (barras escuras). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3-5$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* (teste *t-student*, não pareado).

5.3.3 Angiotensina-(1-7) no tratamento da disfunção renal promovida pela sepse

Uma única administração oral do composto formado por Ang-(1-7), na dose de 50µg/kg, incorporada ao polímero β-dextrina não teve efeito na hemodinâmica sistêmica tanto do grupo controle (sham) como do grupo CLP, uma vez que não promoveu alterações na pressão arterial média e na frequência cardíaca dos animais do grupo controle, assim como não alterou o quadro de hipotensão e taquicardia promovida pela sepse dos animais do grupo CLP. (Figs. 18 A e B)

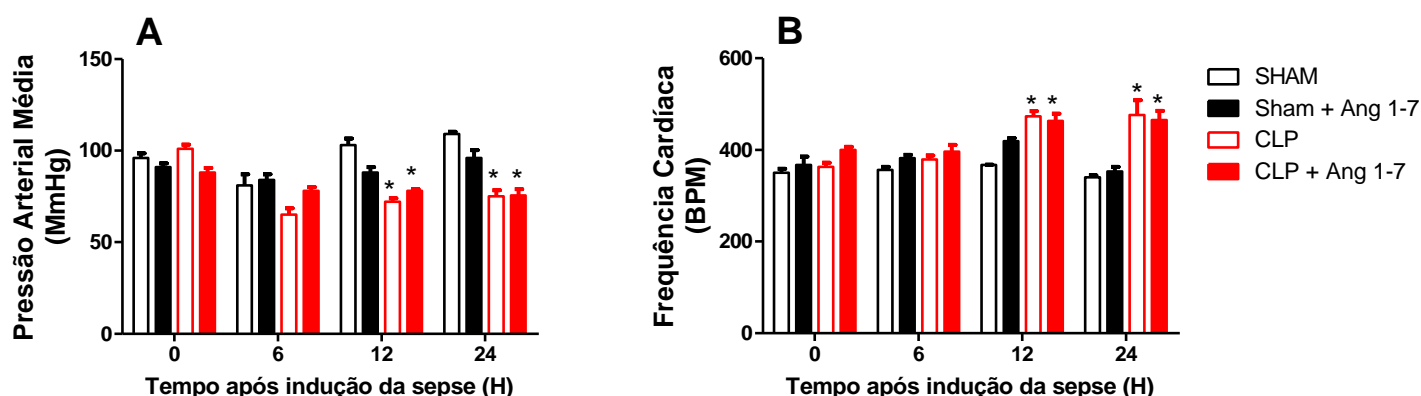


Figura 18. Efeito da administração única, via oral, da angiotensina (1-7) incorporada a ciclodextrina, na dose de 50µg/kg, sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) de ratos Wistar após procedimento cirúrgico para indução da sepse modelo CLP (10 perfurações cecais). Os valores, expressos em mmHg (A) e em BPM (B) representam a média ± erro padrão da média, n=4-7. * p < 0,01 em relação ao grupo sham (n=4) (Two – way ANOVA seguida pelo *post-test* de Bonferroni).

Nenhuma diferença significativa nas concentrações renais das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF-α, e na atividade da mieloperoxidase foi observada nos rins dos animais controles do grupo sham tratados com angiotensina (1-7) quando comparado ao grupo de animais sham não tratado (Fig. 19). Entretanto, o grupo de animais CLP tratados com ang (1-7) apresentaram menores concentrações renais de TNF-α (450 ± 21 pg/100mg de tecido renal, n=5) em relação ao grupo CLP não tratado (615 ± 14,7 pg/100mg de tecido renal, n=5), 24h após a indução da sepse (Fig. 29 A). A figura 19B mostra que os níveis renais de IL-6 encontram-se reduzidos nos animais CLP tratados (2429 ± 135 pg/100mg de tecido renal; n=4) em relação aos CLP não tratados (1725 ± 132 pg/100mg de tecido renal; n=4), a partir das 12h após

indução da sepse e essa redução permanece até as 24h após indução da sepse (2893 ± 130 pg/100mg de tecido renal; CLP, $n=4$ vs 2326 ± 91 pg/100mg de tecido renal; CLP + Ang (1-7), $n=4$). Além disso, a migração de neutrófilos está reduzido nos rins de animais CLP tratados com angiotensina (1-7) ($2,73 \pm 0,025 \times 10^6$ neutrófilos por 100mg de tecido, $n=5$) em relação ao grupo CLP sem tratamento ($4,6 \pm 0,56 \times 10^6$ neutrófilos por 100mg de tecido, $n=5$), sem diferença significativa para os grupos de animais não sépticos, como ilustra a figura 19C.

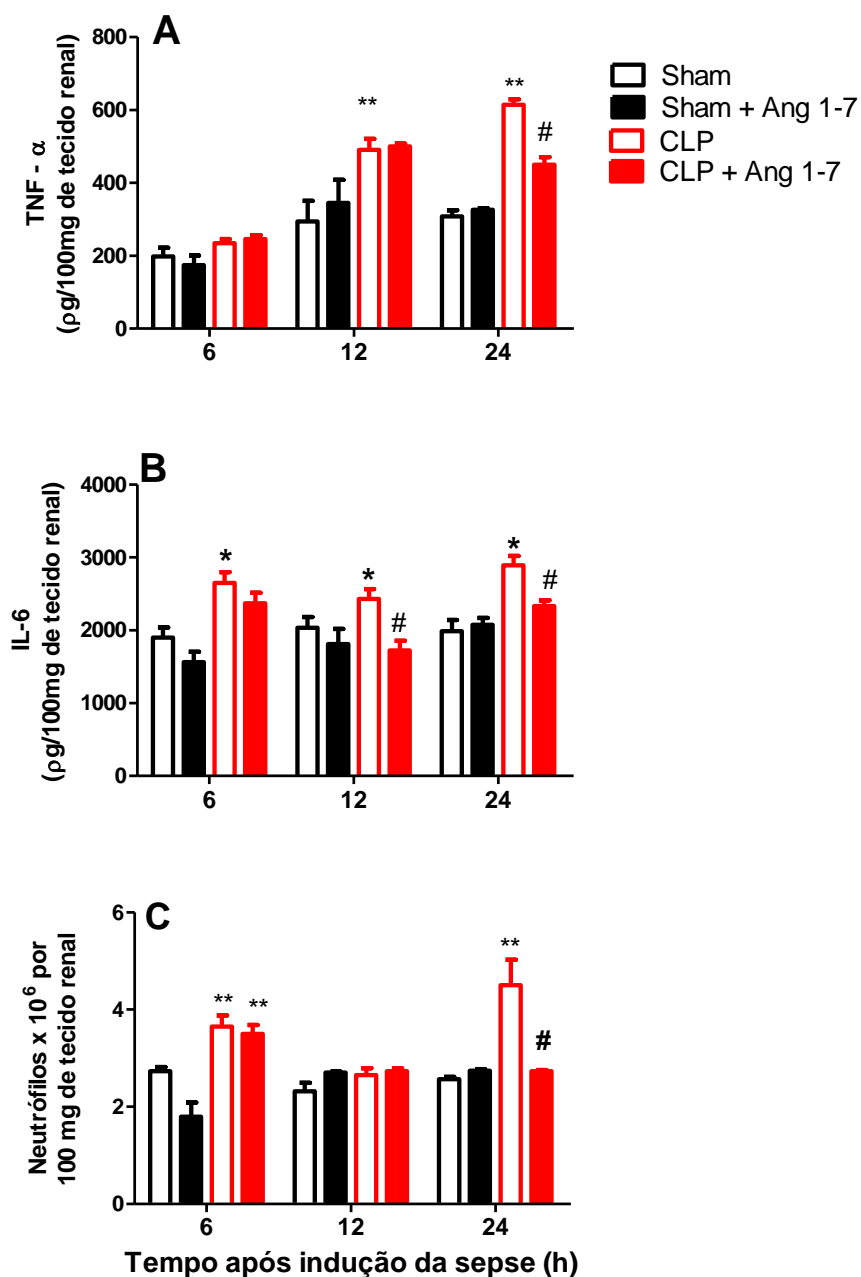


Figura 19. Efeito da administração única, via oral, da angiotensina-(1-7) incorporada a ciclodextrina, na dose de 50µg/kg, sobre nos níveis renais de IL-6 (A) e TNF α (B), expresso em pg/ por 100 mg de tecido renal, e o acúmulo de neutrófilo no rim (C), medido indiretamente pela da atividade da mieloperoxidase, 6,12 e 24 h após procedimento cirúrgico para indução da sepse. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, * p < 0,05 e ** p < 0,01, em relação ao grupo sham; # p < 0,05, em relação ao grupo CLP) (Two – way ANOVA seguida pelo *post-test* de Bonferroni)

A figura 20 ilustra os efeitos da administração de com Ang-(1-7) sobre os seguintes parâmetros de função renal (ver anexo 4):

- A. Volume urinário** – A administração de Ang-(1-7) não alterou, significativamente, o volume urinário de animais do grupo controle em nenhum dos períodos avaliados. Em animais sépticos, a Ang-(1-7) inibiu o aumento da diurese induzida pela sepse, 24 h pós-cirurgia. Ratos sépticos não tratados com Ang-(1-7) produziram um volume urinário de $19,63 \pm 2,25$ ml (n=27), enquanto ratos sépticos tratados com o heptapeptídeo produziram $7,8 \pm 1,8$ ml (n=9) (Fig.20A).
- B. Creatinina Plasmática** – Não foi observado nenhuma alteração significativa nos valores das concentrações plasmáticas de creatinina tanto dos animais controle (sham) como sépticos (CLP) tratados com Ang-(1-7) em nenhum dos períodos avaliados (Fig.20B).
- C. Clearance de creatinina (CICr)** - A administração angiotensina (1-7) não teve efeito significativo no clearance da creatinina dos animais sham, enquanto que nos animais sépticos, o tratamento com ang (1-7) inibiu a redução do clearance da creatinina promovida pela sepse. Nos períodos de 12 e 24 h, o grupo CLP apresentou CICr de $0,54 \pm 0,07$ e $0,52 \pm 0,093$ ml/min (n=9), respectivamente, ao passo que os CICr do grupo CLP tratado com Ang-(1-7), nos mesmos períodos, foram $0,98 \pm 0,07$ e $1,056 \pm 0,1344$ ml/minn (n=8), respectivamente (Fig.20C).
- D. Fração de Excreção de sódio (FENa⁺)** – Conforme ilustra a figura 20D, a administração de Ang-(1-7) não alterou, significativamente, a FENa⁺ dos animais sham e CLP, quando comparada com seus respectivos grupos controles (Sham e CLP sem tratamento). Embora possa ser observado uma tendência na redução

da FENa⁺ promovida pela administração de heptapeptídeo em ratos do grupo sham, não foi constatado diferenças estatisticamente significante em relação aos animais sham não tratados. Da mesma forma, animais sépticos tratados com a Ang-(1-7) não teve uma FENa⁺ diferente, estatisticamente, da excreção de Na⁺ dos animais sépticos não tratados. Como visto anteriormente, a FENa⁺ dos grupo CLP estava bastante reduzida, em relação ao grupo sham, porém sem diferença com o grupo sham tratado com a Ang-(1-7).

- E. Fração de Excreção de potássio (FEK⁺)** – Não houve diferença na FEK⁺ entre os grupos sham e sham tratados com Ang-(1-7). A FEK⁺ do grupo CLP é menor ($10 \pm 1,5$ vs $17 \pm 4\%$) que a observada nos demais grupos sham ($26,74 \pm 1,7\%$; n=8), Sham + Ang-(1-7) ($23 \pm 2,6\%$; n=5) e CLP ($23,6 \pm 3,8\%$; n=12) (Fig.20E)
- F. O Clearance Osmolar (COsm)** – A administração da Ang-(1-7) reduziu o COsm animais controles do grupo sham, nos períodos de 12 h ($7,27 \pm 0.82$ ml/12h, n=7) e 24 h ($9,5 \pm 1,7$ ml/24h. n=8) para $2,86 \pm 0.57$ ml/12h (n=4) e $2,8 \pm 0.6$ ml/24h (n=4), respectivamente. Nos animais sépticos, não foi observado diferença significativa entre os COsm dos grupos CLP e CLP + Ang-(1-7) como mostra a figura 20F.
- G. O Clearance de água livre (CH₂O)** – A administração de Ang-(1-7) não alterou o CH₂O tanto em animais controles como sépticos, quando comparado ao CH₂O dos seus respectivos grupos controles (Sham e CLP), ver Fig.20G.
- H. Proteinúria** – A Ang-(1-7) reduziu a proteinúria dos animais séptico (CLP) sem alterar o proteinúria de ratos controles (Sham). Como mostra a figura 20H, a U:PC de animais sépticos sem tratamento foi maior em todos os períodos avaliados, em relação a UP:C dos animais sépticos tratados com Ang-(1-7), ver anexo 4.

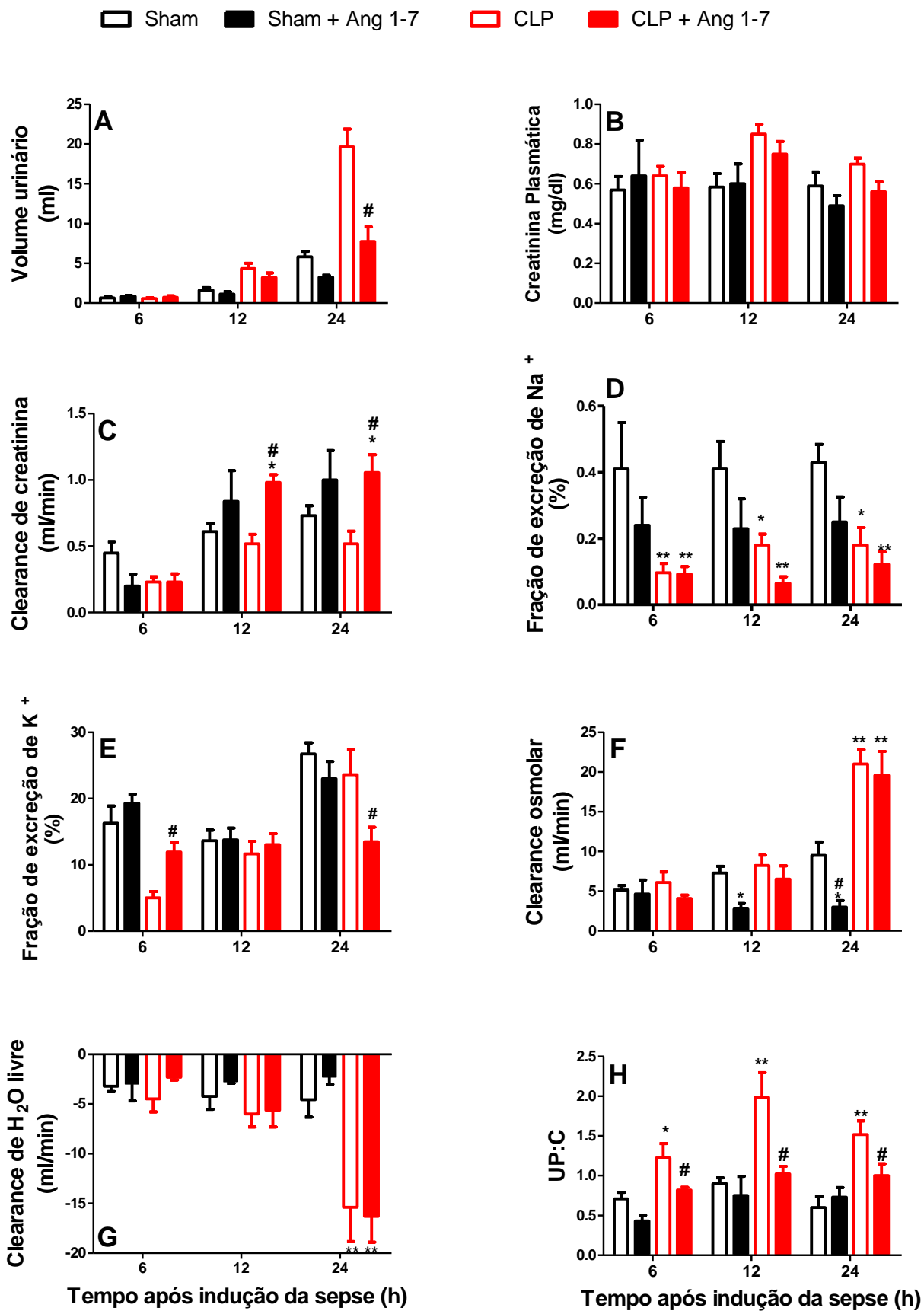


Figura 20. Efeito da administração única, via oral, da angiotensina (1-7) incorporada a ciclodextrina, na dose de 50µg/kg, sobre volume urinário (A), creatinina plasmática (B), clearance de creatinina (C), fração de excreção de sódio (D), fração de excreção de potássio (E), clearance osmolar (F), clearance osmolar (G) e relação urinária proteína/creatinina (UP:C) (H) de ratos sham e CLP. Os resultados representam a média ± erro padrão da média, * p < 0,05, ** p < 0,01 em relação ao grupo controle sham e #p < 0,05 em relação ao grupo CLP) (Two – way ANOVA seguida pelo *post-test* de Bonferroni).

A administração de Ang-(1-7) reduziu a excreção urinária de microalbumina, um marcador biológico de lesão glomerular, dos animais séptico de (46 ± 8 mg/h, n=4) em relação aos animais sépticos não tratados com o peptídeo (21 ± 2,7 mg/h, n=6), 24h após indução da sepse (Fig.21). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os valores de microalbuminúria dos ratos controle (sham) tratados ou não com o heptapeptídeo, conforme mostra abaixo

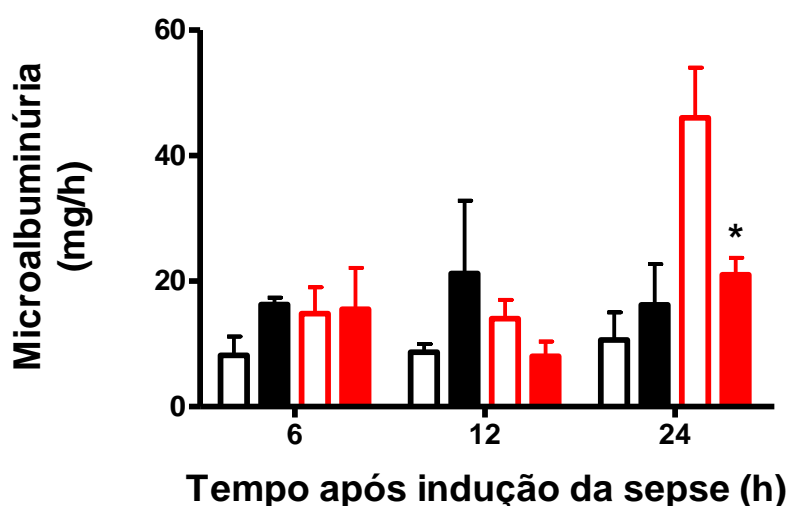


Figura 21. Efeito da administração única, via oral, da angiotensina (1-7) incorporada a ciclodextrina, na dose de 50µg/kg, sobre a microalbuminúria (G) 6, 12 e 24 horas após procedimento cirúrgico para indução da sepse. Os resultados representam a média ± erro padrão da média, * p < 0,05 em relação aos respectivos grupos controles sham e CLP (Two – way ANOVA seguida pelo *post-test* de Bonferroni)

Com a finalidade de verificar se o efeito renoprotetor de uma única administração de angiotensina (1-7) (50µg/kg) sobre a disfunção renal promovida pela sepse, observada em animais sépticos, permaneceria por um tempo superior ao período de 24 horas, alguns parâmetros de função renal dos ratos sépticos sobreviventes tratados com a Ang-(1-7) foram reavaliados 7 dias após a indução da sepse. Durante esse período (7dias), os ratos permaneceram, individualmente, em gaiolas metabólicas com livre acesso a água e ração e sem nenhum tratamento adicional. Ao final dos 7 dias, uma nova coleta de sangue e urina foi feita para a avaliação da função renal. Conforme mostra a figura abaixo, ratos sobreviventes do grupo CLP que não foram tratados com a Ang- (1-7) não apresentaram diferenças significativas, em relação aos demais grupos experimentais, na maioria dos parâmetros avaliados, evidenciado um processo de recuperação da função renal desses animais. Entretanto, dois parâmetros continuam alterados nesse grupo experimental, que são: o volume urinário (Fig.22A), que continua aumentado ($23,4 \pm 3.15$ ml, n=5) em relação ao grupo sham (15 ± 2 ml, n= 5) e excreção urinária de proteína, cuja UP:C dos animais sobreviventes do grupo CLP ($2,6 \pm 0,22$, n=4) continua aumentada quando comparada com a UP:C dos animais sham ($1 \pm 0,09$; n= 5) (Fig. 22F). A figura 22 mostra também que não há diferença significativa entre valores de todos dos parâmetros reavaliados dos animais sépticos tratados com Ang-(1-7) e do grupo controle sham. Além disso, quando comparado com o grupo CLP não tratado, tanto a diurese ($15 \pm 1,9$ ml, n= 4) como a proteinúria ($1,15 \pm 0,04$; n= 5) encontram-se reduzidos e similares ao grupo sham. Esses dados evidenciam que uma única administração de Ang- (1-7) foi suficiente para garantir a integridade da função renal dos ratos sépticos tratados e que sua ação na proteção da lesão glomerular, nas primeiras horas após indução da sepse, é fundamental para que não haja a instalação e progressão da disfunção renal.

Sham
 Sham + Angiotensina (1-7)
 CLP
 CLP + Angiotensina (1-7)

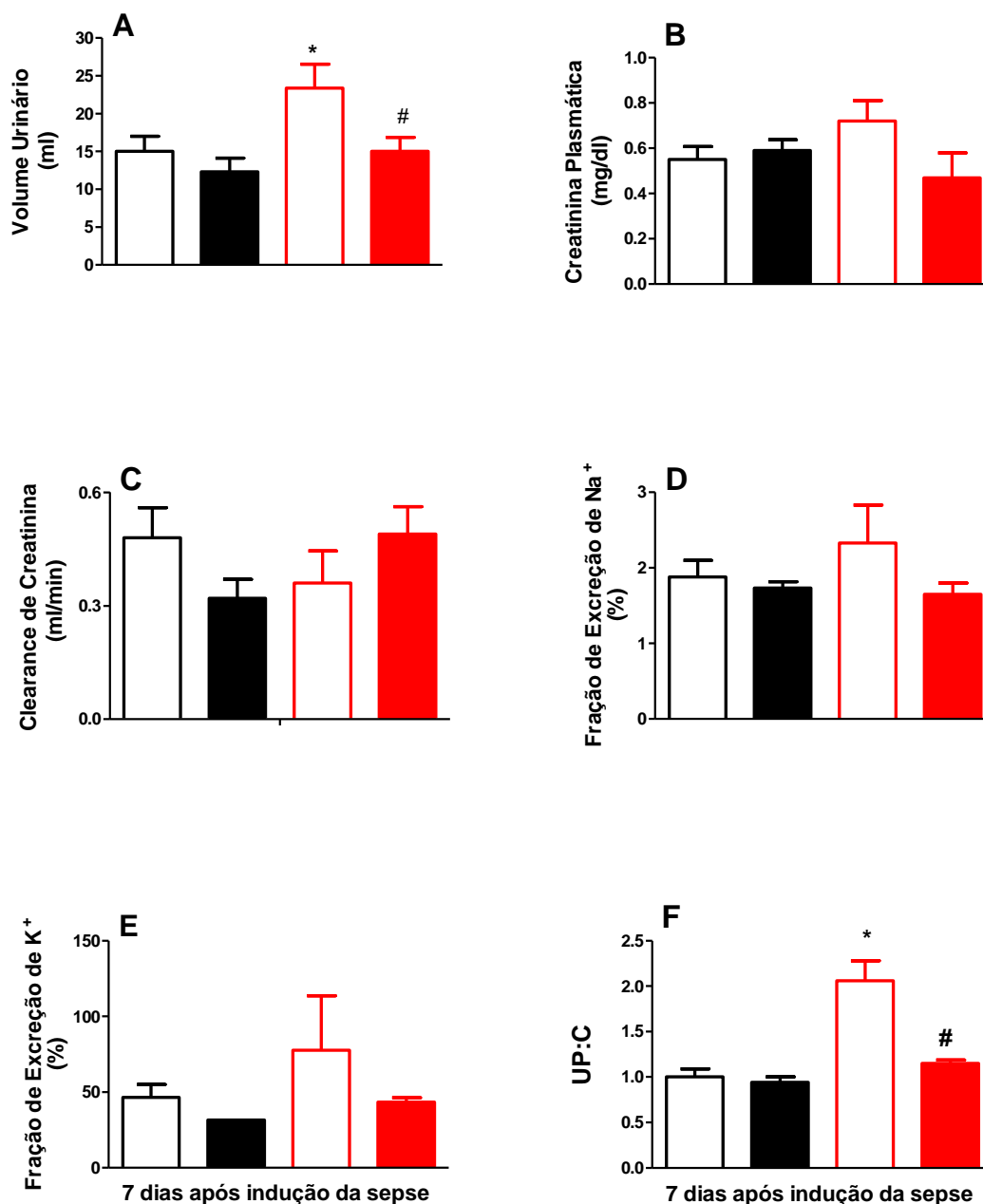


Figura 22 - Efeito, após 7 dias da administração única, via oral, da angiotensina (1-7) incorporada a ciclodextrina, na dose de 50µg/kg, sobre volume urinário (A), creatinina plasmática (B), clearance de creatinina (C), fração de excreção de sódio (D), fração de excreção de potássio (E) e relação urinária proteína/creatinina (UP:C) (F) de ratos sham e CLP. Os resultados representam a média ± erro padrão da média, * $p < 0,05$ e # $p < 0,05$ em relação ao grupos sham CLP, respectivamente. (One – way ANOVA seguida pelo *post-test* de Newman-Keuls).

DISCUSSÃO

6. Discussão

Diversos estudos têm demonstrado que o eixo vasoconstritor do sistema renina-angiotensina (SRA), ECA-AngII-AT1, está envolvido no processo fisiopatológico de gênese e progressão de várias doenças renais. (Hisada *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2011). O bloqueio da ação da Ang II, principal efetor da via clássica do SRA, seja por inibição da ECA ou por bloqueio do receptor AT1, tem apresentado efeito renoprotetor em diferentes modelos experimentais de nefropatias (Wolf, 1998; Taal *et al.*, 2000). Por exemplo, ratos Sprague-Dawley com injúria renal aguda induzida isquemia renal de 1h seguida de reperfusão e/ou nefrectomia unilateral tratados com captopril (2mg/kg/dia) apresentaram uma melhora na disfunção renal, no processo inflamatório intrarenal e nas alterações morfológicas observadas nos animais do grupo controle que não foram tratados com o inibidor da ECA (Efrati *et al.*, 2011). Além disso, a deleção gênica da ECA tem sido associada com a redução de lesões renais da nefropatia diabética (Ruggenti *et al.*, 2008). Bonnet *et al.* (2002) observaram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com diabetes induzida por estreptozotocina apresentaram lesões glomerulares e tubulares, assim como albuminúria, que eram inibidas após 32 semanas de tratamento com irbersartan, antagonista de receptor AT1 de Ang II. Da mesma forma, Watanabe *et al.* (2009) verificaram que o bloqueio de receptores AT1 de Ang II reduziu, significativamente, as lesões glomerulares e tubulares de ratos SHR tratados com olmesartan (5mg/kg) durante 12 semanas.

Nos últimos anos, o papel da via vasodilatadora contra-regulatória do SRA na fisiopatologia de doenças renais decorrentes de diabetes, hipertensão e processos isquêmicos tem sido investigada (Ingelfinger, 2009; Ferrario *et al.*, 2010). Estudos mostram que parte dos benefícios decorrentes do tratamento com inibidores da ECA nas doenças renais, é atribuída à elevação dos níveis de Ang-(1-7), que por sua vez é capaz de desencadear ações anti-fibróticas e anti-proliferativas (Dilauro *et al.*, 2009). Além disso, já foi relatado que a Ang-(1-7) inibiu a fosforilação de MAP quinases pela Ang II em células proximais tubulares (Su *et al.*, 2006) e a deleção gênica de receptores Mas levaram a um aumento da filtração glomerular e alterações estruturais e moleculares de camundongos “*knockout*” para receptores Mas (Pinheiro *et al.*, 2009). Esses resultados evidenciam a atividade renoprotetora

do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas do SRA. Nesse contexto, este estudo investigou os componentes ECA2-Ang-(1-7)-Mas do eixo contra-regulatório do SRA, assim como o efeito da administração oral de Ang-(1-7), na resposta inflamatória renal e nas alterações agudas da função renal de ratos com sepse polimicrobiana (Modelo de Ligadura e Perfuração do ceco-CLP).

Considerando que distúrbios e/ou lesões renais já estão presente nas primeiras 24-48h após indução da sepse tanto em pacientes hospitalizados como em outros estudos de experimentação animal de sepse (Hollenberg *et al.*, 2004; Langenberg *et al.*, 2007; Chvojka *et al.*, 2008) e que em um estudo realizado sob nossas condições laboratoriais, no qual foi avaliado o perfil do desenvolvimento da injúria renal promovida pela sepse (modelo CLP – 10 perfurações) durante 25 dias, foi observado que as principais alterações na função renal ocorriam dentro das primeiras 24h após procedimento cirúrgico para indução da sepse. Dessa forma, achamos interessante dividir as 24 h pós-cirurgia em três períodos (6,12 e 24h) com o objetivo de avaliar o comportamento do eixo vasodilatador ao longo do desenvolvimento da injúria renal aguda (IRA) séptica. Inicialmente, foram feitas três baterias experimentais, em diferentes dias, para avaliar o percentual de sobrevivência dos ratos submetidos procedimento de indução da sepse (modelo CLP – 10 perfurações) nas nossas condições operacionais. Como observado na figura 4, o percentual de sobrevivência foi de aproximadamente 35%. Esse percentual é compatível com as taxas de mortalidade atribuída a sepse grave nas unidades de terapia intensivas (UTIs) européias (Vincent *et al.*, 2006), norte-americanas (Angus *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003), porém inferior ao relatado nas UTIs brasileiras (Silva *et al.*, 2004; Kauss *et al.*, 2010).

Para nos certificarmos que os ratos submetidos ao nosso procedimento cirúrgico desenvolveram a sepse, foi feito primeiramente o cultivo tanto do lavado peritoneal quanto do sangue dos animais dos grupos CLP e Sham, nas condições descritas acima. Como ilustrado na figura 5, bactérias já podem ser detectadas na circulação 6 h após a cirurgia e nos demais períodos avaliados, estando de acordo com outros estudos que avaliaram ou utilizaram este modelo experimental, nos quais hemoculturas com amostras de sangue de animais com sepse induzida pelo modelo CLP, coletadas 6h após cirurgia, revelaram-se positivas para a presença de bactérias, tais como *E. coli*, *S. bovis*, *P. mirabilis* e *B. fragilis*. (Wichterman *et*

al.1991; Remick et al., 2000; Zanotti-Cavazzoni et Goldfard, 2009). Na hemocultura dos animais sham não foi detectado crescimento bacteriano, indicando que não animais aptos para servir de grupo controle.

Após a confirmação da bacteremia nos animais submetidos à CLP, foi feita a análise de alguns parâmetros hemodinâmicos, frequentemente utilizados para definir um quadro clínico de sepse como pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e reatividade vascular. (Hollenberg *et al.*, 2004; Callandra et Cohen, 2005; Vincent *et al.*, 2011). Distúrbios hemodinâmicos, caracterizados pelo aumento do débito cardíaco e queda da resistência vascular periférica, são as manifestações clínicas mais graves da sepse e mais utilizadas na clínica médica para definir um quadro sepse grave e choque séptico, uma vez que várias outras características da sepse como febre, leucocitose, hiperglicemia etc podem não ser observado em todos os casos e/ ou estão presentes no quadro clínico de outras doenças (Hollenberg *et al.*, 2004; Vincent et al., 2011). O progressivo redução da PAM (Fig.6) associado a um aumento compensatório da FC (Fig.7) e aredução da resposta contrátil de anéis aórticos ao vasoconstritor fenilefrina (Fig.8), observado nos ratos submetidos à CLP, foram compatíveis com o quadro clínico de hipotensão, taquicardia e redução da resposta a vasoconstritores que são observados em pacientes sépticos, em especial o choque séptico (Hollenberg *et al.*, 2004; Chvojka et al., 2008; Moore *et al.*, 2011). Semelhante ao observado em ratos e suínos com sepse induzida pela administração de LPS (Baker et al., 2003, Chvojka et al., 2008), a contração de anéis de artéria renal promovida pela fenilefrina foi maior nos vasos renais de ratos sépticos que dos ratos controles(Fig. 8B), mostrando assim um perfil contrátil oposto do observado para os anéis aórticos (Fig.8A). Alguns autores associam esse aumento de resposta contrátil da artéria renal à redução do fluxo sanguíneo renal (FSR) e consequentemente à instalação da IRA (Klahr et Morrissey, 1998; Langenberg et al., 2008., Ishikawa et al. 2009). Entretanto, a redução do FSR, durante a sepse, não é um consenso entre os pesquisadores. Em 2005, Langenberg et al (2006) fizeram um levantamento bibliográfico de 159 estudos de experimentação animal de sepse que avaliaram o FSR através de diferentes técnicas e constatou que 99 estudos identificaram redução do FSR, enquanto 60 trabalhos observaram nenhuma alteração ou aumento do FSR. Mais recentemente, Chvojka et al. (2008), avaliando parâmetros hemodinâmicos renais de porcos com sepse induzida por peritonite, não observaram alteração de FSR nos animais

sépticos. Outro aspecto dos parâmetros hemodinâmicos que merece ser mencionado é a redução da pressão arterial média no período de 6h pós-cirurgia. Provavelmente, essa hipotensão possa ser devido ao efeito da anestesia, já que um dos anestésicos utilizado, cetamina, tem ações excitatórias tanto no sistema cardiovascular como no sistema simpático central, que provocam um aumento da pressão arterial no nos primeiros 5-10 minutos após sua administração, e logo após é compensada por hipotensão e taquicardia reflexa (Ostermann *et al.*,2000). Além disso, Amorim *et al.* (2008), em um estudo sobre a farmacocinética de anestésicos utilizados nas associações medicamentosas em cães, verificaram que o tempo de meia vida de eliminação ($T_{1/2}$) é de cerca de 3h , o que significa que, no período de 6h pós –cirurgia, apenas 2 $T_{1/2}$ se passaram, podendo haver quantidade suficiente do anestésico para alterar esses parâmetros. Um grupo controle, sem anestesia e nem cirurgia, foi utilizado nas séries experimentais iniciais, e verificamos que apenas os parâmetros de pressão arterial e fração de excreção de sódio tiveram diferença em relação aos valores observados no grupo sham, no período de 6h após-cirurgia. Nos demais (12 e 24h), esse parâmetros foram similares aos do sham, assim como todos os outros parâmetros, em todos os intervalos (dados não apresentados)

Sabe-se que a fisiopatologia da maioria das doenças renais, seja aguda ou crônica, está associada a um processo inflamatório no tecido renal (Klahr *et Morrissey.*, 2000; Cunha *et al.*; Cai *et al.*, 2010). Na sepse, distúrbios na função renal estão associados a três principais fatores: inflamação, hipoperfusão e estresse oxidativo no tecido rena (Remuzzi *et Bertani*; 1998, Annane *et al.* 2005, Wa *et al.*, 2008). Os mecanismos adaptativos de resposta do hospedeiro são de natureza bastante complexa, englobando diferentes células de defesa e mediadores inflamatórios, tais como as citocinas pró-inflamatória TNF- α e IL-6 (Blackwell *et Chrsitman*, 1996; Beishuizwn *et al.*, 1998; Cinel *et Opal*, 2009; Cai *et al.*, 2010; Deltesto *et Opal*, 2011). De modo simplificado, o TNF- α promove o influxo de neutrófilos nos locais de lesão, que, por sua vez, são capazes de aumentar ainda mais a produção local de TNF- α e de outras citocinas, como a IL-6, que por sua vez também aumenta a liberação desse fator, gerando um ciclo vicioso (Kayama *et al.*, 1997; Oberholzer *et al.*, 2000; Alves-Filho *et al.*, 2008; Deltesto *et Opal*, 2011). Semelhante ao observado em suíno após indução sepse polimicrobiana (Chvojka *et al.* 2008; Simon *et al.*, 2009), o conteúdo renal de IL-6 encontra-se aumentado no grupo CLP a partir das 6h pós-cirurgia, permanecendo até o final das 24H (Fig.9A).

Enquanto que o conteúdo renal de TNF- α nos períodos de 12 e 24h pós-cirurgia (Fig.9B). O perfil cinético de liberação e degradação dessas citocinas varia de acordo com o modelo experimental de indução de sepse. Por exemplo, no modelo de administração intravenosa de lipopolissacarídeo (LPS) ocorre um aumento acentuado e transitório dos níveis de TNF- α e IL-6 dentro das primeiras 2-6h após administração do LPS, enquanto que no modelo CLP de indução de sepse polimicrobiana esse aumento se dá de forma gradual e progressiva, alcançando níveis moderados dentro de 12-24h após cirurgia, sendo a magnitude dessas concentrações dependente do número e diâmetro de perfurações. (Doi et al., 2009; Cai et al., 2010). Outro parâmetro inflamatório avaliado foi o acúmulo dos leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, medido indiretamente pela atividade da mieloperoxidase (MPO), uma vez que após ativação por substância P e por citocinas (IL-1, TNF- α , IL-6 entre outras), os neutrófilos migram, rapidamente, para o sítio da infecção, reconhecem, fagocitam e destroem o invasor através da liberação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio produzidas pela ação da mieloperoxidase (Alves-filho et al. 2008). Como pode ser visto na figura 9C, o acúmulo de neutrófilos está aumentado, significativamente nos períodos de 6 à 24h após indução da sepse. Em geral, os dados obtidos dos parâmetros inflamatórios avaliados indicam que um processo inflamatório está presente nos rins dos animais submetidos à CLP durante todos períodos escolhidos para analisar a função renal, o eixo vasodilatador do SRA e o efeito da administração da Ang-(1-7) na IRA séptica. Alguns dados sugerem a participação citocinas TNF- α e IL-6 na disfunção renal do grupo CLP. Por exemplo, foi observado aumento da microalbuminúria (Fig.11F), um marcador precoce de lesões glomerulares, na urina dos animais CLP somente 24h após indução sepse, enquanto o conteúdo renal citocinas TNF- α e IL-6 estão aumentadas em períodos que antecedem (6 e 12h) o aumento significativo da proteinúria. Alguns trabalhos mostraram que a administração de TNF- α aumenta a proteinúria e a lesão glomerular, as quais são inibidas pelo bloqueio da atividade da citoconina, na injúria renal promovida decorrente de processos isquêmicos (Fisher et al. 1993; Klahr et Morrissey, 2000). Além disso, IL-6 parece estar envolvida na proliferação de células mesangiais, durante processo de nefrites (Klahr et Morrissey, 1998; Cai et al., 2010).

De acordo com os critérios adotados pela Acute Dialysis Quality Initiative (concentração plasmática de creatinina e fluxo urinário,) para definir e classificar o

grau da lesão renal em Risco, Injúria, Falência, Perda e Estágio final da doença renal (RIFLE), os animais do grupo CLP estariam classificados no grupo de risco de disfunção renal. (Srisawat et al., 2010). Essa é uma etapa importante para ajudar a entender um pouco mais a fisiopatologia da injúria renal aguda decorrente da sepse, uma vez que é nessa etapa que ocorrem alterações tanto sistêmicas quanto renais que resultam na resolução e normalização da função renal ou no agravamento da disfunção renal levando a um quadro de injúria renal aguda (Klarh et Morrissey, 2000; Chvojka et al. 2010). Além disso, do ponto de vista farmacológico, uma ferramenta terapêutica eficaz que agisse nessa etapa evitaria a progressão para a IRA e formação de lesões renais irreversíveis (Thijs et Thijs, 1998; Doi et al., 2010). Avaliando mais detalhadamente alguns dos parâmetros de função renal utilizados neste estudo, observa-se que não há diferença significativa, nas concentrações plasmática de creatinina entre os dois grupos experimentais (Fig.10A). Embora a creatinina plasmática seja um marcador clássico de IRA, é importante ressaltar que para que ocorra um aumento constante da concentração plasmática de creatinina é preciso que haja a perda funcional de um grande número dos néfrons, cerca de 40-50%, o que leva um determinado tempo para acontecer, dependendo da intensidade e duração de exposição ao agente agressor, e talvez o período de 24h não tenha sido suficiente para que uma alteração na concentração plasmática de creatinina fosse observada (Lisowska-Myjak, 2010).

A redução do clearance de creatinina do grupo CLP (Fig.10F) está de acordo com a redução de RFG observada nos pacientes sépticos e na maioria dos trabalhos experimentais, independente do modelo animal de sepse utilizado (Langenberg et al. 2007; Chvojcka et al., 2008; Simon et al. 2009). A redução do RFG é atribuída a duas principais causas: A queda da pressão hidrostática decorrente da vasoconstrição da arteríola aferente e uma maior vasodilatação da arteríola eferente em relação à aferente (Langenberg et al. 2007; Chvojcka et al., 2008; Simon et al. 2009). A queda da filtração glomerular decorrente de hipoperfusão renal é a causa mais atribuída a redução da $FENa^+$ encontrada em pacientes sépticos e em trabalhos de experimentação animal de sepse (Langenberg et al. 2006). Além disso, o aumento da concentração plasmática de aldosterona, mineralocorticoide que aumenta a reabsorção de Na^+ nas porções finais dos túbulos renais, observada no plasma de ratos submetidos à CLP, sugere a participação, ao menos em parte, da aldosterona na redução da $FENa^+$ desses animais (Fig.11A) (Zeidel, 1993). Embora

tenha sido observada uma redução do clearance de creatinina, acompanhada de uma menor excreção de sódio, o grupo CLP apresentou uma diurese cerca de 4 vezes maior e um balanço hídrico de 70% contra aproximadamente 30% do grupo sham (Fig.10 C e D). Em ratos, a fase de oligúria encontrada na sepse humana é inexistente ou muito rápida, sendo mascarada pela fase de poliúria (Doi et al., 2010). Com os dados que temos, podemos sugerir que esse aumento da diurese do grupo CLP seja devido, ao menos em parte, pela pressão osmótica da uréia no lúmen dos túbulos renais, dificultando a reabsorção de água e, conseqüentemente, favorecendo uma diurese osmótica (Verbalis, 2003)

Após induzir a sepse e a disfunção renal, a próxima etapa foi avaliar como o SRA se comportava durante essas alterações renais promovida pela sepse. Primeiramente foi feita uma análise dos principais componentes da via vasoconstritora clássica do SRA. Nossos resultados indicaram aumento da atividade dessa via, evidenciado pelo aumento da expressão renal do RNAm que codifica a ECA (Figs. 13 A), do conteúdo renal Ang II (Figs. 13 C) e redução na expressão renal do RNAm que codifica o receptor AT1 (Fig. 13D). Esses resultados estão de acordo com outros estudos que investigaram o comportamento do eixo ECA-AngII-AT1 na gênese e progressão de lesões renais em modelo de isquemia/reperfusão renal. Kotongiannis *et Burns* (1998) verificaram um aumento do conteúdo renal de Ang II, acompanhado de uma regulação para baixo dos RNAm que codificam o angiotensinogênio e os receptores AT1, no córtex renal de ratos submetidos isquemia (1h)/reperfusão (24h). Nosso grupo mostrou que ratos submetidos a 45 min de isquemia renal seguida por 4 h de reperfusão apresentaram um aumento do conteúdo renal de Ang II, sem diferença significativa nas concentrações plasmáticas do peptídeo, além de redução da expressão renal do RNAm que codifica o receptor AT1 (da Silveira *et al.*, 2010). Bucher *et al.* (2001) observaram uma redução dos receptores AT1 nos ratos sépticos, 12 e 24h após a infusão de LPS

Dados da literatura indicam que o eixo vasodilatador do SRA, ECA2-Ang-(1-7)-Mas, tem atividade renoprotetora. Reich *et al* (2008) relataram uma redução da expressão de ECA2 nos glomérulos e túbulos renais de pacientes diabéticos, sugerindo a participação da ECA2 na proteção contra as lesões renais que ocorrem na nefropatia diabética. Mais recentemente, Dilauro *et al* (2011) mostraram que o bloqueio da ECA 2 aumentou as lesões e a albuminúria, via mecanismo dependente de AT1, de camundongos com injúria renal induzida por nefrectomia. Animais

Knockout para ECA 2 e para receptores Mas apresentaram lesões glomerulares com aumento da albuminúria, entre outros danos renais (Pinheiro et al. 2009; Ferrario et Varagic, 2010). Nossos resultados mostram que, assim como a via clássica vasoconstritora, a via vasodilatadora também está ativada durante as alterações ocorridas no rim durante as primeiras 24h após indução da sepse. Essa ativação foi evidenciada pelo aumento da expressão renal do RNAm que codifica a ECA 2 (Fig. 14 A) e do conteúdo renal de Ang (1-7) (Fig 14 C) e redução na expressão e distribuição “downregulation” dos receptores Mas no córtex e na medula renal de animais submetidos à CLP (Figs.16 e 17). Foram feitas relações entre os componentes de ambos os eixos do SRA como o objetivo de saber qual dos dois eixos predominava na IRA séptica. As relações da expressão renal dos RNAm que codificam ECA/ECA2 e AT1/Mas não apresentam diferenças entre os grupos CLP e Sham (Figs. 15A e D). A análise das relações Ang II/Ang (1-7) plasmática e renal sugerem que ocorra uma maior ativação sistêmica do eixo vasoconstritor, em relação ao eixo vasodilatador, caracterizada por uma maior relação Ang II/Ang (1-7) plasmática dos animais submetidos à CLP no final das 24 h pós-cirurgia (Fig.15C). Entretanto, como visto em outros modelos de doenças renais e cardiovasculares (Simões e Silva et al., 2006; Santos et al. 2008, Ingelfinger, 2009; Ferrario et Varagic, 2010), parece haver um efeito contra-regulatório do eixo vasodilatador em relação ao eixo vasoconstritor nos rins dos animais CLP, evidenciado por uma maior relação Ang II/Ang (1-7) nas primeiras 12 h pós-cirurgia, que é igualada ao final das 24 h (Fig 15 B)

Recentemente, Giani et al. (2010) mostraram que o tratamento por duas semanas com ang-(1-7) (0,6 mg/kg) reduziu os níveis séricos de TNF- α , IL-6 e NF- κ B, proteinúria e alterações morfológicas de ratos hipertensos. da Silveira et al. (2010) mostraram que a ang -(1-7) ou AVE 0991, um agonista de receptor Mas, tiveram um efeito antiinflamatório, reduzindo a produção de citocinas e acúmulo de neutrófilos, entre outros parâmetros inflamatório, em modelos experimentais de artrite. No presente estudo, as ações renoprotetoras e antiinflamatórias da ang-(1-7) e a participação de receptor Mas foram observadas nos animais do grupo CLP tratados, uma única vez, com ang - (1-7) incorporado a ciclodextrina, que permitiu a liberação lenta e contínua do peptídeo durante cerca de 24h. A ang (1-7) não alterou os níveis de TNF- α , IL-6 e acúmulo de neutrófilos dos ratos sham (Figs 19 A, B e C). No entanto, a Ang-(1-7) reduziu conteúdo de TNF- α , IL-6 e acúmulo de

neutrófilos no rim dos animais tratados para níveis encontrado nos animais do grupo controle (Fig.19E,D e F). Estudos mostram que existe uma deficiência dos neutrófilos nas etapas de rolamento, adesão e migração do endotélio para o local da infecção, mediadas por óxido nítrico e ONOO^- , além de uma menor capacidade de responder aos estímulos quimiotáticos das citocinas, durante a sepse grave (Alves-filho et al., 2008). Esperava-se que o conteúdo renal do $\text{TNF-}\alpha$, do grupo CLP, estivesse aumentado anteriormente ou no mesmo período em que ocorreu aumento do acúmulo dos neutrófilos no tecido renal. No entanto, o $\text{TNF-}\alpha$ estava aumentado (12h) posteriormente ao aumento do acúmulo de neutrófilo (6h). Entretanto, comparando as figuras 6B e 6C, nota-se que o perfil apresentado pela IL-6 é muito semelhante ao do acúmulo de neutrófilos, provavelmente decorrente da já conhecida liberação de IL-6 por neutrófilos ativados (Dinarrello, 1997; Cai et al; 2010). Assim, os dados sugerem que o efeito da Ang-(1-7) parece ser mais direto sobre a IL-6, levando a uma ação indireta sobre liberação de $\text{TNF-}\alpha$ e da ativação dos próprios neutrófilos, que, por sua vez, é amplificado devido ao ciclo vicioso entre a citocinas e neutrófilo. Obviamente, é uma visão generalizada e simplificada, perante a complexidade de mediadores e componentes celulares envolvidos da resposta inflamatória desenvolvida durante a sepse (Annane et al., 2005). O $\text{TNF-}\alpha$ não é o único agente quimiotático para infiltração dos neutrófilos, por exemplo as IL-1 e 8 possuem forte ação ativadora de neutrófilos (Wakabayashi et al., 1991; Dinarrello, 1997). Outro aspecto importante é que o tempo de 24h após-cirurgia possa ser um tempo longo para avaliar fenômenos inflamatórios, uma vez que etapas importantes do processo inflamatório possam já ter terminado. Embora no modelo CLP, ao contrário de outros modelos de indução de sepse, a resposta inflamatória evolui bem mais lentamente (Cai et al. 2010). Considerando que a IL-6 está normalmente localizada no rim e está envolvida nos processos de nefrites mesangiais e proliferativas (Kayama et al., 1997), pode ser que a redução da liberação da IL-6 pela ang-(1-7) esteja diretamente ligada à redução da microalbuminúria, verificada nos ratos CLP tratados com a Ang-(1-7) (Fig.21).

O efeito da administração da Ang-(1-7) foi mais intenso nos parâmetros de função renal que têm envolvimento total ou parcial com a região glomerular ou pré-glomerular, tais como: volume urinário, clearance de creatinina e UP:C , diminuindo à medida que os parâmetros têm envolvimento com a função tubular medular como $:\text{FENa}^+$, FEK^+ , Cosm e CH_2O (Figs.20). Ao compararmos o efeito da administração

da Ang-(1-7) no grupo CLPe sham, nota-se que o sentido da resposta é o mesmo nos dois grupos, o que muda é a intensidade, por exemplo: ang-(1-7) diminui o volume urinário tanto do grupo sham como do grupo CLP, porém em intensidades diferentes (Fig. 20A) , da mesma forma que o clearance de creatinina é elevado pela Ang-(1-7) tanto no grupo sham como do grupo CLP, porém em intensidades diferentes (Fig. 20 C). Esses dados estão de acordo com a regulação para baixo do receptores Mas no cortéx e medula renal do do grupo CLP quando comparada ao grupo sham (figs. 16 e 17).

Um grande número de resultados controversos sobre o efeito da angiotensina-(1-7) na hemodinâmica renal e na excreção de água e eletrólitos são encontrados na literatura (Chappell et al., 1998; Ferrario et Varagic . 2010) De acordo com Dilauro et Burns (2009), esse resultados contraditórios são devido aos diferentes protocolos experimentais utilizados, anestesia e diversidade de estruturas ao longo do néfron com características específicas. Ferrario et Varagic (2010) creditam essa diferença de resultados apresentados também a possíveis efeito de cross talk entre o receptor Mas e AT1 e AT2, interações da ang-(1-7) com a bradicinina e um possível papel de modulador alostérico da ang-(1-7) sobre o receptor AT1 de angiotensina II. Temos que considerar que além das variações de resultados encontradas na literatura no que diz respeito ao efeito na função renal da Ang (1-7) em animais saudáveis, o grupo CLP é um condição patológica que por si só produz alterações na hemodinâmica renal e equilíbrio hidroeletrólítico, dificultando a comparação do efeito da ang-(1-7) nos ratos sham e CLP. A redução do volume urinário e da FENa⁺ e aumento dos clearances de creatinina e o de água livre foram observado por Baracho et al. (1998) ,em ratos e camundongos volume-expandidos, tratados com ang (1-7). Esse efeito antidiurético foi também observado na administração agonista não peptídico de receptor Mas (AVE 0991) (Pinheiro et al.2005). Um mecanismo de cross-talk dos receptores Mas com os receptores AT1e AT2 de angiotensina II e V2 de vasopressina tem sido sugerido para explicar tais resultados (Santos et al.2008).

A administração da ang-(1-7) inibiu a microalbuminúria e aumentou o volume do urinário observado no grupo CLP não tratado (Fig. 21). A redução do ritmo de filtração decorrente da sepse não foi observada nos ratos CLP tratados com a Ang - (1-7). A ang-(1-7) não alterou nenhum dos parâmetros tubulares de função renal avaliado, seu efeito protetor foi basicamente glomerular ou pré-glomerular nos ratos

sépticos Possíveis explicações para essa ação cortical da ang-(1-7), podem estar ligadas à localização da ECA 2 nos podócitos glomerulares, vasculatura renal e início do túbulo proximal (Ferrario et Varagic et al. 2010) associada a uma redução “downregulation” precoce e mais intensa dos receptores Mas na medula do que no córtex (Figs 16 e 17). Como observado na figura 22, apenas a proteinúria e o fluxo urinário estão diferentes, significativamente, entre os animais sépticos tratados e não tratados com ang-(1-7) após sete dias, indicando que o efeito protetor de lesão glomerular da administração única da ang-(1-7), observado nas primeiras 24 h pós-indução, permanece após 1 semana. A normalização das excreções de Na⁺ e K⁺ e clearance de creatinina observadas nos animais CLP sobreviventes não tratado, também foi verificada em ratos com sepse endotóxica, após 3 dias de indução da sepse (Langenberg et al. 2007).

A figura abaixo resume os principais resultados deste estudo.

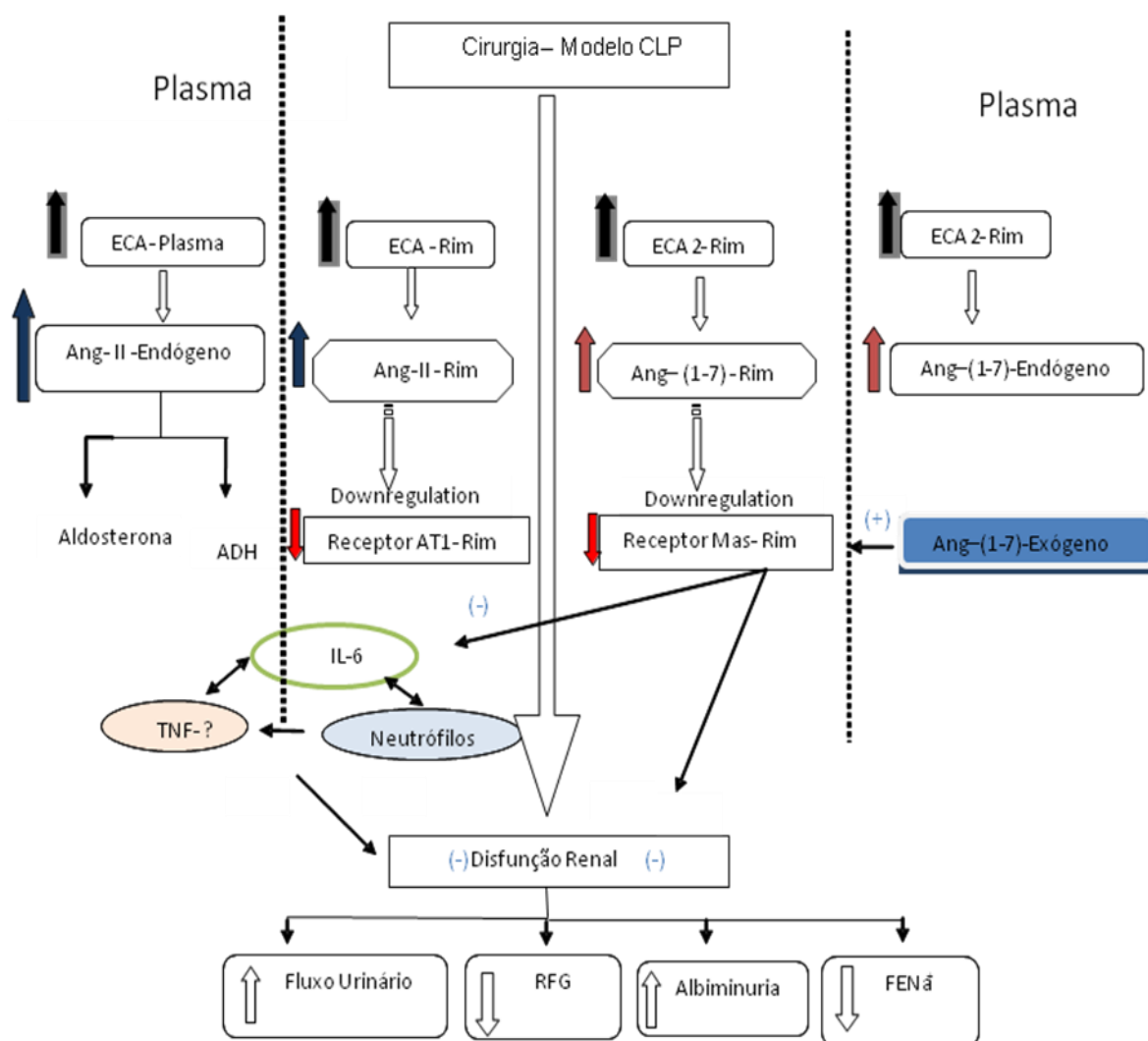


Figura 23- Esquema das alterações renais e inflamatórias encontradas no estudo da participação do SRA na disfunção renal induzida pelo modelo CLP de sepse polimicrobiana.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

- O aumento proporcional do eixo ECA2 – Ang-(1-7) – Mas e ECA-AngII-AT1, indicado na relação da expressão ECA/ ECA2 e do conteúdo renal de AngII/Ang-(1-7), bem como da redução dos receptores AT1 e Mas, indicam que na disfunção renal decorrente da sepse, o SRA também funciona como um sistema bidirecional no qual os dois eixos se contra-regulam
- A ativação do receptor Mas, por meio da administração de Ang-(1-7) , exerce efeito anti-inflamatório e renoprotetor na disfunção renal induzida pelo modelo CLP de sepse polimicrobiana.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências bibliográficas

ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ. The role of neutrophils in severe sepsis Shock. Suppl 1:3-9, 2008.

AMORIN, R., GALHARDO, A. VALADÃO, C.A.A PECCININI R.G Determinação da cetamina em plasma por HPLC: aplicação em um estudo de farmacocinética de associação medicamentosa em cão. Rev.Cienc. Farm Básica Apl 29: 69-76, 2008.

ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; CAVAILLON, J.M. Septic shock. Lancet 365(9453): 63-78, 2005.

ANDRIKOS E, TSEKE P, BALAFA O, CRUZ DN, TSINTA A, ANDROULAKI M, PAPPAS M, RONCO C. Epidemiology of acute renal failure in ICUs: a multi-center prospective study. Blood Purif.28(3):239-44, 2009.

ANGUS, D.C.; WAX, R.S. Epidemiology of sepsis: an update. Critical care Medicine 29: 109-116, 2001.

ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 29(7):1303-10, 2001.

BAKER, C. C.; CHAUDRY, I. H.; GAINES, H. A; BAUE, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. Surgery. 94: 331-335, 1993.

BARACHO N.C, SIMOES-E-SILVA A.C, KHOSLA M.C, SANTOS R.A. Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. Braz J Med Biol Res 31: 1221-1227, 1998

BEISHUIZEN, A.; VERMES, I.; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Adv. Clin. Chem.*, 33: 55-131, 1998.

BLACKWELL, T.S.; CHRISTMAN J.W. Sepsis and cytokines: current status. *British Journal Anaesthesia*. 77: 110-117, 1996.

BONNET, F.; CANDIDO, R.; CAREY, R.M.; CASLEY, D.; RUSSO, L.M.; OSICKA, T.M.; COOPER, M.E.; CAO, Z. Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade. *Journal of Hypertension* 20(8):1615-24, 2002.

BUCHER, M.; ITTNER, K.P.; HOBBAHN, J.; TAEGER, K.; KURTZ, A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertension*. 38: 177-182, 2001.

CAI, B., DEITCH, E.A., ULLOA, L. Novel insights for systemic inflammation in sepsis and hemorrhage *Mediators Inflamm*. 2010: 6424- 62, 2010.

CALANDRA T, COHEN J; The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 33(7): 1538-48, 2005.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab*. 14(6):274-81, 2003.

CHAPPELL, M.C. MODRALL, J.G.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol*. 143:77-89, 2004.

CHAPPELL, M.C.; DIZ, D.I.; YUNIS, C.; FERRARIO, C.M. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl*. 68:S3-6, 1998.

CHVOJKA J., SYKORA R., KROUZECKY A., RADEJ J., VARNEROVA V., KARVUNIDIS T., HES O., NOVAK I., RADERMACHER P., MATEJOVIC M. Renal

haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit Care* 12(6):R164-174, 2008.

CINEL, I.; OPAL, S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 37(1):291-304, 2009..

CUNHA, F.Q.; ASSREUY, J.; MOSS, D.W.; REES, D.D.; LEAL, L. M. C.; MONCADA, S; DAVIES M.G.; HAGEN P. Systemic inflammatory response syndrome. *The British Journal of Surgery*. 84:920-935, 1997.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. *AACN Clin Issues* 15(1):18-44, 2004.

DA SILVEIRA, K.D.; POPPERMAYER, B.; DINIZ, L.R.L.; CARMONA, A.K.; CASSALI, G.D.; BRUNA-ROMEROS, O.; DE SOUSA, L.P.; TEXEIRA, M.M.; SANTOS, R.A.S.;SIMÕES E SILVA, A.C.; VIEIRA, M.A.R. ACE2 – angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Clinical Science* 119: 385-394, 2010.

DELSESTO, D.; OPAL, S.M. Future Perspectives on Regulating Pro-and Anti-Inflammatory Responses in Sepsis. *Contrib Microbiol*.17:137-56, 2011.

DILAURO, M.; BURNS KD. Angiotensin-(1-7) and its effect in the kidney, *Scientific Word Journal* 9: 522: 276-80, 2009.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock.*Chest*. 112: 321S-329S, 1997.

EFRATI S, BERMAN S, HAMAD RA, SIMAN-TOV Y, ILGIYAEV E, MASLYAKOV I, WEISSGARTEN J. Effect of captopril treatment on recuperation from ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. *Nephroly, Dialysis, Transplantation*. 2011

ESTEBAN V, HERINGER-WALTHER S, STERNER-KOCK A, DE BRUIN R, VAN DEN ENGEL S, WANG Y, MEZZANO S, EGIDO J, SCHULTHEISS HP, RUIZ-ORTEGA M, WALTHER T. Angiotensin-(1-7) and the g protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation PLoS One 4(4):e5406. 2009.

FELDMANN, M., BRENNAN, F.M., MAINI, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*: 14 397-440, 1996.

FERRARIO, C.M.; JESSUP, J.; GALLAGHER, P.E.; AVERILL, D.B.; BROSNIHAN, K.B.; ANN TALLANT, E.; SMITH, R.D.; CHAPPELL, M.C. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney International*. 68(5):2189-96, 2005.

FERRARIO, C.M.; VARAGIC J. The ANG-(1-7)/ACE 2/mas axis in the regulation of nephron function. *Am J Physiol Renal Physiol* 298. F1297-1305,2010.

GIANI JF, MUNOZ MC, PONS RA, CAO G, TOBLLI JE, TURYN D, DOMINICI FP. Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010

HAN, Y.; RUNGE, M.S.; BRASIER, A.R. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 84(6):695-703, 1999.

HISADA, Y.; SUGAYA, T.; YAMANOUCHI, M.; UCHIDA, H.; FUJIMURA, H.; SAKURAI, H.; FUKAMIZU, A.; MURAKAMI, K. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest*. 103(5):627-35, 1999.

HOLLENBERG, S.M.; AHRENS, T.S.; ANNANE, D.; ASTIZ, M.E.; CHALFIN, D.B.; DASTA, J.F.; HEARD, S.O.; MARTIN, C.; NAPOLITANO, L.M.; SUSLA, G.M.; TOTARO, R.; VINCENT, J.L.; ZANOTTI-CAVAZZONI, S. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients. *Critical Care Medicine*. 32(9):1928-48, 2004.

INGELFINGER, J.R. Angiotensin-converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 18(1):79-84, 2009.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. *Int. Care Med.*, 22(2): 63-72, 2007.

KAUSS, J.A.M; GRION, C.M.C.; CARDOSO, L.T.Q.; ANAMI, E.H.T.; NUNES, L.B.; FERREIRA G.L.; MATSUO, T.; BONAMETTI, A.M. The epidemiology of sepsis in a Brazilian Teaching Hospital. *Braz J Infect Dis.* 14(3): 264-70, 2010.

KAYAMA F, YOSHIDA T, KODAMA Y, MATSUI T, MATHESON J.M, LUSTER MI. Pro-inflammatory cytokines and interleukin 6 in the renal response to bacterial endotoxin. *Cytokine* 9(9):688-95, 1997.

KLAHR, S.; MORRISSEY, J.J. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney Int Suppl.* 75:S7-14, 2000.

KONTOGIANNIS, J.; BURNS, K.D. Role of AT1 angiotensin II receptors en renal injury. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* 274: F79-F90, 1998.b

LANGENBERG C, WAN L, EGI M, MAY CN, BELLOMO R: Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Intensive Care Med* 33:1614-1618, 2007.

LANGENBERG C, WAN L, EGI M, MAY CN, BELLOMO R: Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int* 69:1996-2002, 2006.

LISOWSKA- MYJAK, B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif* ;29(4):357-65, 2010.

MARSHALL, J.C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 29(7):S99-106, 2001.

MARTIN, G.S.;MANNINO, D.M.;EATON, S.;MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The new England journal of Medicine* 348: 1546-1554, 2003.

MOORE, L.J.; MCKINLEY, B.A.; TURNER, K.L.; TODD, S.R.; SUCHER, J.F.; VALDIVIA, A.; SAILORS, R.M.; KAO, L.S.; MOORE, F.A. The epidemiology of sepsis in general surgery patients. *J Trauma* 70 (3): 672-680, 2011.

NITESCU, N.; GRIMBERG. E.; HERLITZ, H.; GURON, G. Low-dose of candesartan improves renal blood flow and kidney oxygen tension in rats with endotoxin-induced acute kidney dysfunction. *Shock* 30 (2): 166-172, 2011.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.*28(4 Suppl):N3-12, 2000.

PARRILO, J.E. Pathogenetic mechanism of septic shock. *N. Engl. J. Med.*, 328: 1471-1478, 1993.

PEREIRA, R.M.; SANTOS, R.A.S.; TEIXEIRA, M.M.; LEITE, V.H.; COSTA, L.P.; DA COSTA DIAS, F.L.; BARCELOS, L.S.; COLLARES, G.B; SIMOES E SILVA, A.C. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J Hepatol.* 2006.

PINHEIRO, S.V., FERREIRA, A.J., KITTEN, G.T., DA SILVEIRA, K.D., DA SILVA, D.A., SANTOS, S.H., GAVA, E., CASTRO, C.H., MAGALHÃES J.A., DA MOTA R.K., BOTELHO-SANTOS, G.A, BADER, M., ALENINA N., SANTOS, R.A, SIMOES E SILVA A.C. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria *Kidney Int* 75(11):1184-93, 2009.

REMICK, D. G.; NEWCOMB, D. E; GERALD, L. B.; CALL, D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture. *Shock* 5:110-116, 2000.

REMUZZI, G.; BERTANI, T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *New England Journal of Medicine* 339(20): 1448-1456, 1998.

RITTIRSCH D, HOESEL L.M, WARD P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 81(1):137-43, 2007.

RUGGENENTI P, BETTINAGLIO P, PINARES F, REMUZZI G. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and renoprotection in diabetic and nondiabetic nephropathies. *Clinical Journal of American Society Nephrology* 3(5):1511-25, 2008.

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; SIMOES E SILVA A.C. Recent advances in angiotensina –converting enzyme 2 Angiotensin-(1-7) Mas axis *Experimental Physiology* 93:519-27, 2008.

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V.; SAMPAIO, W.O.; TOUYZ, R; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 14(8):1019-31, 2005.

SILVA, E.; PEDRO, M. A.; Sogayar A.C. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical Care*. 8:251-260, 2004.

SIMÕES E SILVA, A.C.; PINHEIRO, S.V.; PEREIRA, R.M.; FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. *Mini Rev Med Chem*. 6(5):603-9, 2006.

SIMON F, GIUDICI R, SCHEUERLE A, GRÖGER M, ASFAR, P; VOGT J.A, WACHTER U, PLONER F, MICHAEL GEORGIEFF M, PETER MÖLLER P, LAPORTE R, RADERMACHER P, CALZIA E HAUSER B Comparison of cardiac,

hepatic, and renal effects of arginine vasopressin and noradrenaline during porcine fecal peritonitis: a randomized controlled Trial. *Critical Care* 13(4) 113-23, 2010.

SRISAWAT, N., HOSTE E.E, KELLUM, J.A. Modern classification of acute kidney injury *Blood Purif* 29(3):300-7,. 2010.

STEARNS-KUROSAWA, D.J.; OSUCHOWSKI, M.F.; VALENTINE, C.; KUROSAWA, S.; REMICK DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 28 (6):19-48, 2011.

TAAL, M.W.; BRENNER, B.M. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int.* 57(5):1803-17, 2000.

TERZI, F.; BURTIN, M.; FRIEDLANDER, G. Early molecular mechanisms in the progression of renal failure: role of growth factors and protooncogenes. *Kidney International, Supplement* 65: 68-73, 1998.

THIJS, A.; THIJS, L. G. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney International* 53 (66): S34-S37, 1998 .

UCHINO S, KELLUM J.A, BELLOMO R, DOIG G.S, MORIMATSU H, MORGERA S, SCHETZ M, TAN I, BOUMAN C, MACEDO E, GIBNEY N, TOLWANI A, RONCO C. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 294(7):813-8, 2005.

VINCENT, J.L.; SAKR, Y.; SPRUNG, C.L.; RANIERI, V.M.; REINHART, K.; GERLACH, H.; MORENO, R.; CARLET, J.; LE GALL, J.R.; PAYEN, D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.*, 34(2): 344-53, 2006.

VINCENTE, J.L.; MARTINEZ, E.O.; SILVA.E. Evolving concepts in sepsis definitions. *Crit. Care Nurs Clin North Am*, 23(1): 29-39, 2011.

WALLEY, K. R.; LUKACS, N. W.; STANDIFORD, T. J.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Balanced of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infection and Immunity*. 64: 4733-4738, 1996.

WAN L, BAGSHAW SM, LANGENBERG C, SAOTOME T, MAY C, BELLOMO R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit Care Med* 36(4 Suppl):S198-203, 2008.

WAN LI, LANGENBERG.C, BELLOMO R., NAY C.N. Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis. *Critical care*.13: 190-200, 2009.

WICHTERMANN, K. A.; BAUE, A .E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *Journal of Immunology*.146: 3478-3482, 1991.

WOLF, G. Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie*. 19(7):451-6, 1998.

ZANOTTI-CAVAZZONI S.L., GOLDFARB R.D. Animal models of sepsis. *Critical Care clinics* 25(4):703-19, 2009.