UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

O PAPEL DA CICLOOXIGENASE-2, DA APOPTOSE, DO FATOR DE NECROSE TUMORAL-α E DA PRESSÃO ARTERIAL NA LESÃO RENAL DE RATOS SUBMETIDOS À INFUSÃO CONTÍNUA DE ANGIOTENSINA II

FLÁVIA SANTIN

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.
Orientador: Profa.Dra. Denise Saretta Schwartz
Co-Orientador: Prof.Dr. Luis Cuadrado Martin

BOTUCATU - SP
Junho de 2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

"Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida."

(Sócrates)

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim"

(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

A Deus, por absolutamente tudo!!!

Mãe

A minha querida mamãe Therezinha Santin, que mesmo não estando mais entre nós, me protege e orienta sempre no caminho do bem, e no meu desempenho tanto pessoal como profissional. Saudades e com carinho e amor por você sempre!

Pai

Ao meu querido papai Ângelo Santin, pelo exemplo, força, orientação, carinho e por ter tornado possível a minha vida como ela é hoje!!!! Te adoro!

Irmã

A minha querida irmã e dinda Sandra Santin, pelo apoio incondicional que recebi por todos esses meus anos de estudo! Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida!!!

Ao Conselho de Pós-Graduação Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo fornecimento de bolsa de doutorado.

À Prof. Dra. Denise Saretta Schwartz, minha orientadora, pela amizade inestimável, apoio e incentivo constantes, indispensáveis à esta conquista. Agradeço pelos ensinamentos, pela participação sempre ativa neste trabalho e, principalmente pelo seu exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Luis Cuadrado Martin do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, meu co-orientador, pela amizade, confiança e sugestões que contribuíram para enriquecer este estudo.

À Prof. Dra. Michiko Sakate pela amizade e apoio durante todos os momentos.

Ao prof. Dr. Luiz Henrique pelo amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Rosa M. Viero pela colaboração na leitura das lâminas.

À Prof. Dra. Renné Loufer Amorin pela amizade e oportunidade de desenvolver a parte prática do experimento no Setor de Patologia da FMVZ – UNESP- Botucatu.

À Prof. Terezinha Peraçoli pela colaboração na realização deste trabalho.

À amiga Maria do Carmo F. Vailati pelos ensinamentos, companheirismo e amizade, que tornaram possível a realização deste trabalho.

À amiga Silvia Manduca Trapp pela amizade e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À amiga Karina Aptekman pela amizade e apoio durante a execução deste trabalho.

Às pós-graduandas Marcela Marcondes, Celmira Calderon e Sandra Bassane pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da pós-graduação Veridiana Silveira, Sandra Bassane, Letícia Yonezawa e Luciano Fonseca pela amizade e apoio durante todos os momentos da realização deste trabalho.

Aos queridos amigos Iracema, Ary, Dr. Hower e Pedro, e todos os amigos do centro espírita Alcides Covre pelo apoio e incentivo incondicionais em todos os momentos e pela verdadeira amizade.

À querida amiga Dona Jeane pelo incentivo e pela verdadeira amizade.

Aos funcionários José Carlos e Mário, do Laboratório Experimental de Cardiologia da FMB-UNESP, pelo importante auxílio nas coletas de material dos animais na fase experimental deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação, Denise, Maria e José Roberto, pelo auxílio prestado durante todo o curso.

Às secretárias do departamento, Marlene e Cris, pelo convívio amistoso.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP pelo auxílio na revisão das referências e confecção da ficha catalográfica.

Aos animais que foram utilizados neste trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e que involuntariamente foram omitidos.

“Sinceramente, meu muito obrigado!!!”

As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas,
mas o seu eco é infindável."
(Madre Teresa de Calcutá)

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Protocolo experimental de avaliação dos ratos controle e tratados (Remicade® - antagonista TNF-α ou Celebra® – inibidor COX2) que foram submetidos à infusão contínua de angiotensina II (ANGII) por 3 dias.....9
Figura 2- Rato preparado para colocação da mini-bomba contendo ANGII.....10
Figura 3 - Sistema de pressão caudal com polígrafo modelo RS3200-Gould e o esfigmomanômetro Narco Bio-Systems PE-300. 11
Figura 4 - Valores da pressão arterial final dos ratos em cada tratamento. 17
FIGURA 5 – Porcentagem de necrose dos vasos de rins de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....19
FIGURA 6 – Porcentagem de degeneração tubular em rim de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....20
FIGURA 7 - Porcentagem de atrofia tubular em rim de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....20
Figura 8 - Concentração sérica de TNF-α (pg/mL) nos diferentes grupos de tratamento. 22
Figura 9 - Rim de rato Wistar tratado com ANGII: presença de necrose fibrinóide segmentar em artéria.....22
Figura 10 - Rim de rato Wistar tratado com ANGII: presença de necrose fibrinóide segmentar (→) e presença de necrose com hemorragia ( )em artéria (HE-400x).....23
Figura 11 - Rim de rato Wistar tratado com ANGII+Infliximabe: presença de necrose fibrinóide segmentar em artéria (HE- 400x).....23
Figura 12 - Rim de rato Wistar tratado com ANGII+Infliximabe: presença de cilindros (HE-400X). 24
Figura 13 - Marcação positiva para COX-2 em rim de rato Wistar tratado com ANGII (400x). 24
Figura 14 - Marcação positiva para COX-2 em rim de rato Wistar tratado com ANGII+ Celecoxibe (200x). 25
Figura 15 - Ausência de marcação para caspase-3 em rim de rato Wistar tratado com ANGII+ Celecoxibe (400x).....25

Figura 16 - Ausência de marcação para caspase-3 em rim de rato Wistar tratado com Infliximabe(400x). 26

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Porcentagem de alterações histológicas de rins (HE) de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....19

LISTA DE QUADROS

Pág.

Quadro 1 - valores individuais da pressão arterial caudal.....55
Quadro 2 - Valores individuais do percentual de expressão da COX-2 em rim.....57
Quadro 3 - lesões histopatológicas (HE) em vasos de rim de cada animal. ...58
Quadro 4 - Lesões histopatológicas (HE) em túbulos de rim de cada animal. 60

RESUMO xi
ABSTRACT.....xii
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 2
3 OBJETIVOS 7
4 MATERIAL MÉTODOS 8
4.1 Animais 8
4.2 Delineamento experimental 8
4.3 Administração de angiotensina II 9
4.4 Administração do inibidor seletivo da cicloxigenase-2 10
4.5 Administração do antagonista do TNF-α 10
4.6 Animais do grupo controle 11
4.7 Pressão Arterial Sistólica Caudal.....11
4.8 Eutanásia e coleta dos rins 12
4.9 Estudo histológico.....12
4.10 Imunohistoquímica.....13
4.10.1 Expressão da Ciclooxigenase-2 13
4.10.2 Avaliação do índice apoptótico 15
4.11 Concentração Sérica do TNF-α 15
4.12 Análise Estatística 16
5 RESULTADOS.....17
5.1 Pressão sistólica arterial caudal 17
5.2 Avaliação histológica 17
5.3 Correlação entre pressão arterial final e alterações histopatológicas..21
5.4 Imunoistoquimica.....21
5.5 Expressão da COX-2 21
5.6 Marcação da Caspase-3.....21
5.7 Concentração sérica de TNF-α.....21
6 DISCUSSÃO 27
6.1 Pressão arterial sistólica caudal 27
6.2 Avaliação histológica do rim.....28
6.3 Expressão de COX-2 30
6.4 Índice de apoptose.....31
6.5Concentração plasmática de TNF-α.....32

7 CONCLUSÕES 33
8 BIBLIOGRAFIA 34
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....43
10. ANEXOS.....55

RESUMO

SANTIN,F. **O papel da ciclooxigenase-2, da apoptose, do fator de necrose tumoral-α e da pressão arterial na lesão renal de ratos submetidos à infusão contínua de angiotensina II** .Botucatu, 2008. 61p.Thesis (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A angiotensina II (ANGII) é um vasoconstritor, no entanto, sua atuação na inflamação tem sido estudada. A ANGII pode regular a expressão celular de citocinas e moléculas envolvidas no processo de apoptose. Objetivos: verificar o estímulo da ciclooxigenase-2, a indução de apoptose, a influência do TNF-α e pressão arterial na lesão renal por ANGII. Foram utilizados ratos Wistar, nos grupos: Grupo 1: controle, Grupo 2: ANG II, Grupo 3: ANG II + infliximabe, Grupo 4: ANG II + celecoxibe, Grupo 5: infliximabe e Grupo 6: celecoxibe. A ANGII foi administrada via mini-bomba no subcutâneo dos animais durante 72 horas, sendo então realizada a eutanásia. A pressão arterial foi aferida antes da administração dos fármacos e na eutanásia. Os rins dos animais foram colhidos para histopatologia e imunoistoquímica, avaliando-se a expressão de COX-2 e presença de caspase-3 ativa. O sangue dos animais foi colhido para dosagem de TNF-α. Concluiu-se que a ANGII promove lesões renais, independentemente dos valores da pressão arterial; ANGII associada ao celecoxibe, leva ao aumento da pressão arterial. O celecoxibe e o infliximabe não protegeram os rins contra as ações da angiotensina II. O Infliximabe causa lesões no interstício renal, e a ANGII não promove a apoptose da células renais.

Palavras- chave: angiotensina II, celecoxibe, infliximabe, ratos Wistar, rins

ABSTRACT

SANTIN, F. **The role of cyclooxigenase-2, apoptosis, tumor necrosis factor-α and blood pressure at the kidney damage in rats in response to angiotensin II.** Botucatu, 2008. 61p. Thesis (Doctorate) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu campus, São Paulo University.

ABSTRACT

The angiotensin II (ANGII) is a vasoconstrictor, however, her action in inflammation have been studied recently. The ANGII can regulate the cellular expression of cytokines and molecules involved in apoptosis. Objectives: to verify the stimulation of cyclooxigenase-2, the presence of apoptosis, the influence of TNF-α and blood pressure in renal damage by ANGII. Wistar rats were used in the following groups: Group 1: control, Group 2: ANGII, Group 3: ANGII + infliximib, Group 4: ANGII + celecoxib, Group 5: infliximab and Group 6: celecoxib. The ANGII was infused in the animals by subcutaneous osmotic mini-pumps during 72 hours. After that, euthanasia was performed. The blood pressure was recorded before drugs administration and before the euthanasia. Histopathological and immunohistochemistry were performed in kidneys to evaluate the expression of COX-2 and the expression of active caspase-3. TNF-α concentration was determined in the blood of the animals. It was concluded that the ANGII caused renal damage, independently of blood pressure values. ANGII associated with celeboxib created a blood pressure increasing. Celecoxib and infliximab did not protect the kidneys against ANGII activities. Infliximab caused renal intersticium damage and ANGII did not caused apoptosis in kidney cells.

Keywords: angiotensin II, celecoxib, infliximab, kidney, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

A angiotensina II (ANGII) é o principal componente do sistema renina angiotensina aldosterona, sendo um peptídeo com potente ação vasoconstritora. Entretanto, outras propriedades inerentes à ANGII têm sido recentemente estudadas, tais como a sua atuação como fator chave na indução da inflamação (SUZUKI et al., 2003; DAS, 2005). A ANGII pode regular a expressão celular de diversas substâncias, incluindo fatores de crescimento, citocinas e moléculas envolvidas nos processos de crescimento celular, inflamação e apoptose (ORTEGA et al, 2001; ORTEGA et al., 2006).

Dentre as possíveis citocinas moduladas pela angiotensina II encontra-se o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α). Foi demonstrado que o TNF-α induz a disfunção endotelial, inflamação e apoptose, sendo participante na fisiopatogenia de doenças cardiovasculares e renais (YOUNG et al., 2000; ARENAS et al., 2004, AKBULUT et al., 2005).

No rim, as prostaglandinas são importantes mediadores do tônus vascular, do balanço de sal e água e da liberação de renina. A enzima ciclooxigenase (COX), a qual possui duas isoformas a COX 1 e a COX2, inicia a conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas e tromboxano (CHENG e HARRIS, 2004). A isoforma COX2 é induzida em processos inflamatórios e de carcinogênese, entretanto, tem sua expressão detectada também em tecido normal de rim (HARRIS, 2002; MUNGAN, et al., 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram que tanto o TNF-α como a COX-2 tiveram aumento na sua produção e expressão, respectivamente, quando estimulados por angiotensina II (FERRERI et al., 1997; JAIMES et al., 2005), tornando necessário o desenvolvimento de estudos para se analisar as possíveis interações entre estes fatores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) desempenha diversas funções sobre os sistemas cardiovascular e endócrino, além de exercer papel fundamental no controle da composição e do volume do fluido extracelular (BOIM et al., 2000).

A angiotensina II (ANGII) é o principal polipeptídeo do SRAA e exerce múltiplos efeitos fisiológicos, pela ativação de receptores específicos presentes nos vasos, coração, rins, adrenal, cérebro, bem como no fígado (JACKSON & GARRISON, 1996). A ANGII promove aumento da pressão arterial sistêmica de forma direta e indireta, uma vez que promove vasoconstrição periférica e aumento no volume circulante (ROBINS&COTRAN, 2005). Por serem responsáveis pela produção da renina, com a subseqüente formação da ANGII, os rins têm papel importante no controle da pressão arterial (PA) (GYTON,1991; BOIM, et al., 2000).

A ação hipertensora sistêmica da ANGII pode levar à hipertensão glomerular e também à isquemia secundária à vasoconstrição intra-renal, com conseqüente diminuição do fluxo sangüíneo, lesionando os rins. Esta lesão renal poderá levar à ativação dos nervos aferentes renais, que então estimulam a liberação de componentes β-adrenérgicos do sistema nervoso central, que por sua vez estimulam a liberação de renina, com conseqüente aumento da ANGII (LONG et al., 2004).

Os rins doentes também promovem a continuidade da lesão devido à perda da capacidade de manter o mecanismo de auto-regulação, que normalmente atenua a transmissão direta da PA aos glomérulos (BIDANI & GRIFFIN, 2004). Como conseqüência do aumento na pressão intracapilar, ocorre a ruptura dos capilares glomerulares que permitem a passagem de proteínas, as quais lesionam os próprios glomérulos, bem como os túbulos renais, perpetuando a doença renal (GRAUER, 2005)

Duas alterações histológicas caracterizam os vasos sangüíneos na hipertensão maligna: necrose fibrinóide e espessamento da íntima das artérias, chamado de “casca em cebola”, devido à sua aparência concêntrica. A necrose fibrinóide caracteriza-se pela deposição patológica de material proteináceo, no

interstício e/ou na espessura da parede de pequenas artérias e capilares. O termo advém da semelhança histológica que esse material apresenta sob a coloração de hematoxilina-eosina (HE) com a fibrina. Esta alteração representa um processo agudo e pode estar acompanhada por um infiltrado inflamatório limitado dentro da parede, entretanto, este padrão de necrose geralmente não está acompanhado de inflamação proeminente (ALPERS, 2005; CAMARGO & ELGUI, 2007).

O endotélio vascular também exerce papel fundamental no controle da PA, sintetizando endotelinas (vasoconstritores potentes), óxido nítrico e prostaciclina (importantes vasodilatadores), todos exercendo papel fundamental na regulação do tônus vascular. As prostaglandinas atuam como hipotensoras, uma vez que reduzem a vasoconstrição induzida pela ANGII e aumentam a natriurese (METZE, 2006). A ANGII regula diversos processos envolvidos na fisiopatogenia vascular, tais como crescimento celular, apoptose das células vasculares, estímulo da produção de células musculares lisas e mesangiais, o que provavelmente a torna um importante mediador de processos inflamatórios tanto sistêmicos, como locais, sendo que os rins podem sofrer estas alterações (NORONHA et al., 2002; ORTEGA et al., 2006). Estas propriedades inerentes à ANGII, como fator chave na indução da inflamação, têm sido recentemente mais estudadas (SUZUKI et al., 2003; DAS, 2005).

A reação inflamatória é uma resposta de proteção do organismo a um agente ou lesão considerada nociva pelo mesmo. A reação pode ser localizada ou generalizada, e seu curso pode ser agudo ou crônico (JERICÓ & ANDRADE, 2008). A ANGII exerce efeitos celulares diretos e indiretos, os quais contribuem para o desenvolvimento do processo de inflamação e fibrose tecidual, e participam da patogenia de doenças renais (NORONHA et al., 2002; SUZUKI et al., 2003; RUPEREZ et al., 2005).

A via enzimática da ciclooxigenase (COX) participa da indução do processo inflamatório, onde a enzima ciclooxigenase atua quebrando o ácido aracdônico e convertendo-o em prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos (NIE & HONN, 2004; HÉTU & RIENDEAU, 2005). A COX existe em duas isoformas a COX 1 e a COX2, sendo que a primeira tem sua expressão em

tecidos normais, e a segunda, tem sua expressão induzida principalmente em processos de inflamação (GONÇALVES et al., 2004; SAKURAI et al., 2005), entretanto, HARRIS (2002), RICHTER et al.(2004) e BRATER et al. (2001) demonstraram que a COX2 também é constituinte do tecido renal normal, tendo sua expressão na mácula densa, alças de Henle e células intersticiais da região medular renal.

Os produtos da COX podem ter importante papel na patogênese de nefropatias, uma vez que estudos experimentais demonstraram um aumento na expressão renal da isoforma COX-2 em ratos com hipertensão arterial, em rins após ablação, e em tumores nestes órgãos (GONÇALVES et al, 2004; JAIMES, et al., 2005; SAKURAI et al., 2005).

As prostaglandinas são importantes mediadores do tônus vascular, do balanço de sal e água e da liberação de renina no rim. Tanto a córtex renal quanto a região medular renal sintetizam prostaglandinas, entretanto, a capacidade de síntese de prostaglandinas da medula é significativamente maior que a córtex (FOEGHT & RAMWELL, 2006). Trabalhos experimentais em ratos demonstraram que a atividade de produção de prostaglandinas vasodilatadoras renais, encontra-se aumentada em resposta à ANGII através da via enzimática COX-2 (YOUNG et al., 2000; QI et al., 2006).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) encontram-se entre os fármacos mais utilizados em todo o mundo, foram desenvolvidos para tratar condições dolorosas e inflamatórias, agudas e crônicas (COSTA et al.,2007; JERICÓ e ANDRADE, 2008). A atividade antiinflamatória dos AINES é mediada principalmente pela inibição da biossíntese das prostaglandinas. Os inibidores seletivos da COX-2 ou os denominados coxibes, foram desenvolvidos na tentativa de inibir a síntese das prostaciclinas produzidas pela isoenzima COX-2, induzida em locais de inflamação. Estes medicamentos ligam-se seletivamente ao sítio ativo da enzima COX-2 para bloquear sua ação. Eles exercem efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios semelhantes aos AINES não específicos, porém com menor efeito colateral gastrointestinal, sendo o celecoxibe um exemplo desta classe de fármacos (FITZGERALD & PATRONO, 2001; WAGNER et al., 2006).

Uma vez que há a expressão da COX-2 de forma constitutiva nos rins normais, atenção é voltada para possíveis ações deletérias dos coxibes nestes órgãos (BREYER & HARRIS, 2001; BRATER, 2002). BREYER et al. (2001) e FOSSLIEN (2005) chamam a atenção para a capacidade dos coxibes em promoverem diminuição da excreção renal de sódio, com respectivo aumento na retenção de água, edema celular e ganho de peso, além da diminuição de prostaciclinas, fatores que promovem hipertensão arterial.

O mecanismo final de agressão tissular por mediação inflamatória envolve processo complexo que inclui a quimiotaxia de leucócitos, liberação de proteases, efeito tóxico celular e apoptose. Durante os últimos anos, tem se tornado evidente tanto em humanos quanto em modelos experimentais, o papel da apoptose como uma importante forma de morte celular em processos de doença renal (THURMAN, 2006; TERUYA et al., 2008). Tao et al. (2005) demonstraram que ratos apresentando rins policísticos, ao serem tratados com um inibidor de caspase, tiveram o número de células em apoptose diminuído, bem como tiveram diminuição na formação de cistos renais, em relação ao grupo controle, o qual não recebeu o inibidor da caspase. YANG et al. (2006) demonstraram aumento do índice de apoptose, por intermédio da expressão da caspase-3, em rins de ratos lesionados por meio de isquemia e reperfusão experimental.

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um fenômeno em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam com sua morte (FILHO, 1998; CHEVILLE, 2002). Uma característica específica da apoptose é a hidrólise de proteínas envolvendo a ativação de vários membros de uma família de cisteína-proteases, denominadas caspases. A clivagem por caspases, das proteínas do citoesqueleto e da estrutura nuclear, produz as estruturas nucleares e citoplasmáticas distintas, vistas nas células apoptóticas (COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000). Morfologicamente, algumas das principais alterações celulares observadas na apoptose incluem a condensação da cromatina, formação de pregas ou bolhas na membrana plasmática, além da fragmentação celular em corpúsculos apoptóticos, os quais podem ser identificados em cortes corados pelo método de rotina com coloração de

hematoxilina- eosina. Por métodos de análise por imunoistoquimica, pode ser detectada a forma ativa da caspase-3, que demonstra que a célula entrou em estágio irreversível de morte celular (BENETONE, 2005, SHIHAB et al., 2005). A caspase-3 pode ser detectada em tecidos renais normais, devido a um “turn-over” fisiológico destas células, detectando-se sua expressão de forma dispersa pelo órgão (ALVES et al., 2004).

Acredita-se que o fator de necrose tumoral-α (TNF-α), tenha importante papel na indução de apoptose das células renais (MELDRUM et al., 2001; ROSS, 2002). O TNF-α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos ativados, que participa na indução da inflamação (WANG et al., 2003; TIZARD, 2002). É atribuída ao TNF-α, a capacidade de participar na indução de hipertensão arterial, bem como na promoção de doenças renais, como por exemplo, nas glomerulonefrites e nefropatia diabética (ELMARAKBY et al., 2007). Também se atribui ao TNF-α a capacidade de induzir um aumento na expressão da COX-2 nos rins (GAMBARO & PERAZELLA, 2004). A produção contínua do TNF-α também contribui para a caquexia, um estado patológico caracterizado pela perda de peso e anorexia (ROBINS & COTRAN, 2005). O TNF-α pode ser liberado após lesão celular, bem como pelo estímulo da ANGII (YOUNG et al., 2000, NESTORIDI et al., 2008).

Medicamentos antagonistas do TNF-α têm sido empregados com o intuito de verificar sua possível ação na melhora do processo inflamatório, e de suas conseqüências deletérias ao organismo (FITCHTLSCHERER et al., 2001). Dentre estes medicamentos, o infliximabe é um fármaco de utilização recente e que possui meia-vida de aproximadamente 10 dias, quando administrado por via intravenosa, em seres humanos (BLAM & STEIN, 2001). Ele se liga aos receptores celulares do TNF-α, impedindo que este último interaja com eles (ELMARAKBY et al., 2007). MORIWAKI et al. (2007) e KAGAWA et al. (2008) observaram efeitos benéficos do infliximabe no tratamento de doenças renais como nefropatia diabética e carcinoma renal, respectivamente, justificando a necessidade de estudos adicionais sobre os possíveis mecanismos de lesão via TNF-α.

3. OBJETIVOS

- Verificar se a lesão renal induzida pela angiotensina II (ANGII) em infusão contínua de 72 horas tem como mecanismo de ação o estímulo da ciclooxigenase-2.

- Verificar se a ANGII administrada em infusão contínua de 72 horas induz à apoptose em tecido renal.

- Verificar a influência do fator de necrose tumoral-α na indução de lesão renal.

- Avaliar o comportamento da pressão arterial da infusão contínua de ANGII em 72 horas na pressão arterial

- Avaliar a relação entre pressão arterial e magnitude e tipo de lesão renal.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, com aproximadamente 250 g de peso corpóreo, provenientes do CEMIB- Unicamp, Campinas-SP. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, em ambiente com controle de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura constante (25º C), recebendo dieta padrão e água *ad libitum*. Os procedimentos realizados nos animais foram executados no Centro de Pesquisa da Faculdade de Medicina – Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica – UNESP –Botucatu. As técnicas utilizadas e o manejo dos animais foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ- UNESP- Botucatu, como protocolo de número 109/07.

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos:

- Grupo 1: ratos controle (n = 10)
- Grupo 2: ratos tratados com ANGII (n = 11)
- Grupo 3: ratos tratados com iCOX-2 (Celecoxibe, CELEBRA®) 10 mg/kg/dia, via gavagem); n = 9
- Grupo 4: ratos controle antagonista TNF-α (Infliximabe, REMICADE®) 4 mg/kg, IP (n = 12)
- Grupo 5: ratos tratados com ANGII + iCOX-2 (Celecoxibe, CELEBRA®) 10 mg/kg/dia, via gavagem); n = 9

Grupo 6: ratos tratados com ANGII + antagonista TNF-α (Infliximabe, REMICADE®) 4 mg/kg, IP (n = 11)

Após a divisão dos animais seguiu-se o seguinte protocolo experimental (Figura 1):

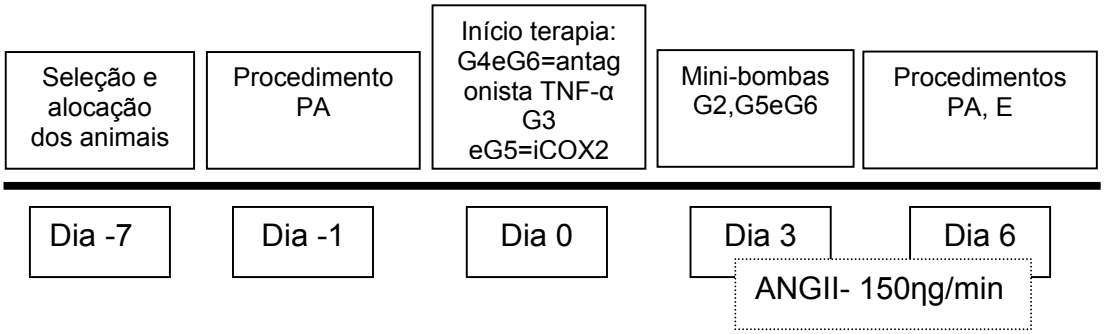

FIGURA 1 - Protocolo experimental de avaliação dos ratos controle e tratados (Remicade® - antagonista TNF-α ou Celebra® – inibidor COX2) que foram submetidos a infusão contínua de angiotensina II (ANGII) por 3 dias. PA=pressão arterial, iCOX2=inibidor da COX2, E=eutanásia, G=grupo experimental.

4.3 Administração de angiotensina II

A lesão renal foi induzida por meio de infusão contínua de angiotensina II[1] (150 ηg/min/SC). Essa dosagem foi descrita por causar lesão renal de aspecto inflamatório (VAILATI et al., 2001).

A Infusão contínua de ANGII foi administrada por meio de mini-bombas osmóticas (modelo #2002)[2] (Figura 2), implantadas no subcutâneo do animal (RUPEREZ et al., 2003; RUPEREZ et al., 2005; JAIMES et al., 2005). Os ratos foram anestesiados com a associação de quetamina[3] (50 mg/ Kg IM) e xilazina[4] (10 mg/ Kg IM) e a mini bomba foi implantada por meio de pequena incisão no dorso dos animais. Esse dispositivo libera 0,5 µL/ hora de solução. Assim, as mini-bombas foram preenchidas com solução contendo ANGII, para oferecer ao animal a dose de 150 ηg/min.

[1] Sigma®- Missouri-USA
[2] Alza Corp®
[3] Katamin® Lab Cristália
[4] Rompum®- Bayer

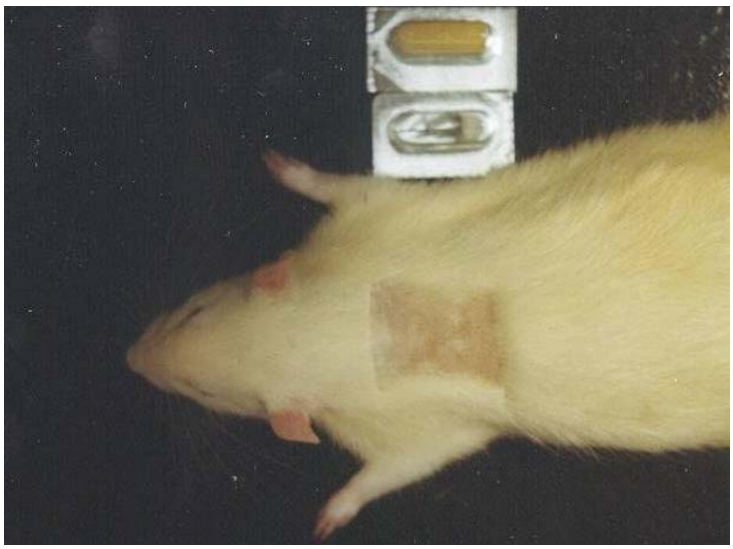

FIGURA 2 - Rato preparado para colocação da mini-bomba contendo AII.

4.4 Administração do inibidor seletivo da cicloxigenase-2

O inibidor seletivo da cicloxigenase-2 (iCox2) utilizado foi o celecoxibe[5], na dose de 10 mg/kg/dia, via gavagem (PINHEIRO & CALIXTO, 2002; HOLZHAUSEN et al., 2002). A administração do iCox2 foi iniciada três dias antes do início da infusão contínua de AII, e continuo a ser ministrada até o final do experimento, com o objetivo de observar a influência da inibição da Cox-2 no aparecimento de lesões induzidas pela ANGII.

4.5 Administração do antagonista do TNF-α

O antagonista do TNF-α utilizado foi o infliximabe[6] na dose de 4mg/kg, por via intraperitoneal (OLMARKER et al., 2003; MURATA et al., 2005). A primeira, e única aplicação deste produto, foi realizada três dias antes da colocação da mini-bomba (dia 0), com o objetivo de observar a influência do antagonismo do TNF-α no aparecimento de lesões induzidas pela ANGII.

---

[5] Celebra®- Pfizer
[6] Remicade®- Shering - Plough

4.6 Animais do grupo controle

Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico e também sofreram uma incisão no subcutâneo, tendo passado por condições idênticas aos animais que receberam o implante das mini-bombas.

4.7 Pressão Arterial Sistólica Caudal

A pressão arterial sistólica caudal foi obtida aproximadamente vinte e quatro horas antes do início dos tratamentos, com o intuito de ser obtido o valor da pressão arterial basal dos animais, e no dia do sacrifício, com o intuito de se observar a influência de cada tratamento na pressão arterial dos animais, utilizando-se o sistema de pressão caudal com polígrafo modelo RS3200-Gould e o esfigmomanômetro Narco Bio-Systems PE-300 (Figura 3).

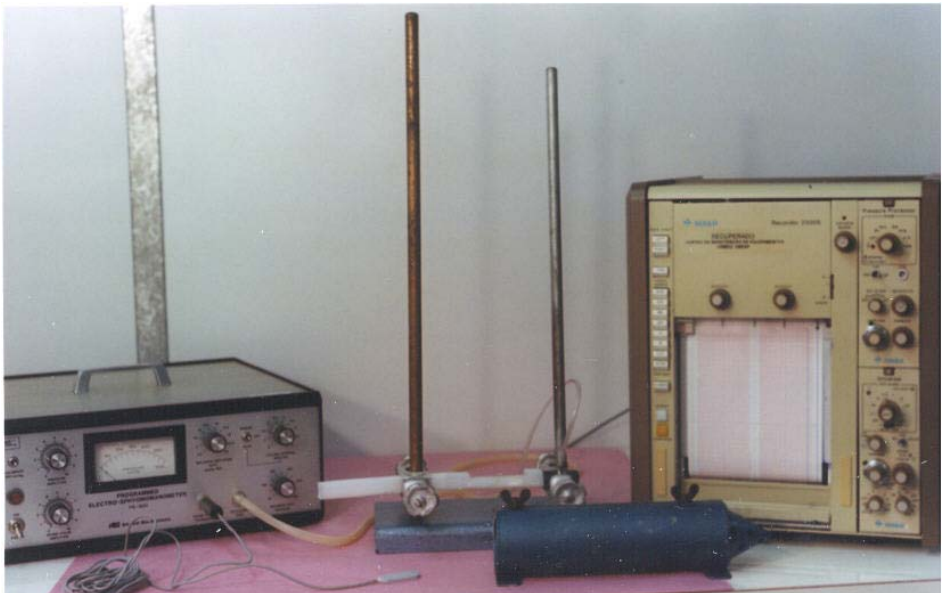

FIGURA 3 - Sistema de pressão caudal com polígrafo modelo RS3200-Gould e o esfigmomanômetro Narco Bio-Systems PE-300.

4.8 Eutanásia e coleta dos rins

A eutanásia foi efetuada 72 horas após o implante das mini-bombas osmóticas, por meio da utilização de pentobarbital sódico[7] intraperitoneal e posterior toracotomia e celiotomia para retirada e coleta de ambos os rins.

4.9 Estudo histológico

Após a excisão dos rins pelo método acima descrito, um fragmento de ambos os rins foi destinado ao estudo histológico**.** O tecido renal foi fixado em solução tamponada de formol a 10% por período de 24 horas. Após a fixação, foram inclusos em bloco de parafina, obtendo-se a partir daí, cortes histológicos renais de cinco micras para coloração com Hematoxicilina-eosina (HE).

As lâminas foram examinadas sem conhecimento prévio dos grupos experimentais. As alterações histológicas dos glomérulos, túbulos, interstício e vasos foram graduadas semiquantitativamente segundo escala de 0 a 3+, a saber: ausência de lesão = 0, lesão discreta = 1+, lesão moderada = 2+, lesão intensa = 3+. Em relação às lesões vasculares foi considerada lesão discreta = 1 a 5 vasos comprometidos, lesão moderada = lesão em 6 a 10 vasos e lesão intensa = mais de 10 vasos com lesão.

As alterações semiquantificadas foram avaliadas em glomérulos quanto à proliferação epitelial, mesangial e endotelial, matriz mesangial, necrose, esclerose e aderências do tufo glomerular com a cápsula de Bowman. Os túbulos foram avaliados quanto à degeneração celular, necrose, regeneração e atrofia. No interstício foi avaliada presença de edema, infiltrado inflamatório e fibrose, e os vasos foram avaliados quanto à presença de fibroelastose das artérias, arteriolosclerose hialina, endarterite proliferativa, necrose fibrinóide e congestão. Definiu-se como índice de lesão glomerular (ILG), túbulo-intersticial (ILT-I) e vascular (ILV) a somatória dos sinais positivos (+) atribuídos a cada uma das alterações acima mencionadas. A soma destes índices foi o índice de lesão renal total (ILR).

---

[7] Tiopental® Lab Cristália

4.10.imunoistoquimica

4.10.1 Expressão da Ciclooxigenase-2

Foi avaliada a expressão de COX2 renal, utilizando-se o kit Monoclonal Mouse Anti-Human COX-2 (Cyclooxygenase-2) Clone: CX-294 (Dako®). Estas reações foram realizadas no laboratório de imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu, sob a orientação da professora Dra. Renée Laufer Amorim**.** Para realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram novamente cortados em micrótomo com espessura de três µm e distendidos em lâminas histológicas previamente preparadas com Organosilano (Sigma-Aldrich A3648) com o intuito de promover maior aderência dos cortes às lâminas, evitando a perda do material durante o procedimento imunoistoquímico. As lâminas foram colocadas em estufa com temperatura entre 55 e 58ºC por 24 horas, e transferidas para cubas de vidro vertical para iniciar a técnica de imunoistoquímica.

A técnica de imunoistoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu. A desparafinização foi realizada com dois banhos em xilol de 30 minutos e 20minutos em temperatura ambiente. O processo de desidratação foi realizado com passagens em álcool 95º, em álcool absoluto, álcool 95º e álcool 85º (três minutos).

A recuperação antigênica pelo calor é a etapa que tem como objetivo a liberação dos epítopos antigênicos do tecido, bloqueados pela solução fixadora (formol 10%). Procedeu-se a recuperação antigênica na qual, para o anticorpo primário anti-COX-2 (Dako M3617, clone CX-294), padronizou-se a solução de citrato 10mM, pH 6,0, pré-aquecida em banho-Maria à 96ºC. Após o pré-aquecimento as lâminas foram introduzidas na solução e mantidas por 25 minutos. Após o resfriamento do material seguiu-se com dez lavagens em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 10 volumes por 20 minutos e em seguida, lavou-se o material em água destilada e posteriormente em solução tampão de TRIS HCl (Trizma base, Sigma, T1503;

NaOH P.A Merck, 106404.1000) por 10 minutos em duas trocas de cinco minutos cada.

As lâminas foram retiradas das cubas de vidro e foram depositadas em câmara úmida para incubação com BSA 1% (Albumina sérica bovina – Sigma A7906) durante uma hora em temperatura ambiente. Este procedimento tem a finalidade de reduzir as marcações inespecíficas (“fundo“). O excesso de BSA 1% foi retirado e procedeu-se a incubação com os anticorpos primários monoclonais em câmara úmida por 18 horas (“over-night”) à 4ºC.

Após este período, as lâminas foram lavadas em TRIS (dois banhos de cinco minutos) para iniciar a próxima etapa. Para o processo de incubação com o anticorpo secundário foi utilizado o Kit Envision (Dako K4065) durante uma hora em temperatura ambiente. Após incubação as lâminas foram lavadas em solução tampão de TRIS por cinco minutos. Para a revelação da reação foi empregada solução pronta para uso de DAB, seguindo as recomendações do fabricante (Dako K34466) por cinco minutos, em seguida lavou-se o material em TRIS e água destilada, procedendo-se a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Foi realizada nova lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem em bateria de desidratação com álcoois 85%, 95% e absolutos.

As lâminas foram montadas (Permount – Fischer Scientific –SP 15-500) com lamínulas e levadas ao microscópio para avaliação da imunomarcação. Nas baterias de imunoistoquímica foi feita uma lâmina de controle negativo onde foi suprimido o anticorpo primário na incubação, e substituído por BSA 1% e imunoglobulina de mouse (Dako®). As análises imunoistoquímicas de COX-2 foram realizadas avaliando o percentual de células marcadas em toda extensão da lâmina, em aumento de 40x com auxílio do programa de análise de imagens QWin v3,0 Leica e uma câmera digital Leica DFC acoplada a um microscópio Leica DMLD.

4.10.1 Avaliação do índice apoptótico

Para a identificação de células apoptóticas renais foi utilizada a técnica de imunoistoquimica para a detecção da proteína caspase – 3 clivada (também denominada caspase-3 ativa), utilizando anticorpo anti-caspase-3 clivada[8], sintetizado em coelho. Estas reações foram realizadas no laboratório de imunoistoquimica do departamento de patologia veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu/SP.

Cortes histológicos de três µm em lâminas silanizadas foram desparafinados com banhos sucessivos de xilol e álcool etílico absoluto. A recuperação dos epítopos foi realizada com o aquecimento do tecido renal embebido em solução EDTA 1Mm pH 8.0 utilizando-se vapor[9],durante 15 minutos. Em seguida os fragmentos foram tratados com peróxido de hidrogênio a 10% por 10 minutos para o adequado bloqueio da atividade da peroxidase endógena tecidual. Em seguida, os cortes foram incubados overnigth a 4º C com os anticorpos anticaspase-3 clivada, no título de 1:50. Após a adequada retirada dos anticorpos excedentes com solução de tris, o tecido foi incubado em temperatura ambiente por uma hora, com o kit Envision. A presença de caspase- 3 clivada foi detectada com o kit Envision.

4.11 Concentração Sérica do TNF-α

A concentração sérica do TNF-α foi realizada a partir da coleta do sangue dos ratos, realizada por punção intra-cardíaca no momento da eutanásia dos animais. O sangue foi colhido utilizando-se o anticoagulante EDTA, sendo então centrifugado por 20 minutos, a 10xg, após 30minutos da coleta. O TNF-α foi então dosado no plasma, utilizando-se o kit rat TNF-α/ TNFSF1A Immunoassay[10], utilizando-se as normas do fabricante, incluindo os valores normais da concentração plasmática de TNF- α de 12,5pg/mL.

---

[8] Anticorpo Cell Signalling Technology®,Beverly,MA, USA.
[9] Aqua Timer®,Arno
[10] Quantikine®, R&DSystems,Inc

4.12 Análise Estatística

Os índices de lesões glomerular (ILG), túbulo-intersticial (ILT-I), vascular (ILV) e renal total (ILRT), bem como a marcação positiva para COX2, foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com teste de comparações múltiplas de Dunn (DeMUTH, 1999). A variável pressão arterial final foi avaliada através de análise de covariância com a pressão inicial utilizada como covariável (SNEDECOR & COCHRAN, 1989). Também foi determinado o grau de correlação entre a variável pressão arterial final e índice de lesão renal no exame histopatológico, pela análise de correlação simples de Sperman (DeMuth, 1999), para determinar a relação entre pressão arterial e grau de lesão renal. A probabilidade de significância mínima foi estabelecida em 5% ($p<0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Pressão sistólica arterial caudal

Houve aumento significante da pressão arterial final (mmHg) nos animais do grupo de tratamento 5 (ANGII+ celecoxibe). Os grupos controle, ANGII, Celecoxib, ANGII+Infliximabe e Infliximabe apresentaram valores semelhantes entre sí, e menores do que o grupo ANGII+Celecoxibe.

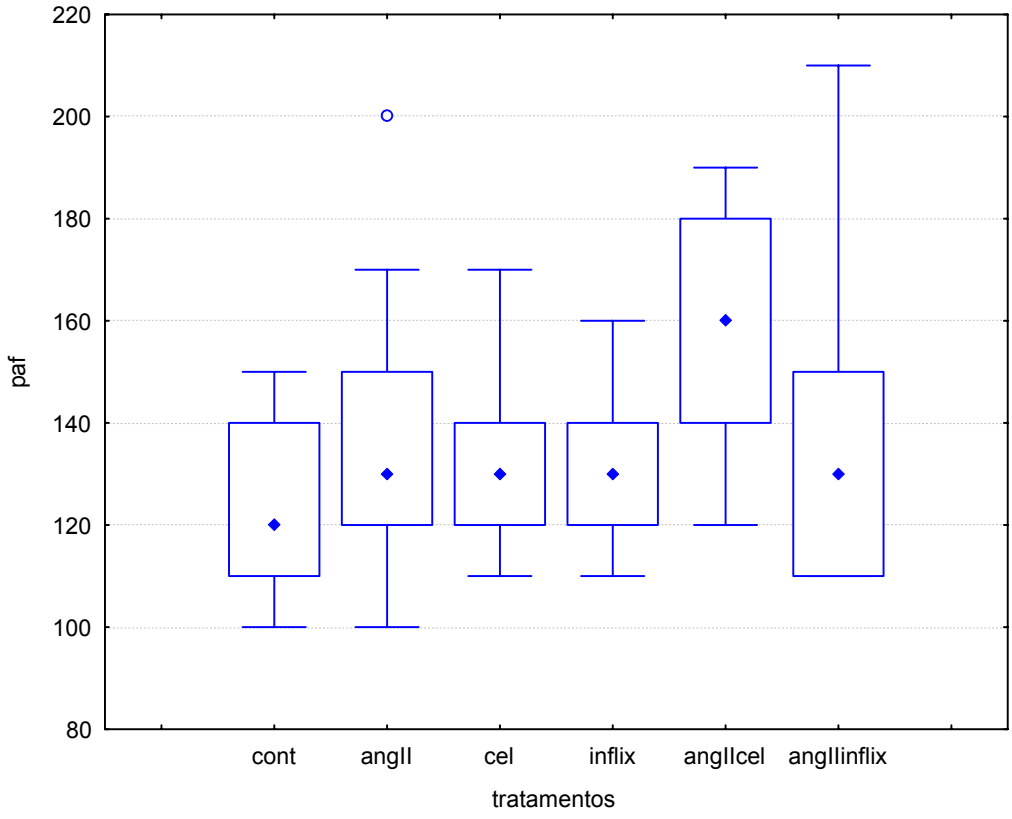

FIGURA 4 – Valores da pressão arterial final dos ratos em cada tratamento.

5.2 Avaliação Histológica

A análise morfológica mostrou fundamentalmente lesões vasculares associadas às lesões degenerativas e/ ou de necrose dos túbulos. As lesões

vasculares ocorrem tanto em artérias de médio como de pequeno calibre, e mais raramente comprometem as arteríolas. As lesões são focais no rim, e segmentares na parede dos vasos. Caracterizam-se principalmente por necrose fibrinóide da camada média dos vasos (Fig. 9, 10 e 11), associada à sinais de reatividade das células musculares, hemorragia com fragmentação de hemácias, hiperplasia e inflamação da adventícia. Não foram observados trombos nestes vasos. Também não foram observadas lesões de endarterite proliferativa na íntima dos vasos. Ao nível dos túbulos observa-se lesões degenerativas caracterizadas por vacuolização citoplasmática e, por vezes, focos de necrose com coagulação do citoplasma. Alguns casos mostraram sinais de atrofia e, raramente havia cilindros hialinos de proteínas em grande quantidade, indicando possivelmente proteinúria (Figura 12). As lesões glomerulares foram ocasionais e devem ser secundárias às lesões arteriolares de necrose, caracterizaram-se por áreas segmentares do tufo glomerular com proliferação mesângio-endotelial e necrose. O interstício raramente esteve afetado. O conjunto dos achados é compatível com microangiopatia trombótica com lesões predominantemente arteriais. As lesões são agudas, não se observando nenhum sinal de cronicidade (Tabela 1, Figura 5, figura 6, Figura 7).

Na análise da variável ILG (índice de lesão glomerular), não houve diferença estatística entre os grupos. Em relação a variável ILT-I (Índice de lesão tubular intersticial), houve diferença estatística entre os grupos 6 e 3, e entre 6 e 1 ($p= 0,003$). Os grupos 6 e 3, e 2 e 3, apresentaram diferença estatística quanto a variável ILV (Índice de lesão vascular) ($p<0,001$). Na análise da variável ILRT (Índice de lesão renal total), houve diferença estatisticamente significante entre os grupos 6 e 3, 6 e 1 e, 2 e 3 ($p<0,001$). O grupo 1 refere-se ao controle, o grupo 2 a ANGII, o grupo 3 ao celecoxibe, o grupo 4 ao infliximabe, o grupo 5 ao ANGII+celecoxibe e o grupo 6 ao ANGII+infliximabe.

TABELA 1 – Porcentagem de alterações histológicas de rins (HE) de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

TRATAMENTOS	Necrose Vascular	Degeneração tubular	Necrose tubular	Cilindros tubulares	Atrofia
CONTROLE	0	30	10	20	10
ANGII	80	80	30	50	60
iCOX2	0	50	10	50	20
AntiTNF	8,33	91,7	33,3	58,3	36
ANGII + iCOX2	66,7	66,7	11,1	66,7	44,4
ANGII + antiTNF	72,7	100	36,4	72,7	88

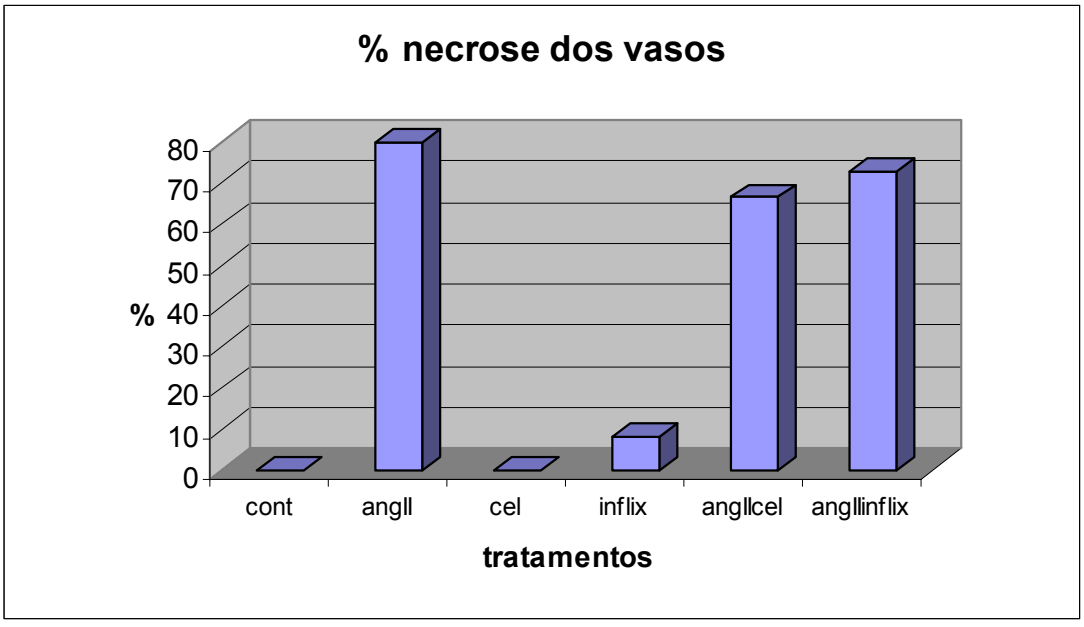

FIGURA 5 – Porcentagem de necrose dos vasos de rins de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

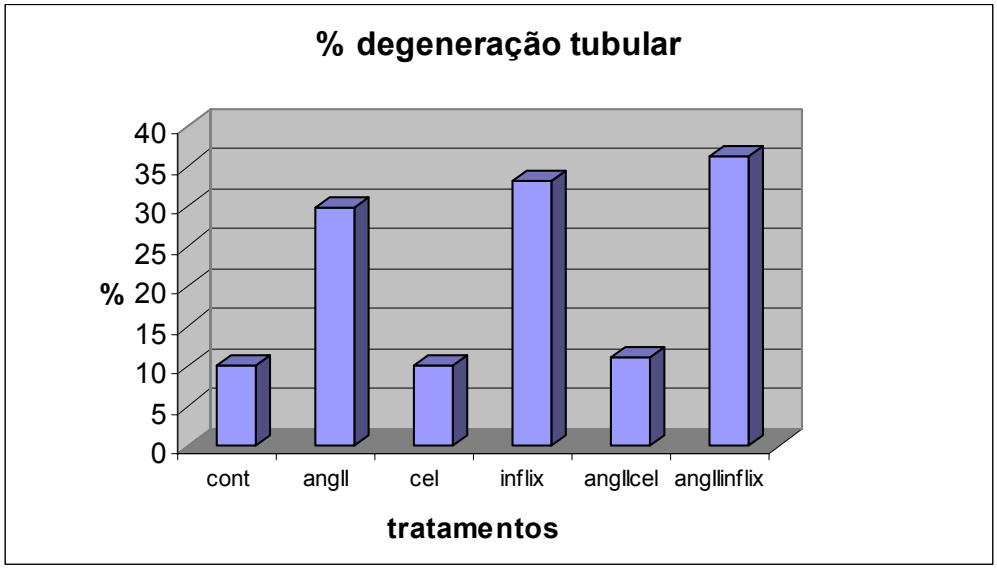

FIGURA 6 – Porcentagem de degeneração tubular em rim de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

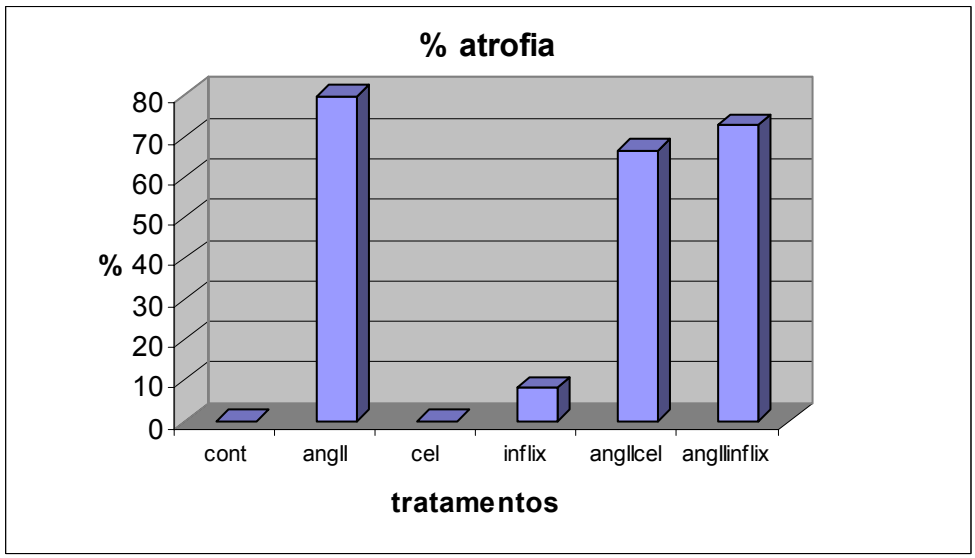

FIGURA 7 - Porcentagem de atrofia tubular em rim de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

5.3 Correlação entre pressão arterial final e alterações histopatológicas

A análise estatística não demonstrou diferença significante entre os grupos estudados, portanto não houve correlação entre a pressão arterial final e ocorrência de lesão renal.

5.4 Imunoistoquimica

5.5 Expressão da COX2

As figuras 13 e 14 ilustram a imunomarcação positiva para a expressão da COX-2 em rim. Não houve diferença estatística significante entre os seis grupos estudados.

5.6 Marcação para Caspase -3

Não foi observada imunomarcação para caspase-3 nos rins de nenhum dos animais dos diferentes grupos de tratamento (figs15 e 16).

5.7 Concentração sérica de TNF-α

Na análise dos valores da concentração sérica de TNF-α, não houve diferença estatística significante nos diferentes grupos estudados (Figura 8).

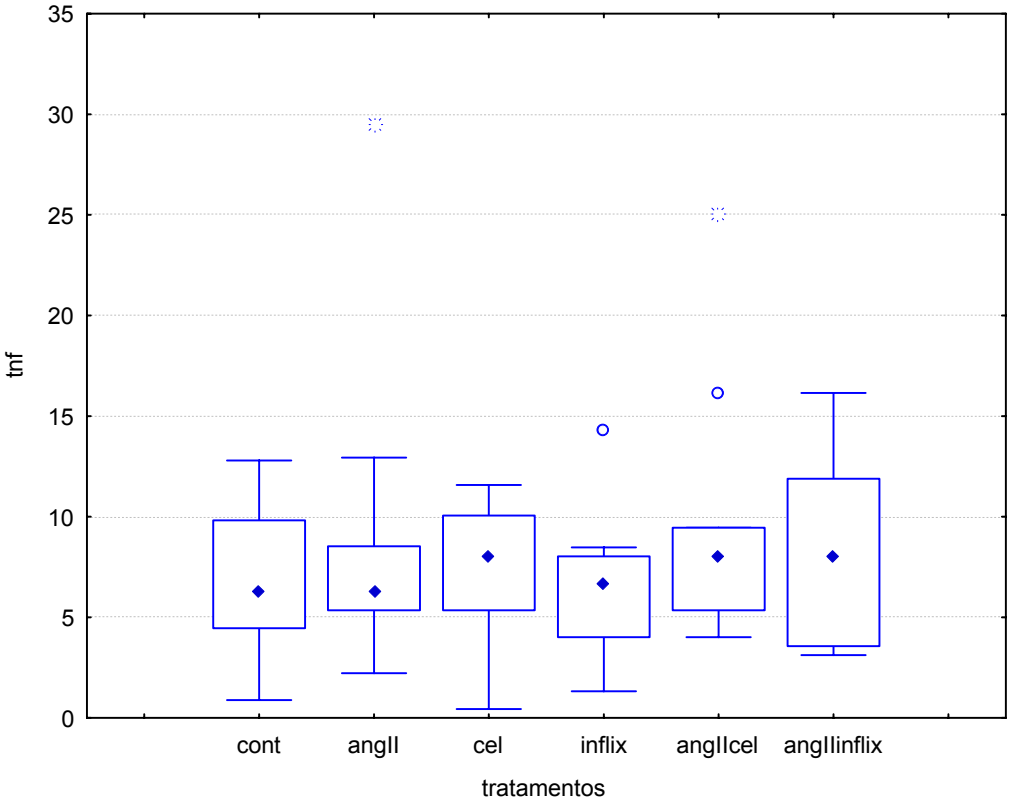

FIGURA 8- Concentração sérica de TNF-α (pg/mL) nos diferentes grupos de tratamento.

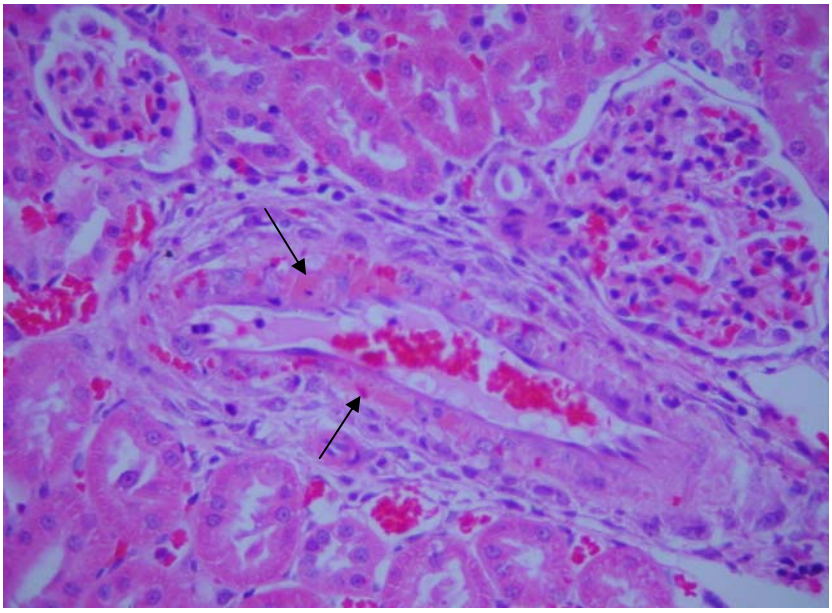

FIGURA 9 – Rim de rato Wistar tratado com ANGII: presença de necrose fibrinóide segmentar em artéria.

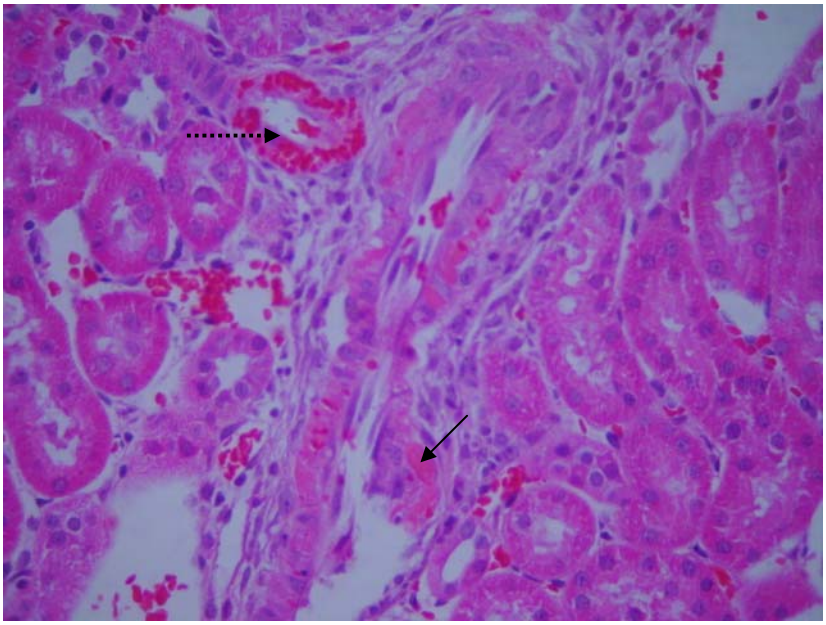

FIGURA 10 – Rim de rato Wistar tratado com ANGII: presença de necrose fibrinóide segmentar (→) e presença de necrose com hemorragia (- - ▶) em artéria (HE-400x).

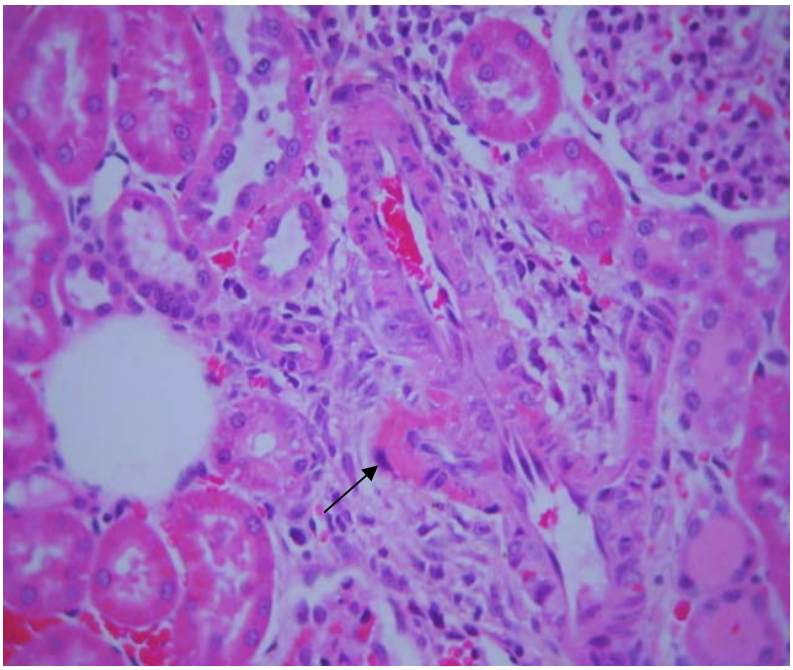

FIGURA 11 - Rim de rato Wistar tratado com ANGII+Infliximabe: presença de necrose fibrinóide segmentar em artéria (HE- 400x).

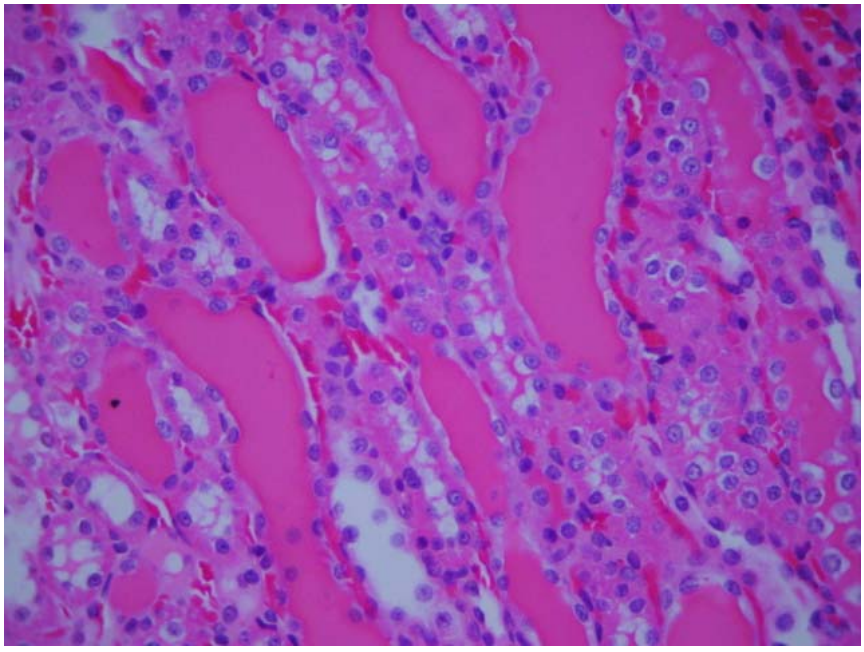

FIGURA 12 - Rim de rato Wistar tratado com ANGII+Infliximabe: presença de cilindros (HE-400X).

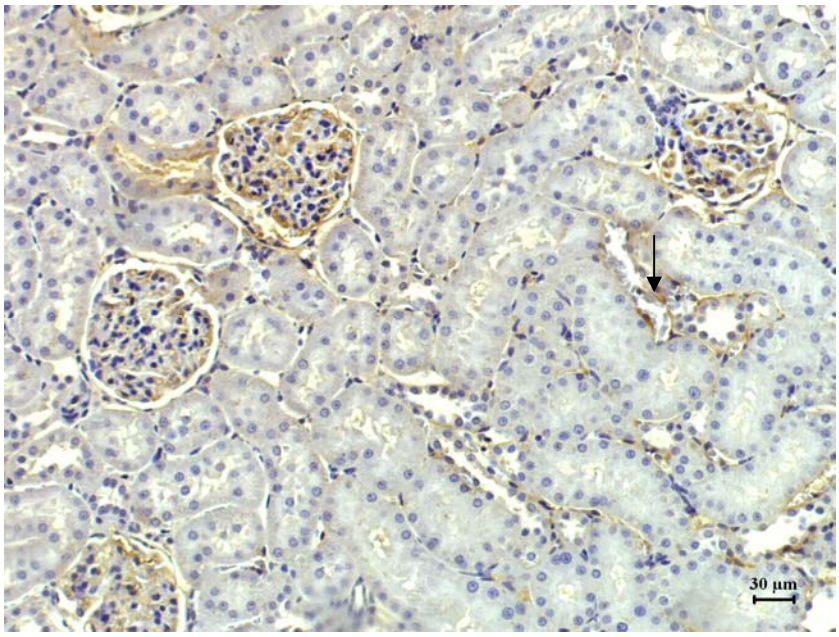

FIGURA 13 - Marcação positiva (→)para COX-2 em rim de rato Wistar tratado com ANGII (400x).

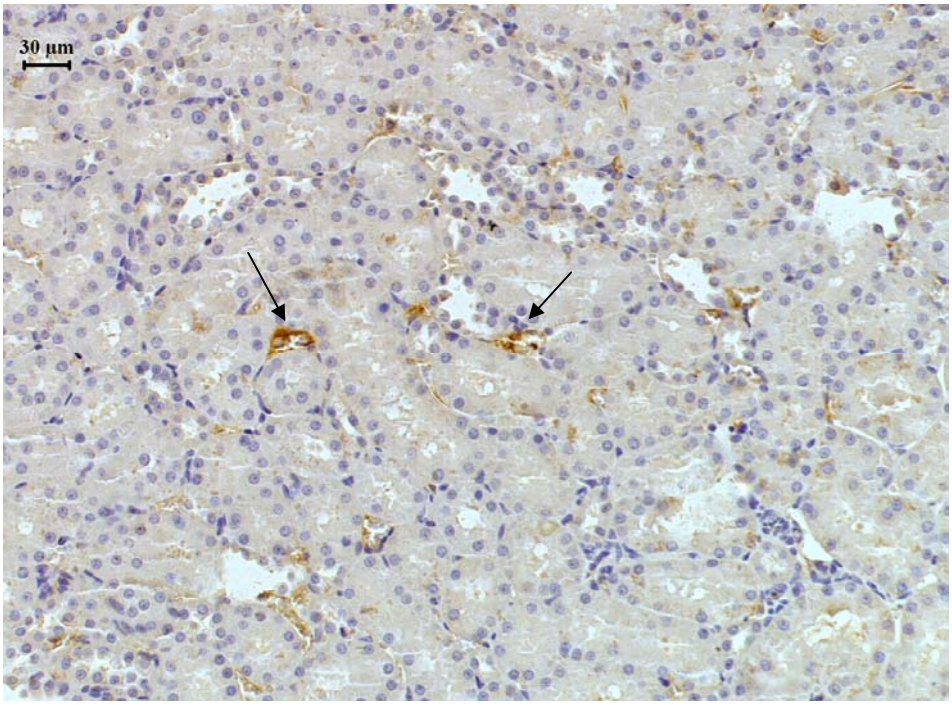

FIGURA 14 - Marcação positiva (→)para COX-2 em rim de rato Wistar tratado com ANGII+ Celecoxibe (200x).

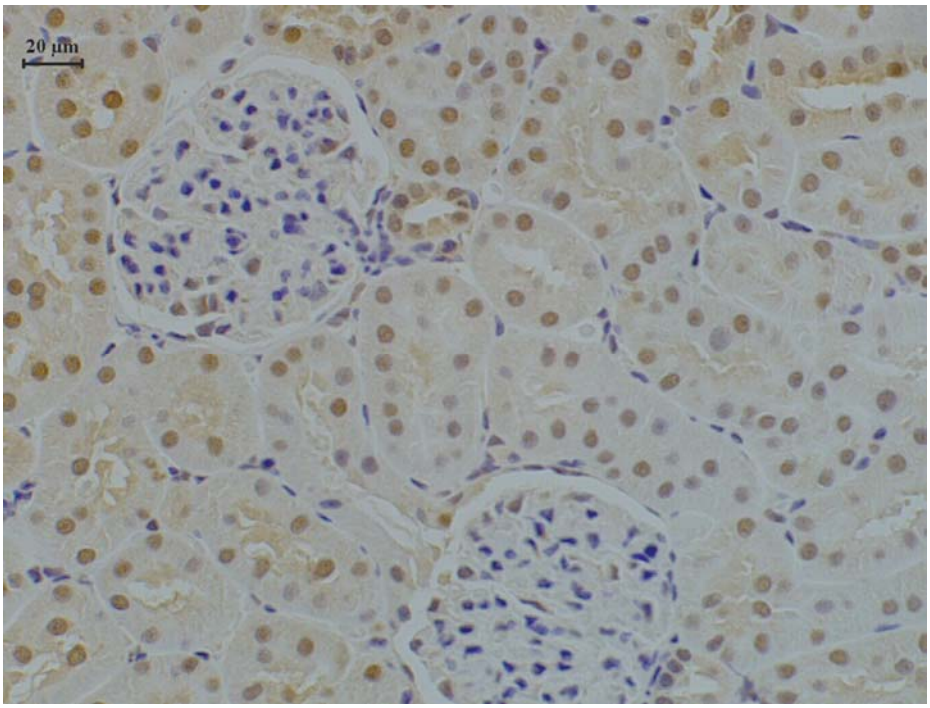

FIGURA 15 - Ausência de marcação para caspase-3 em rim de rato Wistar tratado com ANGII+ Celecoxibe (400x).

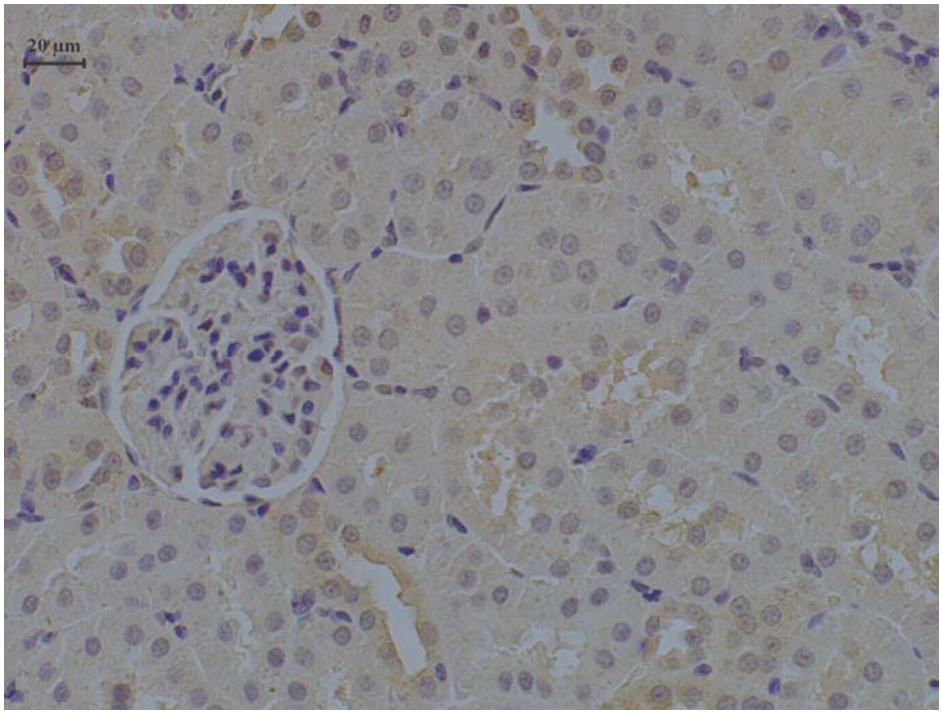

FIGURA 16 - Ausência de marcação para caspase-3 em rim de rato Wistar tratado com Infliximabe(400x).

6. DISCUSSÃO

6.1 Pressão arterial sistólica caudal

A infusão subcutânea contínua de ANGII não causou hipertensão arterial significante neste protocolo experimental. Apenas seis animais, dentre os 30 dos grupos que receberam ANGII, apresentaram valor maior que 150 mmHg, ver Tabela 2 em anexo, contrariando os achados de HENEGAR et al. (1995) e VAILATI (2001), que com esta mesma dose, obtiveram elevação na pressão arterial sistólica caudal. Uma possível explicação para estes achados, consiste no mecanismo de ação pressórica da ANGII, que é dose e tempo dependente (LEVER et al.,1992; EDGLEY et al., 2003), sendo assim a dose deste protocolo experimental, poderia potencialmente promover aumento dos valores de PA, caso fosse administrada durante um período maior de dias.

Os animais 19 e 44 dos grupos de tratamentos ANGII e ANGII+celecoxibe, obtiveram os mais altos valores de PA, ver tabela 2, sendo que os animais do grupo ANGII+Celecoxibe tiveram valores de pressão arterial caudal final significamente mais elevadas. Os achados do presente estudo são corroborados por BREYER et al. (2001) e FOSSLIEN (2005), que descrevem sobre a capacidade dos antiinflamatórios seletivos COX-2 de promover hipertensão arterial. Esta seria induzida, provavelmente, pela retenção tubular de sódio que estes medicamentos promovem, com o conseqüente aumento de volume circulante (KUMMER & COELHO, 2002), ou pela diminuição de prostaciclinas responsáveis pela vasodilatação arterial (HÖRCHEL et al.,2002; CONSTANZO, 2004) Podemos então afirmar que a administração de celecoxibe a pacientes que apresentam estado aumentado de ANGII, deve ser realizada com extrema cautela, ou até mesmo evitadas.

6.2 Avaliação histológica do rim

Neste estudo experimental houve a indução de lesões renais como era esperado, uma vez que a dose de 150 ηg/min já havia sido utilizada em outros trabalhos, que também obtiveram lesão renal (VAILATI, 2001). Os grupos que receberam ANGII apresentaram o maior índice de lesão renal total (ILT= de 9 a 11). A análise morfológica mostrou fundamentalmente lesões vasculares associadas às lesões degenerativas e de necrose dos túbulos, sendo o conjunto de achados compatível com microangiopatia trombótica. Essas lesões são comumente observadas em casos de hipertensão arterial maligna, como descrito por LINDER (2000) e CAMARGO & ELGUI (2007). KOBORI et al. (2007) descreveram que o aumento da PA pode ter sido o responsável pela indução de lesões renais, caracterizadas por glomeruloesclerose e atrofia tubular. Trabalhos que estão de acordo com essa relação entre PA e lesão renal foram realizados por LONG et al. (2004) e NAKAMURA et al. (2005), que administraram anti-hipertensivos, como inibidores da enzima de conversão de angiotensina (iECA), e obtiveram melhora progressiva das lesões renais, à medida que a PA foi normalizada.

Entretanto, os achados do presente estudo demonstram a capacidade da ANGII em promover lesões renais, independentes de valores pressóricos, concordando com SOROOSHIAN (2000) e RUPÉREZ et al.(2003), que descreveram sobre a indução de alterações renais por meio de mecanismos independentes de ANGII. Estes achados são compreendidos ao se comparar os dos ratos 14,16 e 20 na tabela 4 em anexo, que apresentaram lesões vasculares que variaram de 2 a 3+ de intensidade, em até16 vasos observados, e tiveram valores normais de PA, ver tabela 2 em anexo.

BIDANI & GRIFFIN (2004) e WOLF & RITZ (2005) observaram em diversos trabalhos experimentais uma proteção renal mais consistente em grupos de animais que receberam iECA em relação a outros tipos de anti–hipertensivos, embora todos os medicamentos tenham obtido sucesso no controle da pressão arterial, corroborando com a afirmação sobre a lesão renal via ANGII ser

independente de ação pressórica. Assim, da mesma maneira que o bloqueio do sistema renina é capaz de proteger os rins de forma independente da redução pressórica, no presente estudo ficou demonstrado uma lesão direta da ANGII, também independente de sua ação pressórica.

Ao contrário do esperado, não foram observadas lesões de caráter inflamatório, como por exemplo, endarterite. VAILATI (2001) realizando trabalhos em protocolo experimental semelhante, obtiveram alterações predominantemente de origem inflamatória, caracterizados por arterite e infiltrado inflamatório mononuclear. Esses achados estão ligados à capacidade de promoção de inflamação da ANGII, descrita anteriormente (NORONHA et al., 2002; LEMUS, et al., 2008). Entretanto, no presente estudo, as lesões encontradas têm características que sugerem um mecanismo de toxicidade direta da ANGII, independente de processo inflamatório inicial, corroborando com SIMON (2004) que descreve sobre a toxicidade renal da ANGII ser multifatorial. MYATA et al (2008) e BLOCK et al. (2008), analisaram o estímulo da ANGII sobre o processo de stress oxidativo (ROS), que promoveu lesões renais, sendo este então, um dos mecanismos lesivos da ANGII.

Em relação às alterações avaliadas no ILT-I, houve degeneração tubular em 100% dos animais do grupo ANGII+infliximabe, apresentando também um alto percentual de necrose tubular, formação de cilindros e também atrofia, estatisticamente significativos. Interessante observar que à exceção do rato 59, todos os outros animais não tiveram aumento de PA, corroborando com os achados de lesão vascular, que demonstram capacidade lesiva da ANGII independente de fator pressórico.

O infliximabe é um medicamento antagonista do TNF-α, que vem sendo recentemente estudado como agente terapêutico em algumas afecções renais, como por exemplo glomerulonefrites, nefropatia diabética e carcinomas (HARRISON et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2007). Por ser um medicamento recente, sua principal via de excreção ainda não está bem estabelecida (MYCET, 2006; WAGNER et al., 2006) e até o presente momento, não foi encontrado na literatura estudo onde se avalia a ação do infliximabe, neste modelo experimental.

Os animais do grupo ANGII+Infliximabe, como já mencionado, apresentaram alterações tubulares importantes, e, os animais do grupo Infliximabe, também apresentaram percentuais altos de degeneração tubular, necrose e cilindros. Estas alterações demonstram que o infliximabe, além de não ter promovido proteção renal em resposta à sua associação com ANGII, comprovado pela diferença estatisticamente significante entre os grupos ANGII+Infliximabe e controle, ele por si só demonstrou ter poder lesivo renal. Com os resultados obtidos, pode ser afirmado que a utilização deste medicamento deve ser cautelosa em pacientes com insuficiência renal e/ ou pacientes hipertensos, uma vez que ele sozinho ou em associação com a ANGII mostrou ter potencial de lesão renal, de acordo com YIE e POCHAPIN (2001), que descreveram um caso de insuficiência renal aguda associada à administração deste fármaco a um paciente humano em tratamento para artrite reumatóide.

6.4 Expressão de COX-2

Um achado interessante deste trabalho foi que dos nove animais do grupo ANGII+Celecoxibe, quatro tiveram imunomarcação positiva para a COX-2, embora este aumento não tenha sido estatisticamente significante, em relação ao grupo controle. Este achado é um paradoxo, pois este grupo recebeu um antiinflamatório inibidor seletivo de COX-2, e o esperado seria a não expressão dessa enzima. Uma possível explicação para este fenômeno é que como houve a associação da ANGII, esta promoveu vasoconstrição local, que leva a hipóxia, com conseqüente dano celular. Estudos *in vitro* com AINES, em situações de hipóxia, demonstraram um aumento da COX-2 nos monócitos estudados, sendo que este fenômeno foi atribuído a inibição da prostaglandina PGE2, que estimulou a produção de TNF-α, o qual estimulou a expressão da COX-2 (FOSSLIEN, 2005). Observa-se também que os quatro animais tiveram lesão detectada no exame histopatológico, demonstrando necrose vascular variando entre 1+ até 3+, até 5 vasos, sendo assim, pode-se sugerir que houve uma provável lesão por hipoxia nestes animais, tendo sido induzida pela ANGII. Entre os dez animais do grupo celecoxibe, cinco

deles tiveram expressão da enzima COX-2, também de forma paradoxal ao esperado, mas também não estatisticamente significante. Uma possível explicação para este achado, seria um comportamento bioquímico semelhante ao que ocorre no coração quando há a administração de medicamentos β–bloqueadores, pois quando administrados, estes medicamentos acabam promovendo uma “up-regulation” dos seus receptores (BATLOUNI & RAMIRES, 1999).

Dos 43 animais dos grupos controle, ANGII, infliximabe e ANGII+Infliximabe, apenas sete tiveram imunomarcação positiva para a COX-2, marcação esta que pode ser justificada pela presença da enzima COX-2 de forma constitutiva nos rins de ratos, como demonstrado por LIM et al. (2003) e HARRIS (2008)

6.5 Índice de apoptose

No presente trabalho não houve a imunomarcação para a caspase-3 nos rins dos animais de nenhum dos diferentes grupos de tratamento. Uma possível explicação para este fato é que a indução da apoptose é dose e tempo dependente, como demonstrado por CAO et al. (2000), que obtiveram aumento da expressão de caspase-3 com a administração de ANGII durante 14 dias. BHASKARAN et al. (2002) também atribuíram a tempo e dose dependente, o aumento no índice de apoptose de células tubulares renais em experiências “in vitro”. Sendo assim, devido a este protocolo experimental ser de infusão aguda da ANGII, pode-se sugerir que o período de administração da ANGII pode não ter sido suficiente para estimular a indução do processo de apoptose.

Os animais do grupo controle também não tiveram imunomarcação positiva para caspase-3, como já mencionado. Isto poderia ser creditado a um erro de técnica durante a realização desta imunoistoquimica, entretanto, CHAO et al., (2007) também relataram sobre a não existência de células renais em apoptose nos rins normais, devido a própria fisiologia do mecanismo de apoptose.

6.3 Concentração sérica de TNF-α

Vários autores têm reforçado o papel relevante do TNF-α no mecanismo de agressão renal (NAVARRO & FERNANDES, 2006; HARRINSON, et al., 2007), um deles sendo sua capacidade de promover aumento dos efeitos vasculares da ANGII (FERRERI et al., 1997; ELMARAKBY et al. 2007). No presente estudo, não houve influência do TNF- α na indução de lesão renal, nos diferentes grupos de tratamento. Os achados de valores dentro da normalidade podem ter aqui duas explicações. A primeira seria que devido a resposta fugaz do TNF-α, bem como sua rápida degradação, justificaria ter sido encontrado valores tão baixos desta citocina. Esta hipótese é corroborada por WANG et al. (2003) que explicam que o TNF-α pode ser produzido em cerca de apenas noventa minutos após diversos estímulos, tendo uma queda abrupta em seus valores, até mesmo sendo indetectáveis, logo após quatro horas.

A outra explicação reside na relação direta entre o TNF-α e processos inflamatórios. EGIDO et al. (1993) e NESTORIDI et al. (2008) falam sobre a importância desta citocina como promotora de processos inflamatórios. ELMARAKBY et al. (2007) demonstraram que a administração de um antagonista do TNF-α, contribuiu para a diminuição dos valores de PA, em um modelo de hipertensão arterial dependente de sal. Entretanto, as alterações encontradas na análise histológica deste trabalho, não demonstraram predominância de lesões de caráter inflamatório, como a endarterite, achado comum em processos de hipertensão arterial. Sendo assim, não houve estímulo à produção e liberação desta citocina, neste protocolo experimental, justificando os valores de TNF-α deste estudo não terem influenciado às lesões renais.

7. CONCLUSÕES

- o celecoxibe não promove proteção renal contra as ações da ANGII, portanto o mecanismo de ação de lesão renal é independente da expressão da COX-2

- A ANGII em infusão contínua de 72 horas, não promove a apoptose da células renais

- As lesões renais ocorrem independentemente da ação do TNF-α

- A associação de angiotensina II e celecoxibe têm ação hipertensora

- A angiotensina II promove lesões renais, independentemente dos valores da pressão arterial

- O Infliximabe sozinho, promove lesões no interstício renal

- Os mecanismos de ação responsáveis pela indução das lesões renais promovidas pela ANGII devem ser outros, além dos estudados neste protocolo experimental.

8. BIBLIOGRAFIA

AKBULUT, G., DILEK, O.N., KAHRAMAN, A., KÖKEN, T., SERTESER, M. The correlation between renal tissue oxidative stress parameters and TNF-α levels in an experimental model of ischemia-reperfusion injury in mice. *Ulusal Travma Dergisi,* v.11, n.1, p. 11-16, 2005.

ALPERS, C.E. O rim. In: ROBBINS & COTRAN *Bases patológicas das doenças patologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.p.999-1.067.

ALVES, R., CUNHA, M.F.X., PRATAS, J., PESSA, P., MOTA, A., CAMPOS, M. Estudo da apoptose na transplantação renal. *Rev Port Nefrol Hipert*, v.18, n.3, p.167-177, 2004.

ARENAS IA, XU Y,LOPEZ-JARAMILLO P, DAVIDGE ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol.* v.4, n.286, p.C779-84, 2004.

BATLOUNI, M., RAMIRES, J.A. Bloqueadores beta-adrenérgicos. In: Farmacologia e terapêutica cardiovascular, São Paulo: editora Atheneu. 1999, p.215-243.

BENETONE, M.Z. Apoptose e proliferação na placenta de búfalas. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

BHASKARAN. M., REDDY, K., RADHAKRISHANAN, N.F. et al. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol. v.284, p.955-965, 2002.

BIDANI, A.K., GRIFFIN, K.A. Pathophysiology of hypertensive renal damage implications for therapy. Am. Heart Assoc., v.44, p.595-601, 2004.

BLAM, M.E., STEIN, R.B., LICHTENSTEIN, G.R. Integrating anti-tumor ncrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am. J. Gastroenterol.*, v.96, p.1977-1997, 2001.

BLOCK, K., ASSAAD,E., GRIENDLING, K.K., LEE, D.Y., WITTRANT, Y., GORIN, Y. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates src-dependent tyrosine phosphorilation of PDK-1 in response to angiotensina of PDK-1 in response to angiotensina I. Role in

mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *JBC Papers in Press*., p.1-3, 2008.

BOIM, M.A., TEIXEIRA, V.P.C., NESTOR, N. Rim e compostos vasoativos. In: ZATZ, R. *Fisiopatologia renal.* São Paulo: Atheneu, 2000. p.21-39.

BRATER, D.C., HARRIS, C., REDFERN, J.S., GERTZ, B.J. Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol*, v.21, n.1, p.1-15, 2001.

BRATER, D.C. Renal effects of cyclooxygenase-2-selective inhibitors. J Pain Symp Management. V.23, n.48, p.S15-S20, 2002.

BREYER, M.D. HAO, C., ZHONGHUA, Q. COX2 inhibitors and kidney. *Curr. Opin. Crit. Care, n.7,* p.393-400, 2001.

BREYER, M.D., HARRIS, R.C. Cycloxigenase 2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*., v.10, p.89-98, 2001.

CAMARGO, J.L.V., ELGUI, O.D. Patologia geral – abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 204p.

CAO, Z., KELLY, D.J., COX, A., CASLEY, J.M., DEAN, R., GILBERT, R.E., COOPER, M.E. Angiotensin type-2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis.Kid. Intern., v.58, p. 2437-2451, 2000.

CHAO, J., LI, H., YAO, Y. et al. Kinin infusion prevents renal inflammation, apoptosis, and fibrosis via inhibition of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase activity. Am. Heart Assoc., v.49, p.490-497, 2007.

CHENG, H.F., HARRIS, R.C. Cyclooxigenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension*, v.43, p.525-530, 2004.

CHEVILLE, N.F. Lesão celular e morte celular. In: CHEVILLE, N.F. Introdução à patologia veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Roca. 2002. p.6-27.

CONSTANZO, L.S. *Fisiologia*. 2.ed. São Paulo: Elsevier. 2004, 466p.

COSTA, S.K., SOUZA, A.D., BUSCARIOLO, J.A. Analgésicos, antipiréticos e antiiflamatórios. In: DELUCIA, R. et al. *Farmacologia integrada*. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007, p.339-362.

COTRAN,R.S., KUMAR,V.,COLLINS,T. Patologia celular 1:lesão e morte da célula. In:*Robbins Patologia estrutural e funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. p.01-26.

DAS, U.N. Is angiotensina-ii an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med. Sci. Monit.*, v.11, n.5, p. RA155-162, 2005.

DeMuth, J. *Basic Statistics and Pharmaceutical Statistical Applications*. New York: Marcel Dekker Inc. 1999. 591p

EDGLEY, A.J., MICHELLE, M.A., ANDERSON, W.P. Evidence for renal vascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *J.Hypert*., v.21, p.1401-1406, 2003.

EGIDO, J., CHIARRI, M.G., ORTIZ,A., BUSTUS, C., ALONSO, J., PLAZA, J., GONZALEZ, E. . Role of tumor necrosis factor-α in the pathogenesis of glomerular diseases. *Kid. Intern*., v.43, n.39, p.S-59-S64, 1993.

ELMARAKBY, A.A., QUIGLEY, J.E., IMIG,J.D., POLLOCK,J.S.,POLLOCK, D.M. TNF-α inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*., v.294, p. R76-R83, 2007.

FERRERI , N.R., ZHAO, Y., TAKIZAWA, H., MCGIFF, J.C. Tumor necrosis factor-alpha –angiotensin interections and regulation of blood pressure. *J. Hypertens.,* v.15, p.1481-1484, 1997.

FICHTLSCHERER, S. Tumor necrosis factor antagonism with etanercept improves systemic endothelial vasoreactivity in patients with advanced heart failure. *Circulation*, v.104, p.3023-3025, 2001.

FILHO, G.B. Degenerações: morte celular alterações do interstício. In: *Bogliolo patologia geral*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1998.p.38-68.

FITZGERALD, G.A., PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. N. Engl. J. Med., v.345, n.6, p.433-442, 2001.

FOEGHT, M.L., RAMWELL, P.W. Os ecoisanóides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e compostos relacionados. In: KATZUNG, B.G. Farmacologia básica e clínica. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan. 2006. p.252-263.

FOSSLIEN, E. Review: Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Clin Lab Sci.,* v.35, n.4, p.347-385, 2005.

GAMBARO,G., PERAZELLA,M.A. adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors. *J.Int. Med*., v.253, p. 643-652, 2004.

GONÇALVES, R.R.A. et al. Renal expression of COX-2, ANGII, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroid anti-inflammatory. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.,* v.286, p.F945-F954, 2004.

GRAUER, G.F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. *J.Small Animal Pract.,* v.46, p.469-478, 2005.

GYTON, A.C. Textbook of medical physiology. 8ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. 1014p.

HARRIS, R.C. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am. J. Cardiol.,* v.89, p.10D-17D, 2002.

HARRIS, R.C. An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney. Current Opinion in Nephology and Hypertension. v.17, p.64-69, 2008.

HARRISON, et al. Tumor necrosis factor as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and hight dose. *J. Clin. Oncol*., v.25, n.29, p.4542-4549, 2007.

HENEGAR, J.R., BROWER, G.L., KABOUR, A., JANICKI, J.S. Catecholamine response to chronic ANGII infusion and its role in myocyte and coronary vascular damage. *Am. J. Physiol.*, v.269, p.1564-1569, 1995.

HÉTU, P.O., RIENDEAU, D. Cyclooxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. *Biochem J.*, v.391, p.561-566, 2005.

HOLZHAUSEN, M., ROSSA, Jr. C. MARCANTONIO, Jr. E., SPOLIDORIO, D. M., SPOLIDORIO, L.C. *J. Periodontol.,* v.73, n.9, p.1030-1306, 2002.

HÖRCHEL et al. COX-2 and blood pressure. *British J. Pharmacol*. , v.136, n.8, 2002.

JACKSON, E.K., GARRISON, J.C. Renina e angiotensina. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. p.536-554.

JAIMES, E.A., TIAN, R., PEARSE, D., RALI, L. Up-regulation of glomerular cox-2 by angiotensina ii: role of reactive oxygen species. *Kidney Int.,* v.68, p.2143-2153, 2005.

JERICÓ, M. M., ANDRADE, S.F. Antiinflamatórios. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária.* 3 ed. São Paulo: Roca. 2008. p.115-140.

KAGAWA, T., TAKAO, T., HORINO, T., MATSUMOTO,R., INOUE, K., MORITA, T., KOZO, H. Angiotensin II receptor blocker inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol.,*v. 13, p.309–315, 2008.

KOBORI, H., NANGAKU, M., NAVAR, L.G., NISHIYAMA,?. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol. Rev., v. 59, n. 3, p. 251-287, 2007.

KUMMER, C.L., COELHO, T.R.B. Antiinflamatórios não esteroidais inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. *Rev. Bras. Anestesiol.,* v.52, n.4, p.498-512, 2002.

LEMUS, et al.angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolisacharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. *Endocrinology*.,2008.

LEVER, A.F., LYALL, F., MORTON, J.J., FOLKOW, B. Angiotensin II, vascular strucutur and blood pressure. *Kid. Intern. Supp*., v.37, p.S51-S55, 1992.

LIM, W.C., PARK, J.B., LEE, Y.J. Analysis of angiotensin II mediated COX-2 downregulation in angiotensin II or aldosterona – infused hypertensive rat. Biol. Pharm. Bull., v.26, p.1086-1088, 2003.

LINDER, D. Kidney and urinary tract. In: *Pathology: a color atlas*. Philadhelphia: Mosby, 2000, 474p.

LONG, D.A., PRICE, K.L., ACOSTA, J.H., JOHSON, R.J. How does angiotensin II cause renal injury. Hypertens., v.43, p.722-723, 2004.

MELDRUM, K.K., HILE.K., KAEFER, M., HABERSTROH, K.M. The role of TNF-α in renal tubular damage following exposure to pathological conditions in vitro. *BED., v.*50, p.611-612, 2001.

METZE,K. Artérias, veias e linfáticos.In: *Bogliolo patologia.* 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.2006. p.457-487.

MORIWAKI, Y., INOKUCHI, T., YAMAMOTO, A. et al. Effect of TNF—α inhibition on urinary albumin excretion. Acta Diabetol., v.44, p.215-218, 2007.

MUNGAN, M.U., GUREL, D., CANDA, A.E., TUNA, B., YORUKOGLU,K. Expresion of cox2 in normal and pyelonephritic kidney, renal renal intraepithelial neoplasia, and renal cell carcinoma. *Eururo*, n.1140, p.1-6, 2006.

MURATA, Y., OLMARKER, K., TAKAHASHI, I., TAKAHASHI, K., RIDEVIK,B. Effects of selective tumor necrosis factor- alpha inhibition to pain-behavioral changes caused by nucleus pulposus- induced damage to spinal nerve in rats. *Neurosci. Lett.*, v.382, p.148-152, 2005.

MYATA, K., OHASHI, N., SUZAKI, Y., KATSURADA, A., KOBORI, H. Sequential, activation of reactive oxygen species / angiotensinogen/ rennin angiotensin system axys in renal injury of type 2 diabetic rats. *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol*., p.1440-1468, 2008.

MYCET, M. J. Farmacologia lustrada. 3 ed. São Paulo: Artmed. 2006. 551p.

NAKAMURA, A., JOHNS, E.J., IMAIZUMI, A., YANAGAWA, Y., KOSHAKA, T. Effect of adrenoceptor activation and angiotensin II on tumor necrosis factor and interleukine 6 gene transcription in the rat renal resident machrophage cells. Cytokine, v.11, n.10, p.759-765, 2005.

NESTORIDI, E., KUSHAL, R.I., TSUKUROV, O.,GRABOWSKI, E.F., INGELFINGER,J.R. Role of renin angiotensin system in TNF-α and Shiga-toxin-induced tissue factor expression. *Pediatr. Nephrol*., v.23,p.221-231, 2008.

NIE, D., HONN, K.V. Eicosanoids regulation of angiogenesis tumors. *Semin. Thromb. Hemost.,* v.30, n.1, p.119-123, 2004.

NORONHA, L., FUJIHARA, C.K., ZATZ, R. The inflammatory component in progressive renal disease – are interventions possible? *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.17, p.363-368, 2002.

OLMARKER, K., NUTU, M., STORKSON, R. Changes in spontaneous behavior in rats exposed to experimental disc herniation are blocked by selective TNF- alpha inhibition. *Spine*, v.28, p.1635-1642, 2003.

ORTEGA et al. Role of renin- angiotensin system in vascular diseases expanding the field. *Hypertension*, v.38, p. 1382-1387, 2001.

ORTEGA et al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.21, p. 16-20, 2006.

ORTEGA, M.R. et al. Renal and vascular- hypertension induced inflammation: role of angiotensina II. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, v.15. p.159-166, 2006.

PINHEIRO, R.M., CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm. Res.,* v.51, p.603 -610, 2002.

QI, Z., CAI, H., MORROW, J.D., BREYER, M.D. Differentiation of cyclooxygenase-1 and 2- derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension*, v.48, n.2, p.323-328, 2006.

RICHTER,C.M. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats. *J. hypertens*., v.22, p.191-198, 2004.

ROBINS, R.S., COTRAN, R.S. Patologia: Base patológicas das doenças. São Paulo: elsevier, 7.ed., 2005, 1504p.

ROSS, L. Acute renal failure: mechanisms of cellular injury. *Proc.20thACVIM,* p.547-549, 2002.

RUPEREZ, M. et al. Angiotensin ii increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am. J. Pathol.,* v.163, n.5, p.1937-1947, 2003.

RUPEREZ et al. The rho-kinase pathway regulates AII-induced renal damage. *Kidney Int. Suppl.,* v.99, p.S39-45, 2005.

SHIHAB, F.S., BENNET, W.N., YI, H., ANDOH, T.F. Effect of pirfenidone on apoptosis-regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity. Transplant., v.79, n.4, p.419-426, 2005.

SAKURAI, M., OISHI, K., WATANABE, K. localization of cyclooxygenases-1 e -2, and prostaglandin F synthase in human kidney and renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., v.338, p.82-86, 2005.

SIMON, G. Pathogenesis of structural vascular changes in hyperension. *J. HYPERTENSION*.,v.22,n.1, p.,2004.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN,W.G. *Statistical Methods*. Yowa: Iowa State University Press. 1989. p.491.

SOROOSHIAN, M., OLSON, J.L., MEYER, T.W. Effect of angiotensin II blockade on renal injury in mineralocorticoid-salt hypertension. Hypertension, v.36, p.569-574, 2000.

SUZUKI et al. Inflammation and angiotensin II. *Ijbcb.* v.35. p.881-900, 2003.

TAO et al. Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slow disease progression in polycystic kidney disease*. PNAS,* p.6954-6959, 2005.

TERUYA et al. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *Acta. Cir. Bras.,* v.23, n.1, p.29-35.

THURMAN, J.M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin. Immunol.* v.123, p.7-13, 2003.

TIZARD, I.R. Imunologia Veterinária: uma introdução. 6.ed. São Paulo: Rocca, 2002. 532p.

VAILATI, M. C. F. Alterações histológicas do miocárdio, rim e fígado de ratos (Rattus novergicus) Wistar submetidos à infusão de angiotensina II. Influência na função ventricular esquerda e resposta ao tratamento com losartan e carvedilol. 2001. 99f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

WAGNER, W., KHANNA, P., FURST, D.E. Antiinflamatórios não esteroidais, fármacos anti-reumáticos, modeificadores de doença, analgésicos não opióides e fármacos utilizados na gota. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2006. p.481-504.

WANG, H., CZURA, C.J., TRACEY, K.J. Tumor necrosis factor. In: THOMSON, A.W., LOTZE, M.T. The cytokine handbook, 4.ed. London: Elsevier. 2003, p.837-853.

Wolf G, Ritz E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int*. v.42, n.3, p. 799-812, 2005.

YAMAMOTO et al. Effect of TNF- inhibition of urinary albumin excretion in experimental diabetic rats. *Acta diabetol.*, v.44, p. 215-218.

YANG, B., JAIN, S., ASHRA, S.Y. et al. Apoptosis and caspase-3 in long-term renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants. Transplantation, v. 81, p.1442-1450, 2004.

YIE, A.M., POCHAPIN, M.B. Treatment of complicated sarcoidosis with infliximab anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Ann. Intern. Med*., v.135, n.1, p.27-31, 2001.

YOUNG, W., MAHBOUBI,K., HAIDER, A., LI, I.,FERRERI, N.R. cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor-α- and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ. res.*, v.86, p.906-914, 2000.

TRABALHO CIENTÍFICO

O papel da ciclooxigenase-2 e da pressão arterial na lesão renal de ratos submetidos à infusão contínua de angiotensina II.

The role of cyclooxigenase-2 and blood pressure at the kidney damage in rats in response to angiotensin II infused continuously.

Flávia Santin[I]; Maria do Carmo Fernandez Vailati[II], Marcela Marcondes[II] ; David Miquelucci[III], Luiz Cuadrado Martin[IV], Denise Saretta Schwartz[V].

RESUMO

A angiotensina II (ANGII) é um vasoconstritor, entretanto, sua atuação na inflamação tem sido estudada. Objetivos: verificar o estímulo da ciclooxigenase-2 e pressão arterial na lesão renal por ANGII. Foram utilizados ratos Wistar, nos grupos: Grupo 1: controle, Grupo 2: ANG II, Grupo 3: ANG II + celecoxibe, Grupo 4: celecoxibe. A ANGII foi administrada via mini-bomba no subcutâneo dos animais durante 72 horas, sendo então realizada a eutanásia. A pressão arterial foi aferida antes da administração dos fármacos e na eutanásia. Os rins dos animais foram colhidos para histopatologia, para imunoistoquímica, avaliando-se a expressão de COX-2. Concluiu-se que a ANGII promoveu lesões renais, independentemente dos valores da pressão arterial; ANGII associada ao celecoxibe, levou ao aumento da pressão arterial. O celecoxibe não protegeu os rins contra as ações da angiotensina II.

Palavras- chave: angiotensina II, celecoxibe, rins.

ABSTRACT

[I] Departamento de Clínica veterinária, autora para correspondência, FMVZ-UNESP-Botucatu. E—mail:fla_vet@ig.com.br
[II]Departamento de Clínica veterinária, FMVZ-UNESP-Botucatu/SP
[III] Departamento de Solos, prof de estatística, UDESC- Lages/SC
[iv] Departamento de Clínica Médica da FM-UNESP-Botucatu
[V] Departamento de Clínica Médica, FMVZ- USP- São Paulo/SP

The angiotensin II (ANGII) is a vasoconstrictor, however, her action in inflammation have been studied recently. Objectives: to verify the stimulation of cyclooxigenase-2 and blood pressure in renal damage by ANGII. Wistar rats were used in the following groups: Group 1: control, Group 2: ANGII, Group 3: ANGII + celecoxib, Group 4: celecoxib. The ANGII was infused in the animals by subcutaneous osmotic mini-pumps during 72 hours. After that, euthanasia was performed. The blood pressure was recorded before drugs administration and before the euthanasia. Histopathological and immunohistochemistry were performed in kidneys to evaluate the expression of COX-2. It was concluded that the ANGII caused renal damage, independently of blood pressure values. ANGII associated with celeboxib created a blood pressure increasing. Celecoxib did not protect the kidneys against ANGII activities.

Keywords: angiotensin II, celecoxib, kidney.

A angiotensina II (ANGII) é o principal polipeptídeo do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e exerce múltiplos efeitos fisiológicos, pela ativação de receptores específicos presentes nos vasos, no coração, nos rins, na adrenal, no cérebro, bem como no fígado (JACKSON & GARRISON, 1996). A ANGII promove aumento da pressão arterial sistêmica de forma direta e indireta, uma vez que promove vasoconstrição periférica e aumento no volume circulante (ROBBINS,2005). Este aumento no volume é atribuído ao efeito direto da ANGII sobre os túbulos e sobre a estimulação da secreção de aldosterona, pela córtex da adrenal. Esses dois efeitos levam a reabsorção de sódio, com subseqüente reabsorção de água, que tendem a elevar o volume sanguíneo, e este é um fator importante na regulação da pressão arterial a longo prazo (GUYTON, 1991). Por serem responsáveis pela produção da renina, com a subseqüente formação da ANGII, os rins têm papel importante no controle da pressão arterial (PA) (BOIM, et al., 2000).

Nos rins, o balanço de sal e água e a liberação de renina sofrem influência de substâncias denominadas prostaglandinas, que atuam como importantes mediadores do tônus vascular. O ácido aracdônico é o mais abundante e importante precursor das prostaglandinas, produzidas por duas vias enzimáticas: a ciclooxigenase e a lipoxigenase (JERICÓ & ANDRADE, 2008). A enzima ciclooxigenase (COX), a qual possui duas isoformas a COX 1 e a COX2, inicia a conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas e

tromboxano (CHENG e HARRIS, 2004). A isoforma COX2 é principalmente induzida em processos inflamatórios e de carcinogênese, entretanto, tem sua expressão detectada também em tecido normal de rim (HARRIS, 2002; MUNGAN, et al., 2006). Os produtos da COX podem ter importante papel na patogênese de nefropatias, visto que em doenças como lupus eritematoso sistêmico e glomeruloesclerose, ocorre um aumento na expressão das isoformas COX-1 e COX-2 (GONÇALVES et al, 2004; JAIMES, et al., 2005).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) encontram-se entre os fármacos mais utilizados em todo o mundo, foram desenvolvidos para tratar condições dolorosas e inflamatórias, agudas e crônicas (COSTA et al.,2007). A atividade antiinflamatória dos AINES é mediada principalmente pela inibição da biossíntese das prostaglandinas. Os inibidores seletivos da COX-2 ou os denominados coxibes, foram desenvolvidos na tentativa de inibir a síntese das prostaciclinas produzidas pela isoenzima COX-2, induzida em locais de inflamação. Estes medicamentos ligam-se seletivamente ao sítio ativo da enzima COX-2 para bloquear sua ação. Eles exercem efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios semelhantes aos AINES não específicos, porém com menor efeito colateral gastrointestinal, sendo o celecoxibe um exemplo desta classe de fármacos (FITZGERALD & PATRONO, 2001; WAGNER et al., 2006). Uma vez que há a expressão da COX-2 de forma constitutiva nos rins normais, atenção é voltada para possíveis ações deletérias dos coxibes nestes órgãos (BREYER & HARRIS, 2001; BRATER, 2002). BREYER et al. (2001) e FOSSLIEN (2005) chamam a atenção para a capacidade dos coxibes em promoverem diminuição da excreção renal de sódio, com respectivo aumento na retenção de água, edema celular e ganho de peso, além da diminuição de prostaciclinas, fatores que promovem hipertensão arterial.

O protocolo experimental de infusão contínua de ANGII durante 72 horas tem como objetivos: avaliar se a lesão renal induzida pela ANGII tem como mecanismo de ação o estímulo da ciclooxigenase-2 e, avaliar a relação entre pressão arterial, intensidade e tipo de lesão renal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, com aproximadamente 250 g de peso corpóreo, provenientes do CEMIB- Unicamp, Campinas-SP. Os animais foram

mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, em ambiente com controle de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura constante (25º C), recebendo dieta padrão e água *ad libitum*. Os procedimentos realizados nos animais foram executados no Centro de Pesquisa da Faculdade de Medicina – Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica – UNESP –Botucatu, e foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal como protocolo de número 109/07. A lesão renal foi induzida por meio de infusão contínua de angiotensina II[II] (150 ηg/min/SC). Essa dosagem foi descrita por causar lesão renal de aspecto inflamatório (VAILATI et al., 2001).

A Infusão contínua de ANGII foi administrada por meio de mini-bombas osmóticas (modelo #2002, ALZA Corp) implantadas no subcutâneo do animal (RUPEREZ et al., 2005; JAIMES et al., 2005). Os ratos foram sedados com a associação de quetamina[III] (50 mg/ Kg IM) e xilazina[IV] (10 mg/ Kg IM) e a mini- bomba foi implantada por meio de pequena incisão no dorso dos animais. Esse dispositivo libera 0,5 µL/ hora de solução, assim, as mini-bombas foram preenchidas com solução contendo ANGII, para oferecer ao animal a dose de 150 ηg/min.

O inibidor seletivo da cicloxigenase-2 (iCox2) utilizado foi o celecoxibe[V], na dose de 10 mg/kg/dia, via gavagem (PINHEIRO & CALIXTO, 2002; HOLZHAUSEN et al., 2002). A administração do iCox2 foi iniciada três dias antes do início da infusão contínua de ANGII, e continuou até o final do experimento, com o objetivo de observar a influência da inibição da Cox-2 no aparecimento de lesões induzidas pela ANGII.

A pressão arterial sistólica caudal foi obtida aproximadamente 24 horas antes do início dos tratamentos, com o intuito de ser obtido o valor da pressão arterial basal dos animais, e no dia do sacrifício, para observar a influência de cada tratamento na pressão arterial dos animais, utilizando-se o sistema de pressão caudal com polígrafo modelo RS3200-Gould e o esfigmomanômetro Narco Bio-Systems PE-300.

As alterações histológicas dos glomérulos, túbulos, interstício e vasos foram graduadas semiquantitativamente segundo escala de 0 a 3+: ausência de lesão = 0, lesão

---

[II] Sigma®- Missouri-USA
[III] Katamin® Lab Cristália
[IV] Rompum®- Bayer
[V] Celebra®- Pfizer

discreta = 1+, lesão moderada = 2+, lesão intensa = 3+. Em relação às lesões vasculares foi considerada lesão discreta = 1 a 5 vasos comprometidos, lesão moderada = lesão em 6 a 10 vasos e lesão intensa = mais de 10 vasos com lesão.

As alterações semiquantificadas foram avaliadas em glomérulos quanto à proliferação epitelial, mesangial e endotelial, matriz mesangial, necrose, esclerose e aderências do tufo glomerular com a cápsula de Bowman. Os túbulos foram avaliados quanto à degeneração celular, necrose, regeneração e atrofia. No interstício foi avaliada presença de edema, infiltrado inflamatório e fibrose, e os vasos foram avaliados quanto à presença de fibroelastose das artérias, arteriolosclerose hialina, endarterite proliferativa, necrose fibrinóide e congestão. Definiu-se como índice de lesão glomerular (ILG), túbulo-intersticial (ILT-I) e vascular (ILV) a somatória dos sinais positivos (+) atribuídos a cada uma das alterações acima mencionadas. A soma destes índices foi o índice de lesão renal total (ILR). A expressão de COX2 renal foi avaliada em cortes histológicos de rins, preparados por técnica de imunoistoquimica, utilizando-se o kit Monoclonal Mouse Anti-Human COX-2 (Cyclooxygenase-2) Clone: CX-294 (Dako®).

Os índices de lesões glomerular (ILG), túbulo-intersticial (ILT-I), vascular (ILV), renal total (ILRT), e a marcação positiva para COX2, foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com teste de comparações múltiplas de Dunn (DeMuth, 1999). A variável pressão arterial final foi avaliada através de análise de co-variância com a pressão inicial utilizada como covariável (Snedecor & Cochran, 1989). Também foi determinado o grau de correlação entre a variável pressão arterial final e índice de lesão renal no exame histopatológico, pela análise de correlação simples de Sperman (DeMuth, 1999), para determinar a relação entre pressão arterial e grau de lesão renal. A probabilidade de significância mínima foi estabelecida em 5% ($p<0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infusão subcutânea contínua de ANGII não causou hipertensão arterial neste protocolo experimental, sendo que apenas o grupo ANGII+Celecoxibe teve valores de PA estatisticamente significantes. Contrariando os achados de HENEGAR et al. (1995) e VAILATI (2001), que com esta mesma dose, obtiveram elevação na pressão arterial sistólica caudal. Uma possível explicação para estes achados, consiste no mecanismo de ação pressórica da ANGII, que é dose e tempo dependente (LEVER et al.,1992; EDGLEY

et al., 2003), sendo assim a dose deste protocolo experimental, poderia potencialmente promover aumento dos valores de PA, caso fosse administrada durante um período maior de dias. Os achados do presente estudo são corroborados por BREYER et al. (2001) e FOSSLIEN (2005), que descrevem sobre a capacidade dos antiinflamatórios seletivos COX-2 de promover hipertensão arterial. Esta seria induzida, provavelmente, pela retenção tubular de sódio que estes medicamentos promovem, com o conseqüente aumento de volume circulante (KUMMER & COELHO, 2002), ou pela diminuição de prostaciclinas responsáveis pela vasodilatação arterial (HÖRCHEL et al.,2002; CONSTANZO, 2004) Podemos então afirmar que a administração de celecoxibe a pacientes que apresentam estado aumentado de ANGII, deve ser realizada com extrema cautela, ou até mesmo evitadas.

Houve a indução de lesões renais como era esperado, uma vez que a dose de 150 ηg/min já havia sido utilizada em outros trabalhos, que também obtiveram lesão renal (VAILATI, 2001). Os grupos que receberam ANGII apresentaram o maior índice de lesão renal total (ILT= de 9 a 11). A análise morfológica mostrou lesões vasculares associadas às lesões degenerativas e de necrose dos túbulos, sendo o conjunto de achados compatível com microangiopatia trombótica (fig1).

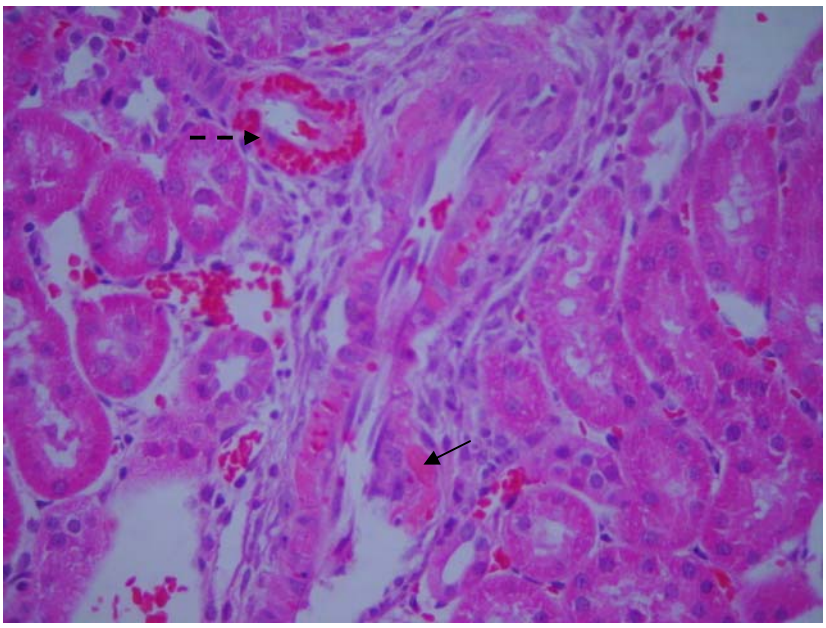

FIGURA 1 – Rim de rato Wistar tratado com ANGII: presença de necrose fibrinóide segmentar (→) e presença de necrose com hemorragia (- - ▸) em artéria (HE-400x).

Essas lesões são comumente observadas em casos de hipertensão arterial maligna, como descrito por LINDER (2000) e CAMARGO e EUGUI (2007). KOBORI et al. (2007) descrevem que o aumento da PA pode ter sido o responsável pela indução de lesões renais, caracterizadas por glomeruloesclerose e atrofia tubular. LONG et al. (2004) e NAKAMURA et al. (2005), concordantes com essa relação entre PA e lesão renal, administraram medicamentos anti-hipertensivos, inibidores da enzima de conversão de angiotensina (iECA), observando melhora progressiva das lesões renais, à medida que a PA foi normalizada.

Entretanto, os achados do presente trabalho demonstram a capacidade da ANGII em promover lesões renais, independentes de valores pressóricos, indo de acordo com SOROOSHIAN (2000) e RUPÉREZ et al.(2003), que descreveram sobre a indução de alterações renais através de mecanismos independentes de ANGII.

BIDANI & GRIFFIN (2004) e WOLF & RITZ (2005) observaram em diversos trabalhos experimentais uma proteção renal mais consistente em grupos de animais que receberam iECA em relação a outros tipos de anti–hipertensivos, embora todos os medicamentos tenham obtido sucesso no controle da pressão arterial, corroborando com a afirmação sobre a lesão renal via ANGII ser independente de ação pressórica.

Assim, da mesma maneira que o bloqueio do sistema renina é capaz de proteger os rins de forma independente da redução pressórica, no presente estudo ficou demonstrado uma lesão direta da ANGII, também independente de sua ação pressórica. Vale ressaltar que, exceto um animal, todos os outros não tiveram aumento de PA, concordando com os achados de lesão vascular, que demonstraram a capacidade de induzir lesão da ANGII independente de fator pressórico.

Um achado interessante deste trabalho foi que dos nove animais do grupo ANGII+Celecoxibe, quatro tiveram imunomarcação positiva para a COX-2, embora este aumento não tenha sido estatisticamente significante, em relação ao grupo controle (fig2). Este achado é um paradoxo, uma vez que este grupo recebeu um antiinflamatório inibidor seletivo de COX-2, e o esperado seria a não expressão dessa enzima. Uma possível explicação para este fenômeno é que como houve a associação da ANGII, esta promoveu vasoconstrição local, que levou a hipóxia, com conseqüente dano celular. Estudos *in vitro*

com AINES, em situações de hipóxia, demonstraram um aumento da COX-2 nos monócitos estudados, sendo que este evento foi atribuído a inibição da prostaglandina PGE2, que estimulou a produção de TNF-α, o qual estimulou a expressão da COX-2 (FOSSLIEN, 2005). Observou-se também que os quatro animais tiveram lesão detectada no exame histopatológico, demonstrando necrose vascular variando entre 1+ até 3+, em 1 até 5 vasos, sendo assim, pode-se sugerir que houve uma provável lesão por hipóxia nestes animais, tendo sido induzida pela ANGII.

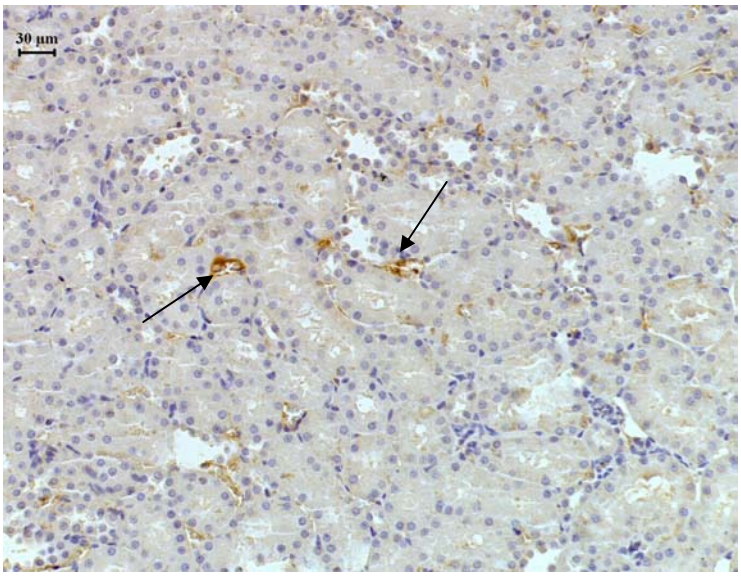

FIGURA 2 - Marcação positiva (→)para COX-2 em rim de rato Wistar tratado com ANGII+ Celecoxibe (200x).

Entre os dez animais do grupo celecoxibe, cinco deles tiveram expressão da enzima COX-2, de forma paradoxal ao esperado, mas também não estatisticamente significante. Uma possível explicação para este achado, seria um comportamento bioquímico semelhante ao que ocorre no coração quando há a administração de medicamentos β–bloqueadores, pois quando administrados, estes medicamentos acabam promovendo uma "up-regulation" dos seus receptores (BATLOUNI & RAMIRES, 1999). Dos 20 animais dos grupos controle e ANGII apenas cinco tiveram imunomarcação positiva para a COX-2, marcação esta que pode ser justificada pela presença da enzima COX-2 de forma constitutiva nos rins de ratos, como demonstrado por LIM et al. (2003) e HARRIS et al. (2008).

Considerando o protocolo experimental e condições do estudo, os resultados permitiram concluir que: a angiotensina II promoveu lesões renais, independentemente dos valores da pressão arterial; a associação de ANGII e celecoxibe levou ao aumento da pressão arterial; o celecoxibe não protegeu os rins contra as ações da angiotensina II e, portanto, o mecanismo de ação da ANGII foi independente da expressão da COX-2.

COMITÊ DE ÉTICA

As técnicas utilizadas e o manejo dos animais foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ- UNESP- Botucatu, com o protocolo de número 109/07.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior – pelo apoio financeiro a esta pesquisa e pelas bolsas concedidas, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JERICÓ, M.M., ANDRADE, S.F., Antiinflamatórios. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária.* 3 ed. São Paulo: Roca. 2008. p.115-140.

BATLOUNI, M., RAMIRES, J.A. Bloqueadores beta-adrenérgicos. In: Farmacologia e terapêutica cardiovascular, São Paulo: editora Atheneu. 1999, p.215-243.

BIDANI, A.K., GRIFFIN, K.A. Pathophysiology of hypertensive renal damage implications for therapy. Am. Heart Assoc., v.44, p.595-601, 2004.

BOIM, M.A., TEIXEIRA, V.P.C., NESTOR, N. Rim e compostos vasoativos. In: ZATZ, R. *Fisiopatologia renal.* São Paulo: Atheneu, 2000. p.21-39.

BRATER, D.C., HARRIS, C., REDFERN, J.S., GERTZ, B.J. Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol*, v.21, n.1, p.1-15, 2002.

BREYER, M.D. HAO, C., ZHONGHUA, Q. COX2 inhibitors and kidney. *Curr. Opin. Crit. Care, n.7,* p.393-400, 2001.

BREYER, M.D., HARRIS, R.C. Cycloxigenase 2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*., v.10, p.89-98, 2001.

CAMARGO, J.L.V., ELGUI, O.D. Patologia geral – abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 204p.

CHENG, H.F., HARRIS, R.C. Cyclooxigenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension*, v.43, p.525-530, 2004.

COSTA, S.K., SOUZA, A.D., BUSCARIOLO, J.A. Analgésicos, antipiréticos e antiiflamatórios. In: DELUCIA, R. et al. Farmacologia integrada. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007, p.339-362.

De Muth, J. *Basic Statistics and Pharmaceutical Statistical Applications*. New York: Marcel Dekker Inc. 1999. 591p

EDGLEY, A.J., MICHELLE, M.A., ANDERSON, W.P. Evidence for renal vascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *J.Hypert*., v.21, p.1401-1406, 2003.

ELMARAKBY, A.A., QUIGLEY, J.E., IMIG,J.D., POLLOCK,J.S.,POLLOCK, D.M. TNF-α inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*., v.294, p. R76-R83, 2007.

FITZGERALD, G.A., PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. N. Engl. J. Med., v.345, n.6, p.433-442, 2001.

FOSSLIEN, E. Review: Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Ann Clin Lab** *Sci.,* v.35, n.4, p.347-385, 2005.

GONÇALVES, R.R.A. et al. Renal expression of COX-2, ANGII, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroid anti-inflammatory. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.,* v.286, p.F945-F954, 2004.

GRAUER, G.F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinúria and treatment. *J.Small Animal Pract.,* v.46, p.469-478, 2005.

GYTON, A.C. Textbook of medical physiology. 8ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. 1014p.

HARRIS, R.C. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am. J. Cardiol.,* v.89, p.10D-17D, 2002.

HARRIS, R.C. An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney. Current Opinion in Nephology and Hypertension. v.17, p.64-69, 2008.

HOLZHAUSEN, M., ROSSA, Jr. C. MARCANTONIO, Jr. E., SPOLIDORIO, D. M., SPOLIDORIO, L.C. *J. Periodontol.,* v.73, n.9, p.1030-1306, 2002.

HÖRCHEL et al. COX-2 and blood pressure. *British J. Pharmacol*. , v.136, n.8, 2002.

JACKSON, E.K., GARRISON, J.C. Renina e angiotensina. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. p.536-554.

JAIMES, E.A., TIAN, R., PEARSE, D., RALI, L. Up-regulation of glomerular cox-2 by angiotensina ii: role of reactive oxygen species. *Kidney Int.,* v.68, p.2143-2153, 2005.

KUMMER, C.L., COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios não esteroidais inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. *Rev. Bras. Anestesiol.,* v.52, n.4, p.498-512, 2002.

LINDER, D. Kidney and urinary tract. In: *Pathology: a color atlas*. Philadhelphia: Mosby, 2000, 474p.

LONG, D.A., PRICE, K.L., ACOSTA, J.H., JOHSON, R.J. How does angiotensin II cause renal injury? Hypertens., v.43, p.722-723, 2004.

MUNGAN, M.U., GUREL, D., CANDA, A.E., TUNA, B., YORUKOGLU,K., KIRKALI,Z. Expresión of cox2 in normal and pyelonephritic kidney, renal renal intraepithelial neoplasia, and renal cell carcinoma. *Eururo*, n.1140, p.1-6, 2006.

NAKAMURA, A., JOHNS, E.J., IMAIZUMI, A., YANAGAWA, Y., KOSHAKA, T. Effect of adrenoceptor activation and angiotensin II on tumor necrosis factor and interleukine 6 gene transcription in the rat renal resident machrophage cells. Cytokine, v.11, n.10, p.759-765, 2005.

PINHEIRO, R.M., CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm. Res.,* v.51, p.603 -610, 2002.

QI, Z., CAI, H., MORROW, J.D., BREYER, M.D. Differentiation of cyclooxygenase-1 and 2- derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension*, v.48, n.2, p.323-328, 2006.

ROBINS, R.S., COTRAN, R.S. Patologia: Base patológicas das doenças. São Paulo: elsevier, 7.ed., 2005, 1504p.

RUPÉREZ et al. The rho-kinase pathway regulates AII-induced renal damage. *Kidney Int. Suppl.,* v.99, p.S39-45, 2005.

RUPÉREZ, M. et al. Angiotensin ii increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am. J. Pathol.,* v.163, n.5, p.1937-1947, 2003.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN,W.G. *Statistical Methods*. Yowa: Iowa State University Press. 1989. p.491.

SOROOSHIAN, M., OLSON, J.L., MEYER, T.W. Effect of angiotensin II blockade on renal injury in mineralocorticoid-salt hypertension. Hypertension, v.36, p.569-574, 2000.

VAILATI, M. C. F. Alterações histológicas do miocárdio, rim e fígado de ratos (Rattus novergicus) Wistar submetidos à infusão de angiotensina II. Influência na função ventricular esquerda e resposta ao tratamento com losartan e carvedilol. 2001. 99f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

WAGNER, W., KHANNA, P., FURST, D.E. Antiinflamatórios não esteroidais, fármacos anti-reumáticos, modificadores de doença, analgésicos não opióides e fármacos utilizados na gota. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2006. p.481-504.

WOLF. G, RITZ, E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int*. v.42, n.3, p. 799-812, 2005.

APÊNDICE

Quadro 1 – valores individuais da pressão arterial caudal.

TRATAMENTOS		
CONTROLE		
ANIMAIS	**PA inicial**	**PA final**
RATO 1	120	120

RATO 2	110	130
RATO 3	100	110
RATO 4	130	140
RATO 5	110	100
RATO 6	150	150
RATO 7	150	120
RATO 8	140	100
RATO 9	-	-
RATO 10	130	150
ANGIOTENSINA II		
RATO 11	120	130
RATO 12	120	150
RATO 13	110	110
RATO 14	140	130
RATO 15	100	120
RATO 16	130	120
RATO 17	130	100
RATO 18	100	120
RATO 19	80	200
RATO 20	130	140
RATO 21	100	170
CELECOXIBE		
RATO 22	110	120
RATO 23	150	140
RATO 24	140	140
RATO 25	120	120
RATO 26	100	130
RATO 27	120	120
RATO 28	90	170
RATO 29	118	150
RATO 30	150	130

Continua

TRATAMENTOS		
INFLIXIMABE		
ANIMAIS	**PA inicial**	**PA final**
RATO 31	130	160
RATO 32	130	120
RATO 33	140	130
RATO 34	150	130

RATO 35	140	120
RATO 36	140	120
RATO 37	70	120
RATO 38	130	150
RATO 39	130	140
RATO 40	140	110
RATO 41	140	140
RATO 42	130	150
ANGIOTENSINA II + CELECOXIBE		
RATO 43	140	160
RATO 44	100	190
RATO 45	-	-
RATO 46	130	180
RATO 47	120	140
RATO 48	140	180
RATO 49	110	150
RATO 50	120	140
RATO 51	120	120
ANIGIOTENSINA II + INFLIXIMABE		
RATO 52	140	110
RATO 53	160	140
RATO 54	130	120
RATO 55	140	150
RATO 56	130	150
RATO 57	150	130
RATO 58	130	110
RATO 59	150	210
RATO 60	140	110
RATO 61	120	110
RATO 62	130	150

Quadro 2- Valores individuais do percentual de expressão da COX-2 em rim.

TRATAMENTOS	
CONTROLE	
ANIMAIS	**% COX2**
RATO 1	0,00
RATO 2	0,00
RATO 3	0,00
RATO 4	0,00
RATO 5	0,00
RATO 6	25,68

RATO 7	0,00
RATO 8	0,00
RATO 9	12,77
RATO 10	77,61
ANGIOTENSINA II	
RATO 11	77,95
RATO 12	0,00
RATO 13	0,00
RATO 14	0,00
RATO 15	0,00
RATO 16	0,00
RATO 17	80,25
RATO 18	0,00
RATO 19	0,00
RATO 20	0,00
RATO 21	
CELECOXIBE	
RATO 22	71,49
RATO 23	0,00
RATO 24	80,75
RATO 25	0,00
RATO 26	0,00
RATO 27	73,68
RATO 28	0,00
RATO 29	75,59
RATO 30	32,45

RATO 40	20,08
RATO 41	0,00
RATO 42	23,94
ANGIOTENSINA II + CELECOXIBE	
RATO 43	0,00
RATO 44	0,00
RATO 45	72,94
RATO 46	66,44
RATO 47	91,71
RATO 48	0,00
RATO 49	7,99
RATO 50	0,00
RATO 51	0,00
ANIGIOTENSINA II + INFLIXIMABE	
RATO 52	0,00
RATO 53	0,00
RATO 54	0,00
RATO 55	0,00
RATO 56	0,00
RATO 57	0,00
RATO 58	0,00
RATO 59	0,00
RATO 60	0,00
RATO 61	0,00
RATO 62	0,00

TRATAMENTOS	
INFLIXIMABE	
ANIMAIS	**% COX2**
RATO 31	0,00
RATO 32	0,00
RATO 33	0,00
RATO 34	0,00
RATO 35	0,00
RATO 36	0,00
RATO 37	0,00
RATO 38	0,00
RATO 39	0,00

Quadro 3 – lesões histopatológicas (HE) em vasos de rim de cada animal.

TRATAMENTOS					
CONTROLE					
ANIMAIS	**Lesões histopatológicas HE em vasos de rim**				
	Fibroelastose	**Arteriolosclerose**	**Endarterite**	**Necrose**	**Congestão**
RATO 1	0	0	0	0	2+
RATO 2	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	1+
RATO 4	0	0	0	0	1+
RATO 5	0	0	0	0	1+
RATO 6	0	0	0	0	1+
RATO 7	0	0	0	0	1+
RATO 8	0	0	0	0	1+
RATO 9	0	0	0	0	1+
RATO 10	0	0	0	0	1+
ANGIOTENSINA II					
RATO 11	0	0	0	1+4vasos	1+
RATO 12	0	0	0	1+3vasos	1+
RATO 13	0	0	0	1+2vasos	0
RATO 14	0	0	0	3+14vasos	2+
RATO 15	0	0	0	1+3vasos	2+
RATO 16	0	0	0	3+16vasos	3+
RATO 17	0	0	0	0	1+
RATO 18	0	0	0	0	1+
RATO 19	0	0	0	1+1vaso	1+
RATO 20	0	0	0	2+8vasos	1+
RATO 21	1+	1	1+	1	0
CELECOXIBE					
RATO 22	0	0	0	0	1+
RATO 23	0	0	0	0	0
RATO 24	0	0	0	0	1+
RATO 25	0	0	0	0	1+
RATO 26	0	0	0	0	1+
RATO 27	0	0	0	0	1+
RATO 28	0	0	0	0	1+
RATO 29	0	0	0	0	1+
RATO 30	0	0	0	0	0

Continua

TRATAMENTOS					
INFLIXIMABE					
ANIMAIS	**Lesões histopatológicas HE em vasos de rim**				
	Fibroelastose	**Arteriolosclerose**	**Endarterite**	**Necrose**	**Congestão**
RATO 31	0	0	0	0	1+
RATO 32	0	0	0	0	1+
RATO 33	0	0	0	0	1+
RATO 34	0	0	0	0	1+
RATO 35	0	0	0	0	1+
RATO 36	0	0	0	0	1+
RATO 37	0	0	0	0	1+
RATO 38	0	0	0	0	1+
RATO 39	0	0	0	0	1+
RATO 40	0	0	0	0	1+
RATO 41	0	0	0	1+1vaso	1+
RATO 42	0	0	0	0	1+
ANGIOTENSINA II + CELECOXIBE					
RATO 43	0	0	0	0	1+
RATO 44	0	0	0	0	2+
RATO 45	0	0	0	1+5vasos	1+
RATO 46	0	0	0	1+3vasos	1+
RATO 47	0	0	0	1+3vasos	1+
RATO 48	0	0	0	0	0
RATO 49	0	0	0	1+5vasos	1+
RATO 50	0	0	0	3+13vasos	1+
RATO 51	0	0	0	2+9vasos	1+
ANIGIOTENSINA II + INFLIXIMABE					
RATO 52	0	0	0	0	1+
RATO 53	0	0	0	2+8vasos	2+
RATO 54	0	0	0	3+22vasos	1+
RATO 55	0	0	0	1+3vasos	1+
RATO 56	0	0	0	0	1+
RATO 57	0	0	0	1+4vasos	1+
RATO 58	0	0	0	0	1+
RATO 59	0	0	0	2+7vasos	1+
RATO 60	0	0	0	2+7vasos	1+
RATO 61	0	0	0	2+8vasos	1+
RATO 62	0			2+10vasos	1+

Quadro 4 – Lesões histopatológicas (HE) em túbulos de rim de cada animal.

TRATAMENTOS					
CONTROLE					
ANIMAIS	**Lesões histopatológicas HE em túbulos de rim**				
	Degeneração	**Necrose**	**Regeneração**	**Atrofia**	**Cilindros**
RATO 1	0	0	0	0	2+
RATO 2	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	0
RATO 4	2+	2+	0	0	0
RATO 5	0	0	0	0	0
RATO 6	1+	0	0	0	0
RATO 7	0	0	0	1+	0
RATO 8	0	0	0	0	1+
RATO 9	1+	0	0	0	0
RATO 10	0	0	0	0	0
ANGIOTENSINA II					
RATO 11	1+	0	0	1+	0
RATO 12	2+	0	0	0	0
RATO 13	0	0	0	0	0
RATO 14	2+	1+	0	1+	0
RATO 15	1+	1+	0	1+	2+
RATO 16	1+	0	0	1+	2+
RATO 17	0	0	0	0	1+
RATO 18	2+	2+	0	1+	2+
RATO 19	1+	0	0	0	0
RATO 20	2+	0	0	1+	2+
RATO 21	0	0	0	2+	2
CELECOXIBE					
RATO 22	1+	0	0	0	0
RATO 23	0	0	0	0	0
RATO 24	0	0	0	0	0
RATO 25	0	0	0	0	1+
RATO 26	1+	0	0	1+	1+
RATO 27	1+	0	0	0	1+
RATO 28	1+	1+	0	0	0
RATO 29	0	0	0	0	1+
RATO 30	0	0	0	0	0

Continua

TRATAMENTOS					
INFLIXIMABE					
ANIMAIS	**Lesões histopatológicas HE em túbulos de rim**				
	Degeneração	**Necrose**	**Regeneração**	**Atrofia**	**Cilindros**
RATO 31	0	0	0	0	0
RATO 32	1+	0	0	0	1+
RATO 33	1+	1+	0	0	0
RATO 34	1+	0	0	0	1+
RATO 35	2+	1+	0	0	1+
RATO 36	1+	0	0	0	1+
RATO 37	1+	0	0	0	1+
RATO 38	1+	1+	0	0	1+
RATO 39	2+	0	0	0	0
RATO 40	2+	0	0	1+	1+
RATO 41	2+	1+	0	1+	1+
RATO 42	1+	0	0	1+	0
ANGIOTENSINA II + CELECOXIBE					
RATO 43	0	0	0	1+focal	0
RATO 44	0	0	0	1+	1+
RATO 45	1+	0	0	0	1+
RATO 46	1+	0	0	0	1+
RATO 47	1+	0	0	0	0
RATO 48	0	0	0	0	0
RATO 49	1+	0	0	0	1+
RATO 50	1+	2+	0	2+	1+
RATO 51	1+	0	0	1+	1+
ANIGIOTENSINA II + INFLIXIMABE					
RATO 52	1+	0	0	0	0
RATO 53	2+	1+	0	1+	2+
RATO 54	2+	0	0	2+	3+
RATO 55	1+	1+	0	0	1+
RATO 56	1+	0	0	1+	0
RATO 57	1+	0	0	1+	1+
RATO 58	2+	0	0	0	0
RATO 59	2+	1+	0	1+	1+
RATO 60	2+	0	0	1+	1+
RATO 61	2+	2+	0	1+	3+
RATO 62	1+	0	0	1+	2+

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo