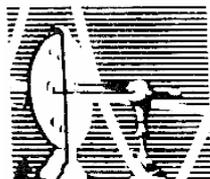


KARINE DA SILVA VERDOORN

PAPEL DE LIPÍDIOS BIOATIVOS EM PROCESSO DE
LESÃO POR OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL E
TENTATIVA DE PRESERVAÇÃO DO TECIDO RENAL
POR TERAPIA CELULAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas (Biofísica) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro.



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Junho de 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAPEL DE LIPÍDIOS BIOATIVOS EM PROCESSO DE LESÃO
POR OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL E TENTATIVA
DE PRESERVAÇÃO DO TECIDO RENAL POR TERAPIA
CELULAR

KARINE DA SILVA VERDOORN

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Biofísica) da Universidade
Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do Grau
de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Prof Dr. Marcelo Einicker Lamas

RIO DE JANEIRO

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Verdoorn, Karine da Silva

Papel de lipídios bioativos em processo de lesão por obstrução ureteral unilateral e tentativa de preservação do tecido renal por terapia celular/ Karine da Silva Verdoorn. Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.

x, 88f.

Orientador: Marcelo Einicker Lamas

Dissertação (Mestrado)-UFRJ / IBCCF / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Referências Bibliográficas: f.78-88.

1. Células mononucleares de medula óssea; 2. Sinalização Celular; 3. Esfingolipídios; 4. Glicerolipídios; 5. Lipídios Bioativos; 6. Transportadores iônicos; 7. Células epiteliais; 8. Nefropatias - Teses.

I. Einicker-Lamas, Marcelo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título

Karine da Silva Verdoorn

**PAPEL DE LIPÍDIOS BIOATIVOS EM PROCESSO DE LESÃO POR
OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL E TENTATIVA DE PRESERVAÇÃO
DO TECIDO RENAL POR TERAPIA CELULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica). Aprovada por:
Rio de Janeiro, 15 de setembro de 2008.

Dr. Marcelo Einicker Lamas (Orientador)
Prof Adjunto, UFRJ- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr. Fernando Costa e Silva Filho (Revisor)
Prof Associado, UFRJ-Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg
Profª Associada, UFRJ- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr Celso Caruso Neves
Prof Associado, UFRJ- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dra. Tecia Maria Ulisses de Carvalho
Profª Associada, UFRJ- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dra. Narcisa Leal da Cunha e Silva (Coordenadora do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica)
Profª Associada, UFRJ- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro

2008

Esta Dissertação foi desenvolvida no período compreendido entre agosto de 2006 e julho de 2008, sob orientação do Professor Marcelo Einicker Lamas, no Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O trabalho foi financiado com auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

VERDOORN, Karine da Silva. Papel de lipídios bioativos em processo de lesão por obstrução ureteral unilateral e tentativa de preservação do tecido renal por terapia celular. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Desequilíbrios nos processos de transporte iônico através do epitélio renal e vias de sinalização desencadeadas a partir da membrana plasmática levam à disfunções com repercussões no organismo inteiro. Como doenças renais carecem de terapias efetivas, vem se desenvolvendo terapias envolvendo células-tronco, com destaque para a ação parácrina destas. Foi analisada a atividade de ATPases transportadoras de íons e a geração de lipídios bioativos no epitélio renal em modelo de lesão renal crônica em ratos, induzida por obstrução ureteral unilateral (OUU) e na tentativa de preservação do tecido, por tratamento com células mononucleares de medula óssea (CMO). As CMO de ratos Wistar adultos foram ressuspensas em tampão e injetadas na veia cava inferior imediatamente após terem sido submetidos à OUU. Como controle foram utilizados um grupo falso operado (SHAM), e um grupo não tratado, submetido à OUU que recebeu injeção de solução salina. Os animais foram sacrificados 14 dias após a cirurgia, e tiveram seus rins (obstruído e contra-lateral) analisados em separado. Na avaliação macroscópica os rins obstruídos apresentaram aumento do índice renal, sendo o índice do grupo tratado menor comparado ao não tratado ($7,9 \pm 2,4$ e $6,4 \pm 0,9$ vs $3,9 \pm 0,3$; OUU e OUU+CMO vs SHAM). A atividade e expressão da Na^+K^+ -ATPase cai nos rins obstruídos ($26,5 \pm 4,4$ e $28,7 \pm 2,4$ vs $98,0 \pm 11,2$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ de atividade; e $0,58 \pm 0,02$, $0,63 \pm 0,01$ vs $0,90 \pm 0,01$ unidades densitométricas (u.d.) de expressão; OUU e OUU+CMO vs SHAM). Não houve diferença na medida da atividade da Na^+ -ATPase. Na avaliação da Ca^{2+} -ATPase, o tratamento com CMO preservou os níveis de expressão semelhantes ao controle no rim operado ($0,98 \pm 0,13$ e $1,13 \pm 0,06$ vs $0,66 \pm 0,14$ u.d.; OUU+CMO e SHAM vs OUU), e em seu par contra-lateral ($0,80 \pm 0,05$ e $0,89 \pm 0,06$ vs $1,15 \pm 0,08$ u.d.). Entre as vias de sinalização por lipídios bioativos foi observada tendência de aumento nos níveis de fosfatidilinositol-4-fosfato nos animais OUU. A obstrução aumentou a disponibilidade de diacilglicerol nos rins operados dos animais obstruídos, quantificado pela formação de ácido fosfatídico ($2,4 \pm 0,4$ e $2,4 \pm 0,3$, respectivamente, vs $1,0 \pm 0,2$ nmol PA.mg⁻¹.min⁻¹ no SHAM); e induziu aumento de ceramida, neste o tratamento com CMO impediu este efeito ($42,0 \pm 9,1$ vs $30,4 \pm 7,0$ e $22,7 \pm 6,8$ fmol C1P.mg⁻¹.min⁻¹; OUU vs OUU+CMO e SHAM). Também foi observada ação benéfica do tratamento pelo aumento na atividade da esfingosina cinase (quantificado pela formação de esfingosina-1-fosfato, $52,2 \pm 7,6$ vs $34,7 \pm 6,2$ e $36,5 \pm 3,0$ nmol S1P.mg⁻¹.min⁻¹, OUU+CMO vs OUU e SHAM). Nos rins obstruídos dos animais OUU ocorreu maior expressão do receptor do tipo 1 para o ácido lisofosfatídico, nesse grupo foi detectada a presença de dímeros, o tratamento com CMO normalizou a expressão deste receptor. A lesão renal por OUU causa disfunção do órgão devido a danos causados em processos de transporte iônico e vias de sinalização envolvendo lipídios bioativos, foi observado que as CMO apresentam potencial regenerativo no rim.

ABSTRACT

Imbalances between ion transport across renal epithelium and signaling pathways triggered at the plasma membrane lead to renal dysfunctions with whole organism repercussions. Renal diseases lack effective therapies, therefore new experimental strategies using stem cells have been developed with its paracrine effect being strongly supported. This work analyzed the activity of ion transport ATPases and production of bioactive lipids at renal epithelium in a model of chronic renal injury of rats induced by unilateral ureteral obstruction (UUO), and in attempt of preservation through treatment with bone marrow mononuclear cells (BMC). BMC of adult Wistar rats were resuspended in buffer solution and injected at the inferior cava vein of rats immediately after obstruction procedures. A control group (SHAM) and an obstructed group with saline (UUO) were also used. These animals were sacrificed 14 days after surgery and the obstructed kidneys analyzed separated from the contra-lateral ones. Macroscopic evaluation showed that the obstructed kidneys presented a bigger renal index, the treated group (UUO+BMC) had a lower renal index compared to the non-treated ($7,9 \pm 2,4$ and $6,4 \pm 0,9$ vs $3,9 \pm 0,3$; UUO and UUO+BMC vs SHAM). It was observed that Na^+K^+ -ATPase activity and expression decreased at the obstructed kidneys ($26,5 \pm 4,4$ and $28,7 \pm 2,4$ vs $98,0 \pm 11,2$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ of activity; and $0,58 \pm 0,02$, $0,63 \pm 0,01$ vs $0,90 \pm 0,01$ densitometric units (d.u.) of expression; UUO and UUO+BMC vs SHAM). There was no difference among all the experimental groups in the measure of Na^+ -ATPase activity, while evaluation of Ca^{2+} -ATPase showed that BMC treatment maintained expression levels of this transporter similar to control group level at the obstructed kidney ($0,98 \pm 0,13$ and $1,13 \pm 0,06$ vs $0,66 \pm 0,14$ d.u.; UUO+BMC and SHAM vs UUO), and the contra-lateral one ($0,80 \pm 0,05$ and $0,89 \pm 0,06$ vs $1,15 \pm 0,08$ d.u.). Among the bioactive lipids signaling pathways there was a trend to increased levels of phosphatidylinositol-4-phosphate formation at UUO animals. Obstruction rose diacylglycerol availability of operated kidneys of UUO and UUO+BMC animals, measured through formation of phosphatidic acid ($2,4 \pm 0,4$ and $2,4 \pm 0,3$ vs $1,0 \pm 0,2$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ of SHAM), and induced an increase of intracellular ceramide content, whereas BMC treatment prevented this effect ($42,0 \pm 9,1$ vs $30,4 \pm 7,0$ and $22,7 \pm 6,8$ fmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹; UUO vs UUO+BMC and SHAM). Beneficial action of BMC treatment was also observed at obstructed kidneys through increasing sphingosine kinase activity (measured through formation of sphingosine-1-phosphate adding exogenous sphingosine, $52,2 \pm 7,6$ vs $34,7 \pm 6,2$ and $36,5 \pm 3,0$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹, UUO+BMC vs UUO and SHAM). Finally, in the obstructed kidneys of UUO group occurred an increase of expression of type 1 receptor for lisophosphatidic acid, detected by formation of dimers or oligomers; whereas treatment with BMC normalized the expression of this receptor. So renal injury by UUO causes great dysfunction of the organ, through damages of ion transport processes and imbalances of bioactive lipids signaling pathways; and BMC have regenerative potential at kidneys.

ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato

C1P: ceramida-1-fosfato

Cer: ceramida

CerK: ceramida cinase

CMO: células mononucleares de medula óssea

DAG: diacilglicerol

DGK: diacilglicerol cinase

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA: ácido etileno-glicol bis (éter β -aminoetil) N, N, N', N'- tetra-acético

HSC: células-tronco hematopoiéticas

IP₃: inositol trifosfato

LPA: ácido lisofosfatídico

LPA₁: receptor do tipo 1 para o LPA

MSC: células-tronco mesenquimais

OOU: obstrução ureteral unilateral

PA: ácido fosfatídico

Pi: fosfato inorgânico

PKC: proteína cinase C

PLC: fosfolipase C

PMCA: Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática

PMSF: fluoreto de fenil-sulfonil-metano

PtdIns(4)P: fosfatidilinositol-4-fosfato

PtdIns: fosfatidilinositol

PI-4K: fosfatidilinositol- 4 cinase

S1P: esfingosina-1-fosfato

SK: esfingosina cinase

SM: esfingomielina

SMase: esfingomielinase

Sph: esfingosina

TLC: cromatografia de camada fina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Vias de sinalização que envolvem lipídios da membrana plasmática.....	12
1.1.1 Fosfoinositídeos.....	14
1.1.2 Esfingolipídios.....	17
1.2 Os Rins.....	22
1.2.1 Transportadores ativos primários presentes na MBL.....	25
1.2.2 Doenças renais e epidemiologia.....	29
1.3 Células-tronco.....	33
2. OBJETIVOS.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Material.....	41
3.2 Animais e grupos experimentais.....	41
3.3 Extração de células mononucleares de medula óssea.....	42
3.4 Cirurgia de obstrução ureteral unilateral (OUU).....	43
3.5 Retirada e pesagem dos rins.....	44
3.6 Obtenção de homogenato purificado de córtex renal.....	45
3.7 Preparação do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	45
3.8 Atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+\text{-ATPase}$	46
3.9 Atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$	46
3.10 Atividade da $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$	47
3.11 Eletroforese e imunodeteção.....	47
3.12 Ensaio de fosforilação e extração de lipídios.....	48
3.13 Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fosfatidilinositóis mono e polifosfatos.....	15
Figura 2: Metabolismo dos esfingolipídios e seus metabólitos bioativos	21
Figura 3: Diferenças morfológicas e funcionais entre as membranas apical e basolateral de células epiteliais renais	26
Figura 4: Índice renal.....	52
Figura 5: Fotos dos rins contra-lateral (esquerda) e obstruído (direita) 14 dias após obstrução.....	54
Figura 6: OUU reduz atividade da Na^+K^+-ATPase e tratamento com CMO não impede este efeito.....	57
Figura 7: Expressão da Na^+K^+-ATPase.....	59
Figura 8: OUU e tratamento com CMO não influenciam atividade da Na^+-ATPase.....	61
Figura 9: Expressão da Ca^{2+}-ATPase (PMCA).....	63
Figura 10: Aumento da formação de PA (ácido fosfatídico) induzido pela OUU.....	65
Figura 11: OUU aumenta variação na formação de PI(4)P (fosfatidilinositol-4-fosfato).....	67
Figura 12: Maior atividade da SK em rins OUU tratados com CMO.....	69
Figura 13: Maior formação de C1P em rins OUU é revertida pelo tratamento com CMO.....	71
Figura 14: Expressão do receptor LPA_1.....	74

1. INTRODUÇÃO

Células, tanto de organismos unicelulares mais simples quanto dos multicelulares mais complexos, possuem extraordinária capacidade de adaptação ao meio que as envolve. A partir da percepção e interpretação de sinais externos, uma célula é capaz de responder alterando seu comportamento para, dentro do possível, garantir a manutenção de suas funções e, conseqüentemente, a sua sobrevivência (Hannun *et al.*, 2001). Esta habilidade inerente às células, em mamíferos “forma a base do desenvolvimento, da reparação, da imunidade e de outras funções associadas a homeostase tecidual” (Cooper e Hausman, 2007). A coordenação desses eventos de percepção e emissão de uma resposta é realizada através de um complexo sistema de sinalização e transdução de sinais.

O processo de sinalização celular envolve diversos ‘elementos’ que podem ser divididos em três grupos fundamentais: o dos sinais extracelulares, responsáveis por sensibilizar a célula; o dos receptores, que irão transduzir o sinal extracelular em cascatas de sinalização intracelulares; e o grupo dos segundos mensageiros. Os sinais podem ser físicos, como luz, som e calor; químicos, no caso de neurotransmissores, hormônios, citocinas ou fatores de crescimento; mecânicos, como pressão e tensão do ambiente, e ainda, geométricos, representados pela estrutura supramolecular do ambiente extracelular (Na *et al.*, 2008). Esses sinais devem interagir com componentes de membrana plasmática (receptores de membrana) ou do núcleo (receptores nucleares, no caso de hormônios). Cada célula possui seu próprio conjunto de receptores, o que confere identidade e individualidade a elas (Sudhahar *et al.*, 2008). Esses receptores podem ser intracelulares para o caso de moléculas sinalizadoras pequenas e hidrofóbicas, porém a maioria se localiza na membrana plasmática. Os receptores de membrana plasmática podem ser classificados de acordo com a maneira de transduzir os sinais extracelulares. Alguns são acoplados a canais iônicos, controlando diretamente o fluxo de íons através da membrana (Sudhahar *et al.*, 2008). Outros controlam a atividade de

proteínas intracelulares, entre esses encontram-se os receptores associados a enzimas, que agem como ou controlam diretamente a atividade destas através de fosforilação e defosforilação. Existem, ainda, os receptores associados a proteínas G (proteínas triméricas de ligação ao GTP), que constituem a maior família de receptores. Esses últimos, através das proteínas G, controlam tanto enzimas ligadas à membrana, quanto canais iônicos (Bourne, 1997). A ativação dos receptores resulta na produção ou liberação de moléculas que integram as cascatas de sinalização intracelular, variando desde pequenos íons a peptídeos, proteínas e lipídios bioativos, conhecidos como segundos mensageiros e responsáveis por integrar, amplificar e distribuir os sinais percebidos pelos receptores (Cohen, 1992). Essas cascatas desencadearão alterações fisiológicas, englobando eventos como: ativação ou atenuação de atividade de proteínas transportadoras, transcrição gênica, sobrevivência, proliferação ou apoptose (Alberts *et al.*, 2007; Nelson e Cox, 2006).

Dada a importância das vias de sinalização para o adequado funcionamento das células, tecidos e, conseqüentemente, do organismo como um todo, é grande o interesse de identificação e caracterização dessas vias. Sabe-se hoje que falhas no processo de sinalização celular são responsáveis por diversas patologias, como o diabetes (tipos I e II), por exemplo; que toxinas bacterianas agem sobre proteínas transdutoras de sinais (prolongando-o ou inibindo-o), acarretando em diversas disfunções. O conhecimento dessas vias permite, em alguns casos, uma intervenção adequada e eficiente (Alberts *et al.*, 2007).

Na próxima seção revisaremos algumas das principais vias de sinalização envolvendo lipídios a partir da membrana plasmática, foco de interesse desta Dissertação.

1.1 Vias de sinalização que envolvem lipídios da membrana plasmática

Na segunda metade do século XX, em meio à discussão sobre o conceito, estrutura e função da membrana plasmática (na época o modelo vigente era o proposto por Danielli e Davson), importantes descobertas formaram os primeiros indícios de que esta, a partir de sinais extracelulares, desencadearia diversas cascatas de sinalização intracelulares. Já em 1953, o casal Hokin demonstrou que, estimuladas por acetilcolina, células exocíticas do pâncreas e do córtex cerebral de pombos apresentavam maior *turnover* de fosfoinositídeos (Hokin e Hokin, 1953). Porém, apesar de o motivo da diversidade de classes lipídicas já despertar questionamentos na época, ainda pouca atenção era dispensada aos lipídios de membrana. O foco da maioria das investigações eram as proteínas, às quais era atribuída a responsabilidade funcional das células.

Então, em 1955 o AMPc (Adenosina monofosfato cíclico) havia sido identificado como mediador intracelular. E as descobertas avançaram rapidamente no sentido de identificar os mecanismos responsáveis pela modulação do AMPc. Em 1958, Sutherland e Rall demonstraram que o AMPc era o intermediário-chave na resposta da via da glicogenólise hepática à adrenalina e glucagon (Nahorski, 2006); o que representou um marco na história da sinalização celular. Não demorou muito, a adenilato ciclase, uma proteína de membrana, e a fosfodiesterase foram identificadas como as proteínas responsáveis pela síntese e degradação, respectivamente, do AMPc. Enquanto na área dos lipídios, apenas em 1965, Michell e Hawthorne localizaram uma fosfatidilinositol cinase (PI-K) na face interna da membrana plasmática. E, nos anos subseqüentes (1965-1967), diversos autores apenas confirmaram a presença da PI-K na face citosólica da membrana plasmática de diferentes células e relataram também a presença da fosfatidilinositol-4-fosfato cinase, porém ainda sem saber sua função (Michell, 1995). Em 1968, quando Walsh e colaboradores dão mais um passo em direção à descrição da via de sinalização do AMPc, relatando que este regula a atividade celular através

de uma proteína, a PKA (proteína cinase A); Lewis Hokin relaciona, equivocadamente, o ‘ciclo’ do fosfatidilinositol (PtdIns) ao movimento de excitose celular. Logo depois, enquanto o modelo de membrana plasmática era reformulado para o proposto por Singer e Nicholson (1972), os grupos que investiam nos inositol-lipídios tentavam relacionar seu ciclo com os aumentos na concentração de Ca^{2+} intracelular. E, apesar de em 1969 dois grupos já terem proposto que o ‘ciclo’ do PtdIns contribui para a sinalização celular, somente em 1975, Robert Michell, em uma revisão, correlaciona os inositol-lipídios à função dos receptores de membrana e argumenta que a hidrólise destes era responsável pela sinalização de Ca^{2+} . A via de sinalização dos fosfoinosítídeos começou a ser mais bem descrita apenas nos anos 80, quando Streb e colaboradores (1983) descobriram que o inositol-1,4,5 trifosfato (IP_3) é um segundo mensageiro hidrossolúvel e, Nishizuka (1984) demonstrou que o diacilglicerol (DAG) ativa a proteína cinase C (PKC).

Hoje ninguém questiona a importância dos lipídios de membrana plasmática no estabelecimento de respostas celulares suscitadas por diferentes fatores. Sabe-se que além da tradicional função estrutural de provedores de uma barreira semipermeável e servirem de local de ancoramento para proteínas plasmáticas, as diferentes classes de lipídios influenciam a rigidez e a fluidez da membrana, importante para a formação de vesículas e a rápida difusão de proteínas e atuam no processo de transdução de sinais extracelulares, não só como alvos de proteínas cinases e fosfolipases, mas também na formação de microdomínios funcionais na membrana plasmática (*rafts*), os quais são responsáveis por concentrar moléculas sinalizadoras (lipídios ou proteínas) ou proteínas transportadoras, modulando sua atividade (van Meer *et al.*, 2008).

Entre os lipídios de membrana encontram-se esteróis e fosfolipídios, os quais podem ser divididos em glicerofosfolipídios e esfingolipídios. Os glicerofosfolipídios são os lipídios de membrana derivados do ácido fosfatídico. Possuem dois ácidos graxos ligados a uma

molécula de glicerol, através de uma ligação éster ao 1° e 2° carbono e um grupamento polar ou iônico ligado ao 3° carbono através de uma ligação fosfodiéster. De acordo com o grupamento polar, são classificados como: fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, e assim por diante. As duas cadeias de ácidos graxos ligadas aos fosfoglicerídios também podem variar quanto ao número de carbonos e insaturações na cadeia, conferindo uma diversidade ainda maior a essa classe de lipídios. A distribuição desses lipídios varia de acordo com o tipo celular, organismo e organela em questão. Apesar dos inositol-lipídios corresponderem a apenas 6-8% do total de fosfolipídios da membrana plasmática, eles são, metabolicamente, os mais ativos e essenciais para algumas das principais vias de sinalização em diferentes tipos celulares (Prasad, 1996; van Meer *et al.*, 2008).

1.1.1 Fosfoinosítídeos

O fosfatidilinositol é o glicerofosfolipídio cuja cabeça polar é a molécula de *myo*-inositol ligada ao diacilglicerol (porção apolar) (Michell, 2008). Na membrana plasmática eles se encontram no folheto interno, face citosólica. Os fosfatidilinositóis são moléculas extremamente versáteis, dada a multiplicidade de fosforilações possíveis (quanto à posição e combinação) em seu anel de inositol (Figura 1), o que os torna bastante interessantes para o processo de transdução de sinais, visto que possibilita a formação de sete formas distintamente fosforiladas, em vez de apenas as formas fosforilada e defosforilada, como no caso de algumas proteínas sinalizadoras (Overduin, 2001).

Cada mono ou poli-fosfoinosítídeo possui uma função diferente, e a regulação precisa de sua concentração determina sua atividade. A atividade de um fosfoinosítídeo é iniciada a partir de sua formação e conseqüente interação com proteínas específicas. Para cessar

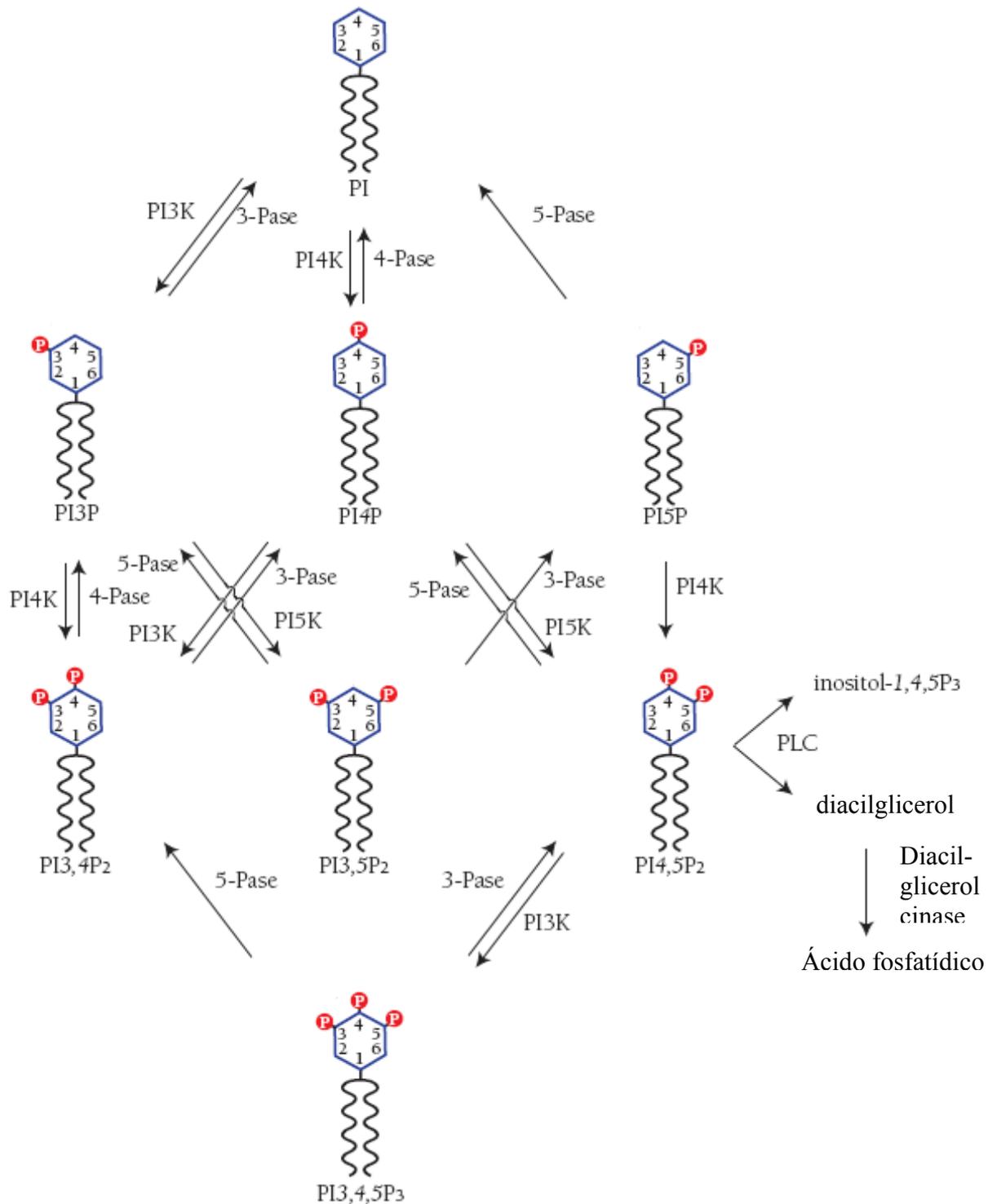


Figura 1: Fosfatidilinosítóis mono e polifosfatos, e suas vias de metabolização (Retirado de Overduin, *et al.*, 2001). PI: fosfatidilinosítol, PI3K: fosfatidilinosítol-3 cinase, PI4K: fosfatidilinosítol-4 cinase, 3-Pase: 3-fosfato fosfatase, 4-Pase: 4-fosfato fosfatase, 5-Pase: 5-fosfato fosfatase, PI5K: fosfatidilinosítol-5 cinase, PI3,4P₂: fosfatidilinosítol-3,4 bifosfato, PI3,5P₂: fosfatidilinosítol-3,5 bifosfato, PI4,5P₂: fosfatidilinosítol-4,5 bifosfato, PI3,4,5P₃: fosfatidilinosítol-3,4,5 trifosfato, PLC: fosfolipase C.

sua atividade, o fosfoinosítídeo pode ser novamente fosforilado, através de outra proteína cinase (que pode ser específica para determinada posição no anel de inositol ou não), defosforilado, pela ação de uma fosfatase (que também pode ser específica ou não), ou ainda, degradado (Overduin *et al.*, 2001).

Os mecanismos de ação dos fosfoinosítídeos são múltiplos, englobando desde a geração de segundos mensageiros intracelulares e intercelulares até o recrutamento de proteínas citosólicas e simples interação com proteínas de membrana, alterando suas atividades (Pendaries *et al.*, 2003; van Meer *et al.*, 2008).

A primeira via de sinalização por fosfolipídios descrita envolve os fosfoinosítídeos (Michel, 1975). Nesta via o fosfatidilinositol - 4,5 – bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) é o substrato inicial que sofre a ação da fosfolipase C (PLC), que acaba desencadeando a cascata de sinalização que leva à ativação da proteína cinase C (PKC), uma serina treonina cinase. A PLC, ativada pela subunidade α de uma proteína Gq cliva o PtdIns(4,5)P₂ produzindo dois segundos mensageiros: o IP₃, molécula polar, que se difunde pelo citosol e abre os canais de Ca²⁺ dependentes de IP₃ no retículo sarcoendoplasmático e o diacilglicerol (DAG) que, por ser apolar, permanece na membrana plasmática. O Ca²⁺ liberado irá, além de ativar outras enzimas dependentes de Ca²⁺, mobilizar a PKC para a membrana plasmática, onde esta será ativada na presença de DAG e/ou fosfatidilserina (PS). Já o DAG, que se difunde rapidamente pela membrana, atuará na ativação das PKCs, entre outras proteínas, e poderá sofrer a ação de DAG lipases e cinases (revisto por Goto *et al.*, 2008).

As DAG lipases podem levar à formação do ácido araquidônico (AA), que tanto pode atuar como 2º mensageiro quanto ser metabolizado subsequente, levando à síntese de eicosanóides. Já as diacilglicerol cinases (DGKs) são enzimas que fosforilam o DAG, acarretando na formação do ácido fosfatídico (PA). Este último é um 2º mensageiro, que interage e regula uma série de outras proteínas sinalizadoras ou é reutilizado na formação de

glicerolipídios. Dessa maneira, o DAG serve não só como produto intermediário na síntese de diversos lipídios, mas também como lipídio bioativo (revisto por Goto *et al.*, 2008).

É interessante notar que esta via de sinalização leva à geração e liberação de inúmeras moléculas bioativas (DAG, IP₃, Ca²⁺, AA, PA, entre outros) e pode acarretar a ativação de diferentes isoformas da PKC, influenciando o metabolismo celular em processos tão diversos quanto migração, contração, permeabilidade da membrana, proliferação, apoptose, secreção e diferenciação (Pendaries *et al.*, 2003).

Como mencionado acima, os fosfoinosítídeos são importantes não só por desencadear diferentes vias de sinalização, mas também por sua interação e regulação de diversas proteínas na membrana plasmática. O fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns(4)P), por exemplo, além de ser precursor do glicerolipídio PtdIns(4,5)P₂, age na modulação da atividade da Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática (PMCA), regulando o ajuste fino da concentração intracelular de Ca²⁺ (Missiaen *et al.*, 1989; Guilherme *et al.*, 1998; Filomatori *et al.*, 2003). Também já foi demonstrado que os fosfoinosítídeos regulam canais iônicos presentes em membranas do epitélio renal (revisado por Balzer-Yost e Nofziger 2005). As propriedades regulatória e sinalizadora dos fosfoinosítídeos fazem com que sua taxa de *turnover* seja elevada em tecidos bastante ativos metabolicamente e justificam a baixa concentração desses lipídios em relação a outros lipídios de membrana plasmática.

1.1.2 Esfingolipídios

Os esfingolipídios compõem outra classe de lipídios de membrana plasmática. Esses lipídios, em vez do glicerol, possuem uma base esfingóide, sendo a mais comum a esfingosina (1,3 diidroxi-2-amino-4-octadeceno) à qual, através de uma ligação amida, se liga uma cadeia de ácidos graxos no 2º carbono, formando a molécula de ceramida, principal constituinte dos esfingolipídios (Futerman e Hannun, 2004). Ao 1º carbono se liga um

grupamento polar, por uma ligação glicosídica ou fosfodiéster. De acordo com o grupamento polar, os esfingolipídios podem ser classificados como: esfingomielinas, que são os esfingolipídios mais abundantes e possuem a fosfocolina como cabeça polar, podendo, também, ser classificados como fosfolipídios; glicoesfingolipídios, que possuem 1 (cerebrosídeos) ou mais (globosídeos) açúcares ligados à ceramida; e gangliosídeos, que são os mais complexos esfingolipídios e possuem oligossacarídeos ligados à ceramida (Futerman e Hannun, 2004).

As moléculas de esfingolipídios também podem ser divididas da seguinte maneira: grupo das bases esfingóides e seus derivados fosforilados (esfingosina e esfingosina-1-fosfato), as ceramidas e seus derivados fosforilados (ceramida-1-fosfato) e os esfingolipídios complexos (os fosfoesfingolipídios e glicoesfingolipídios). Entre estes grupos, os dois primeiros despertam particular interesse, dado o seu envolvimento em eventos celulares essenciais.

A ceramida (Cer) pode ser considerada a molécula central no metabolismo dos esfingolipídios. Sua produção pela via de síntese *de novo* ocorre no retículo endoplasmático (RE) e se inicia com a condensação de uma serina e um ácido palmítico-CoA pela ação da serina-palmitoil transferase. Em seguida, reações sucessivas de redução, acilação e desaturação culminam na produção da Cer por esta via. A Cer produzida no RE é transportada para o aparelho de Golgi, onde serão formados os esfingolipídios complexos (glicosilceramida e esfingomielina) (van Blitterswijk *et al.*, 2003; Hannun e Luberto, 2004).

Outra via de formação da Cer se dá pela hidrólise da esfingomielina (SM) de membrana, por ação de esfingomielinases (SMases), gerando a Cer e um radical polar: fosfocolina. A Cer formada por esta via pode ser fosforilada pela ceramida cinase (CerK), à ceramida 1-fosfato (C1P), re-utilizada para síntese de esfingomielina ou glicoesfingolipídios, ou ainda, hidrolizada por ceramidases, liberando esfingosina (Sph) e ácidos graxos. A Sph,

por sua vez, pode ser reconvertida à Cer, pela Cer sintase, ou ser fosforilada por uma esfingosina cinase (SK), formando a esfingosina 1-fosfato (S1P). Por fim, a S1P pode ser metabolizada por fosfatases específicas restaurando a Sph, ou por liases que a degradam irreversivelmente em seus metabólitos: etanolamina 1-fosfato e palmitaldeído (Chalfant e Spiegel, 2005). Esta complexa rede de interconversão de esfingolípídios bioativos pode ser visualizada na Figura 2.

Nesta rede de esfingolípídios, cada molécula exerce diferentes funções como segundo mensageiro celular. A Cer, molécula central, é reconhecida por seu papel na indução de morte celular programada, estando o seu acúmulo relacionado ao desencadeamento e execução da fase mitocondrial da apoptose (Hannun e Luberto, 2000). Entretanto, as Cer também estão envolvidas em outros eventos celulares, às vezes até antagônicos, como inibição do ciclo celular e proliferação, organização de plataformas sinalizadoras (*rafts*) nas membranas plasmáticas, e indução da diferenciação e senescência celular (Hannun *et al.*, 2001; van Blitterswijk *et al.*, 2003). Diversos sinais de estresse, como o fator de necrose tumoral (TNF α), interferon- γ , interleucina 1, luz ultravioleta, calor e agentes quimioterápicos, entre outros agonistas, levam à formação da Cer pela via de hidrólise da SM (Chalfant e Spiegel, 2005). A Cer, em seguida, pode ativar proteínas efetoras, tendo, entre os principais alvos, fosfatases e cinases, com especial destaque para a PKC ζ , que, por sua vez, modula as respostas celulares acima mencionadas.

A C1P, formada a partir da fosforilação da Cer, está relacionada a efeitos contrários aos de sua precursora, ou seja, inibe a apoptose e tem atividade mitogênica. Além disso, este lípido bioativo também está envolvido na modulação de respostas inflamatórias através da síntese de eicosanóides (Chalfant e Spiegel, 2005).

As bases esfingóides (Sph e S1P), derivadas da ação reversível de ceramidases e SK, também atuam como lípidios bioativos. A Sph, com ações semelhantes à Cer, induz morte

celular e tem caráter anti-mitogênico na maioria das células. Porém seus efeitos parecem ser dependentes do tipo celular, o que faz com que este lipídio possua caráter pró-mitogênico em outras células (Merril Jr. *et al.*, 1997). A Sph pode difundir-se rapidamente através da membrana plasmática (ao contrário da Cer que permanece ali). Esta propriedade possibilita que estes lipídios ajam em diferentes compartimentos celulares (Hannun *et al.*, 2001). Também já foi demonstrado que a S1P se liga a diversos receptores associados à proteínas G, desencadeando respostas como proliferação celular, inibição de apoptose e acúmulo de matriz extracelular. Seus efeitos intracelulares englobam mobilização de Ca^{2+} e inibição de caspases (Hannun e Obeid, 2008).

Conforme descrito, a via de sinalização dos esfingolipídios possui múltiplos metabólitos bioativos com diferentes funções e se constitui de uma rede de vias interconectadas. Isto provê múltiplas vias de regulação celular e faz com que o evento celular desencadeado seja determinado pelo balanço entre os níveis desses lipídios bioativos (Kester e Kolesnick, 2003). Ultimamente vem sendo demonstrado que desbalanços nessas cascatas de sinalização celular formam a base de diversas patologias e compartilham alvos intracelulares comuns, conferindo-lhes complexidade ainda maior (Wymann e Schneider, 2008).

Diversas dessas vias de sinalização já foram descritas no tecido renal, desempenhando neste órgão importante papel na regulação de diferentes transportadores de íons. A S1P, por exemplo, parece estar envolvida na regulação do Ca^{2+} intracelular (Spiegel e Milstien, 2002) e ativa a PI-4K (Einicker-Lamas *et al.*, 2003), já o PtdIns(4)P, formado por esta cinase, modula o transporte de Ca^{2+} pela PMCA (Guilherme *et al.*, 1998). Mais recentemente foi demonstrado que a Cer modula o transporte de Ca^{2+} , pela PMCA, e de Na^+ , pela Na^+ -ATPase (Cabral *et al.*, 2007; Cabral, 2008). Esta interação entre as vias de sinalização e a atividade de transportadores iônicos é essencial para a homeostasia celular. Contudo, no epitélio renal

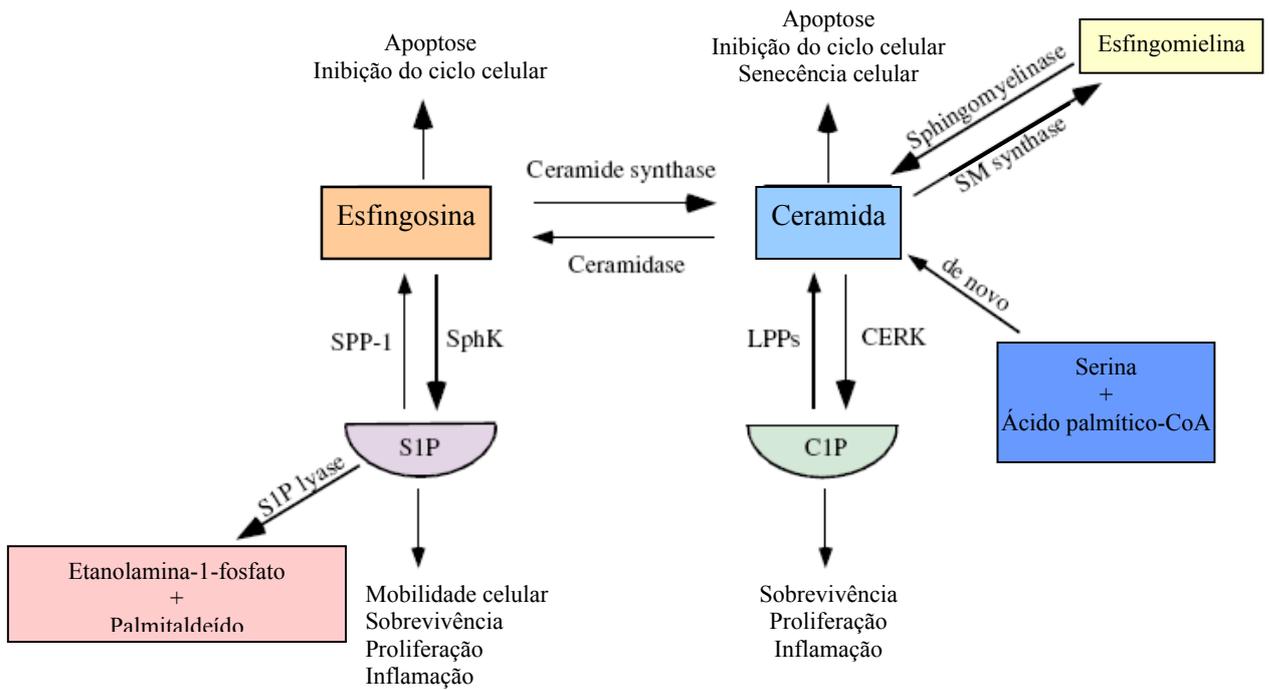


Figura 2: Metabolismo dos esfingolipídios e seus metabólitos bioativos. Adaptado de Chalfant e Spiegel, 2005.

estes processos se tornam mais evidentes, visto que este possui intensa atividade transportadora sob estreita regulação de vias de sinalização desencadeadas de acordo com as necessidades do organismo.

1.2 Os rins

Os rins são órgãos vitais, responsáveis pela manutenção da composição e volume dos líquidos corporais de maneira adequada para o funcionamento de todo o organismo (Mello-Aires, 1999). Entre suas funções específicas podemos citar: regulação do volume de fluido extracelular, contribuindo para a regulação da pressão arterial; regulação da osmolaridade plasmática, o que mantém um equilíbrio apropriado entre os volumes intra e extracelulares; manutenção do equilíbrio iônico; regulação do pH, que garante atividades enzimáticas adequadas e o estado conformacional das proteínas; excreção de resíduos metabólicos e substâncias estranhas; conservação de nutrientes; e, ainda, produção de hormônios. Dentre estes se destacam a renina, que atua na regulação hemodinâmica renal e sistêmica, produzindo efeito hipertensor; eritropoetina, participando da produção de glóbulos vermelhos; e o calcitriol, que converte a 25 hidroxicoлекаliferol em 1,25 diidroxicoлекаliferol, auxiliando a regulação do metabolismo ósseo; entre outros (Seldin e Giebisch, 1985; Mello-Aires, 1999; Berne e Levy, 2000).

Para que seja possível manter essa homeostasia hidroeletrolítica dentro de uma estreita faixa compatível com a vida, o rim filtra continuamente o plasma sanguíneo e, logo em seguida, reabsorve substâncias conforme as necessidades do organismo.

O organismo humano é normalmente composto por dois rins e, cada um por aproximadamente 1.000.000 de néfrons. O néfron é a unidade funcional do rim, ou seja, cada néfron é capaz de exercer todas as funções atribuídas ao rim. O néfron, por sua vez, é

constituído pelo glomérulo e o túbulo renal. O glomérulo é formado por uma rede de capilares provenientes da arteríola aferente, que se ramificam e anastomosam envolvidos pela cápsula de Bowman. Neste local o sangue é filtrado, movido por diferenças de pressões (hidrostáticas e coloidosmóticas) entre o capilar glomerular e o espaço de Bowman. O plasma atravessa o endotélio capilar, a membrana basal (que recobre o endotélio) e o epitélio fenestrado para o espaço de Bowman e, em seguida, percorre o túbulo renal (Seldin e Giebisch, 1985; Mello-Aires, 1999; Berne e Levy, 2000). Ao longo do túbulo renal o plasma sofrerá alterações em sua composição, através de processos de reabsorção de substâncias essenciais ao organismo (proteínas, aminoácidos, glicose, água e íons) e secreção de outras fazendo com que o fluido que chega à pelve renal tenha composição completamente diferente ao do plasma e seja denominado urina.

Na saída do glomérulo, os capilares glomerulares se anastomosam e dão origem à arteríola eferente, formando uma nova rede de capilares, porém agora, peritubulares. Como o nome já sugere, esses capilares circundam o túbulo renal, e, entre estes compartimentos (lúmen tubular \Leftrightarrow interstício \Leftrightarrow lúmen capilar), ocorrerão os processos de reabsorção e secreção. Esses processos ocorrem através de diferentes mecanismos de transporte ativos e passivos, todos interligados, como será visto adiante (Seldin e Giebisch, 1985; Mello-Aires, 1999; Berne e Levy, 2000).

Os rins são órgãos fascinantes no que diz respeito à integração e comprometimento entre suas anatomia e fisiologia. O túbulo renal, por exemplo, para executar a reabsorção de grandes quantidades de substâncias com propriedades distintas sem perder a especificidade, é dotado de diferentes características de transporte e permeabilidade à água ao longo de sua trajetória, que por sua vez, também é organizada anatomicamente de maneira a contribuir nos processos de reabsorção e secreção. Dessa maneira é possível distinguir cinco segmentos tubulares com capacidades reabsortivas variadas: 1) túbulo proximal, permeável à água e com

alta taxa de reabsorção ativa de solutos; 2) ramo fino da alça de Henle, segmento bastante permeável à água, apresenta baixa taxa de transporte de solutos, sendo apenas passivo; 3) ramo grosso ascendente da alça de Henle, considerado segmento diluidor, é impermeável à água e possui alta taxa de reabsorção de solutos; 4) túbulo distal, possui as mesmas características do segmento anterior, porém com diferenças nos tipos de transportadores presentes na membrana apical, e; 5) ducto coletor, o segmento regulador, possui permeabilidade à água e taxa de transporte de solutos controlada pelos níveis de hormônio antidiurético (Seldin e Giebisch, 1985; Berne e Levy, 2000).

Portanto, as células que compõem o epitélio tubular se distinguem de um segmento para outro por diversas características, como permeabilidade à água, tipos de transportadores presentes em suas membranas e quantidade de vilosidades nas mesmas, concentração de mitocôndrias, e sensibilidade a hormônios, entre outros; mas também, compartilham características básicas que garantem os mecanismos de reabsorção e secreção (Férraille e Doucet, 2001). As células epiteliais são unidas lateralmente por junções aderentes (*tight junctions*), o que garante a separação de diferentes compartimentos do organismo e segrega a membrana plasmática em duas porções distintas: membrana apical, voltada para o lúmen do túbulo renal; e membrana basolateral, em contato com o interstício. Tal segregação permite a manutenção de diferenças estruturais (presença de vilosidades ou não) e funcionais (composição de transportadores, receptores e redes regulatórias) entre as duas membranas e torna possível o transporte transepitelial vetorial (Figura 3) (Férraille e Doucet, 2001).

A reabsorção e secreção de solutos pela membrana apical é possível devido ao gradiente eletroquímico de Na^+ formado entre a luz tubular e o meio intracelular, pelos transportadores ativos primários de Na^+ presentes na membrana basolateral. Este gradiente fornece a energia necessária para que transportadores ativos secundários reabsorvam (cotransportadores de Na^+ /aminoácidos, Na^+ /glicose, etc) ou secretem (trocares Na^+/H^+)

solutos na membrana apical, acoplados à reabsorção de Na^+ . Por outro lado, a passagem desses solutos através da membrana basolateral ocorre por difusão passiva a favor de seu gradiente de concentração (Berne e Levy, 2000).

1.2.1 Transportadores ativos primários presentes na MBL

Os transportadores ativos primários de Na^+ responsáveis por manter baixa a concentração intracelular deste íon são dois: $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e $\text{Na}^+\text{-ATPase}$. Estes dois transportadores utilizam a energia química da ligação fosfoanidrido γ -terminal do ATP para transportar o Na^+ para fora da célula, contra seu gradiente eletroquímico (Férraille e Doucet, 2001).

A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, encontrada em todas as células eucarióticas, desempenha no rim primordial função (geração e manutenção do gradiente eletroquímico de Na^+ , fonte de energia para os processos de transporte ativo secundário) por estar confinada à porção basolateral da membrana. Esta enzima, responsável pela reabsorção em massa de Na^+ , é uma proteína integral de membrana composta de duas cadeias polipeptídicas principais (α e β) e outra acessória (γ). A subunidade α é composta por cerca de 1000 aminoácidos, resultando em uma massa molecular em torno de 110.000 Da, e possui 10 domínios transmembrana com suas regiões terminais (NH_2 - e COOH -) voltadas ao citoplasma. Essa subunidade é responsável pela catálise do ATP e pelo transporte de três Na^+ para fora da célula e dois K^+ para dentro da célula. Portanto, possui sítios de ligação para os cátions, ATP, e ouabaína (inibidor da enzima). A subunidade β , cadeia com cerca de 370 aminoácidos e massa molecular de 40.000-60.000 Da, possui apenas um domínio transmembrana com a porção extracelular glicosilada. Esta subunidade não possui atividade enzimática e de transporte, porém, é necessária para a estabilização da subunidade α na membrana plasmática, além de contribuir

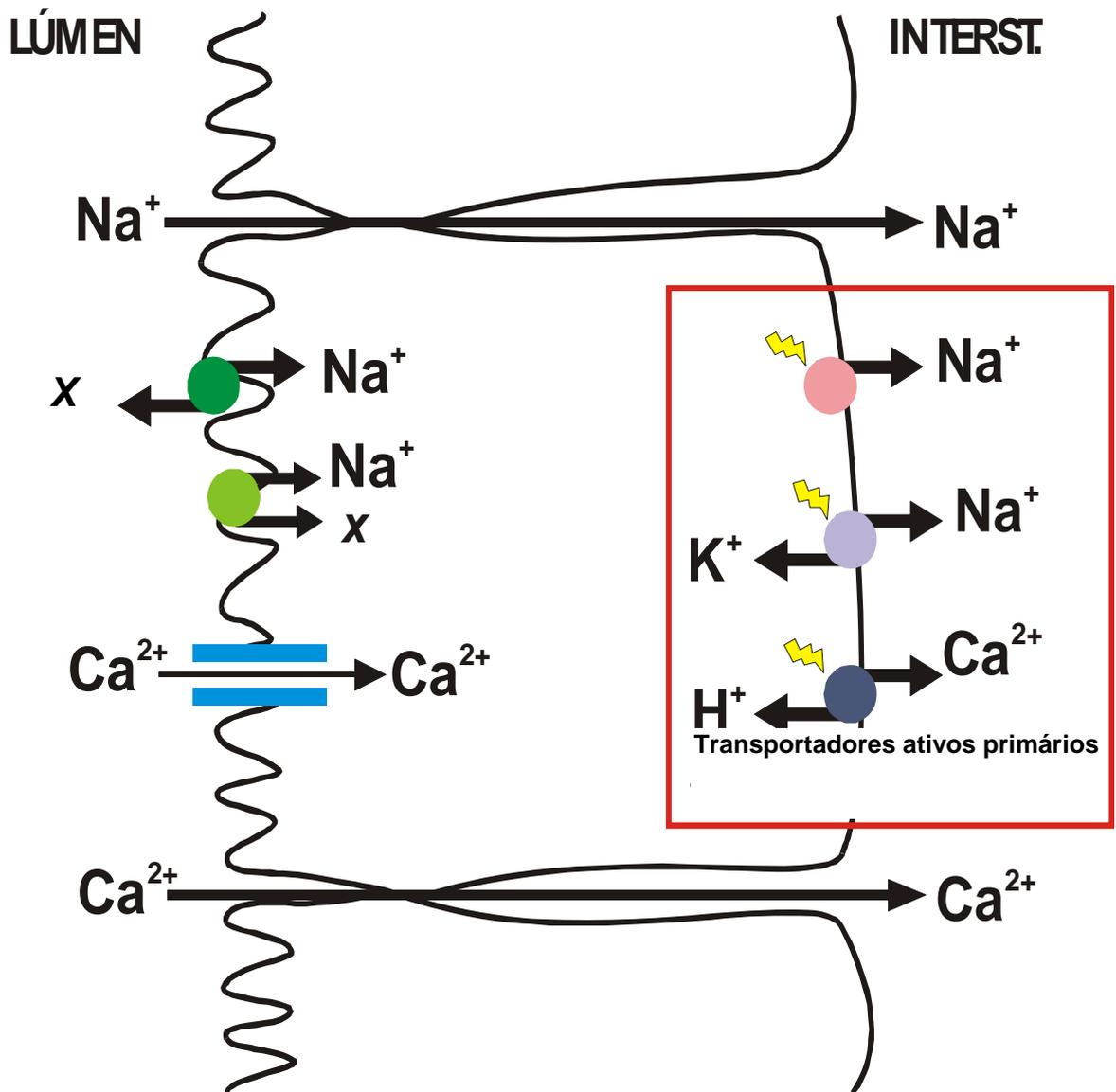


Figura 3: Diferenças morfológicas e funcionais entre as membranas apical e basolateral de células epiteliais renais. Neste desenho simplificado do epitélio renal, é possível observar algumas das assimetrias entre as duas membranas das células, com destaque para os transportadores ativos primários presentes na membrana basolateral.

para o seu correto enovelamento e seu direcionamento ao retículo endoplasmático e membrana plasmática, sendo fundamental para o funcionamento da ATPase. Já a subunidade γ é uma cadeia de 53 aminoácidos e massa molecular de 10.000 Da, que não é fundamentalmente necessária para a atividade da Na^+K^+ -ATPase (Férraille e Doucet, 2001). Ela é, entretanto, abundantemente expressa nos rins e atua como regulador fino da atividade da ATPase expressa no tecido medular renal (Rivard *et al.*, 2005). A atividade da Na^+K^+ -ATPase nos rins é modulada por diversos fatores humorais envolvidos na regulação do volume de fluido extracelular. Esses fatores regulam a atividade desta bomba principalmente através da fosforilação de sua subunidade α por PKA e PKC, vias que envolvem a ativação de receptores acoplados à proteínas G que, por sua vez, ativam a adenilato ciclase e PLC, respectivamente (Férraille e Doucet, 2001). Além dos envolvidos na via de ativação da PKC, lipídios como o colesterol (componente de membranas plasmáticas) e a fosfatidilcolina interagem com os segmentos transmembrana da Na^+K^+ -ATPase e, provavelmente, também da Na^+ -ATPase, aumentando a atividade destas bombas (Cornelius, 2001; 2008; Cornelius *et al.*, 2003).

A Na^+ -ATPase, considerada a segunda bomba de Na^+ , é responsável pelo ajuste fino da reabsorção renal deste íon. Postula-se que a reabsorção desta bomba corresponda à cerca de 10 % do transporte mediado pela Na^+K^+ -ATPase (Provérbio *et al.*, 1989). Este transportador se caracteriza por transportar íons Na^+ às custas da hidrólise de ATP, na ausência de K^+ , e por ser insensível à ouabaína, porém sensível ao furosemide e ácido etacrínico (Caruso-Neves *et al.*, 1998; 2002). Até o momento a Na^+ -ATPase não foi isolada e cristalizada em mamíferos, porém, acredita-se que sua estrutura seja semelhante às das demais P-ATPases¹ transportadoras de íons, e que tenha peso molecular aproximado de 100 kDa (Marin *et al.*, 1999; de Souza *et al.*, 2007). Apesar de seus sítios de fosforilação por proteínas

¹ P-ATPases são enzimas, encontradas em células eucarióticas e procarióticas, envolvidas no transporte ativo de cátions através de membranas biológicas. Possuem uma estrutura com dez segmentos transmembrana, e formam um intermediário fosforilado durante seu ciclo catalítico (Muller *et al.*, 1995).

cinases e de ligação a lipídios ainda não serem conhecidos, já foi demonstrado que a Na^+ -ATPase é regulada por sistemas de sinalização celular que envolvem lipídios bioativos, cinases, hormônios e autacóides (Caruso-Neves *et al.*, 2000; 2003; Rangel *et al.*, 2001; Wengert *et al.*, 2007; Cabral, 2008; Lara *et al.*, 2008; Líbano-Soares *et al.*, 2008).

Muitos desses sistemas de sinalização envolvem oscilações temporais (picos) e espaciais (ondas) na concentração intracelular de Ca^{2+} na propagação de suas vias, como, por exemplo, para a ativação da PKC (Alberts *et al.*, 2007). Devido a grande importância do Ca^{2+} para as células, incluindo as renais, outro importante transportador ativo primário presente na membrana basolateral das células tubulares é a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (PMCA). Este transportador é essencial no ajuste fino da concentração intracelular de Ca^{2+} e, desta maneira, modula eventos que dependem da mobilização intracelular deste íon. A PMCA, amplamente expressa em células eucarióticas, também é uma P-ATPase, possui cerca de 140 kDa de peso molecular, é sensível ao vanadato (inibidor de todas as P-ATPases), e bombeia o Ca^{2+} para o meio extracelular em troca de um H^+ , também às custas da hidrólise de ATP (Carafoli, 1991; Strehler e Zacharias, 2001; Zylinska *et al.*, 2000). Esta ATPase é alvo de hormônios, autacóides e lipídios bioativos, que modulam o transporte Na^+ e água através de vias sinalizadoras dependentes de Ca^{2+} , e, portanto, possui diversos sítios de regulação. Muitos estudos já demonstraram diferentes níveis de regulação desta ATPase por Cer, PKA, PKC, angiotensina II e seu metabólito 3-4, entre outros (Valverde *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2007; Strehler *et al.*, 2007; Axelband, 2008).

Conforme descrito, o funcionamento adequado dos diferentes transportadores ativos primários presentes no epitélio renal, assim como toda a rede regulatória que modula a atividade desses transportadores, é fundamental para a fisiologia renal, e, conseqüentemente, para a homeostasia corporal. Dessa maneira, fica claro que a interação entre sistemas de transporte e vias de sinalização celular deve ser rigorosa e que o desbalanço na regulação

destes sistemas de transporte pode ocasionar diferentes patologias. Já foi demonstrado que alterações na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ podem ser a base de diferentes doenças, como a hipertensão arterial, e também complicações renais derivadas do diabetes (de Ferrari *et al.*, 2003; Vague *et al.*, 2004; da Silva, 2007). Também tem sido postulado que alguns distúrbios fisiopatológicos acarretam desregulação de vias de sinalização celular em rins.

1.2.2 Doenças renais e epidemiologia

Os rins possuem grande capacidade funcional de reserva. Isto pode ser avaliado ao observarmos que pessoas com somente um rim possuem função renal perfeitamente normal, que prejuízos moderados nos processos de filtração glomerular e reabsorção tubular muitas vezes não são detectados por exames clínicos ou laboratoriais, e ainda, que, entre os pacientes renais crônicos, os que são encaminhados para terapia renal substitutiva são aqueles com ritmo de filtração glomerular inferior a 12 % do normal (Seldin e Giebisch, 1985). Ainda assim, o rim é um órgão bastante vulnerável. O intenso fluxo sanguíneo renal (FSR) confere contínua exposição do rim a substâncias tóxicas presentes na circulação sistêmica (como medicamentos, contrastes, entre outros) que podem levar a infecções e reações imunitárias diversas. Também a hipóxia, causada por acentuada diminuição do FSR, devido a alterações hemodinâmicas causadas por hemorragia ou trauma, é um fator comum que pode levar à lesão renal (Daemen *et al.*, 2002).

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada por ser reversível, acarretando em transitória perda da função renal. De acordo com o critério RIFLE (*Risc Injury Failure Loss and End-Stage Kidney Disease*), proposto em 2003 pelo grupo *Acute Dialysis Quality Initiative*, a LRA pode ser classificada em três estágios de severidade progressiva (risco, lesão e insuficiência) e dois estágios conseqüentes (perda da função e estágio terminal da doença renal), avaliados de acordo com parâmetros de ritmo de filtração glomerular e volume de

excreção urinária (Bellomo, 2004). Já a doença renal crônica (DRC), segundo o *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*, consiste em lesão renal com perda progressiva e irreversível da função dos rins, ou ritmo de filtração glomerular abaixo dos 60 ml/min/1,73 m², por três ou mais meses, com ou sem lesão renal evidente, independente da causa (Zhang e Rothenbacher, 2008). A DRC possui seis estágios de acordo com o ritmo de filtração glomerular, classificando desde grupos de risco para DRC sem lesão (estágio 0) até a insuficiência renal terminal ou dialítica (estágio 5) (Romão Junior, 2004).

Atualmente as doenças renais constituem um problema de saúde pública mundial. Em um estudo conduzido por Nash e colaboradores (2002), foi demonstrado que no ano de 1996 aproximadamente 7,2 % dos pacientes hospitalizados sofreram algum episódio de lesão renal aguda. Mais recentemente Uchino e colaboradores (2006), utilizando o critério de classificação RIFLE, relataram que esse número chega a 18 %. Hoste e Kellum (2006) argumentam que esse aumento se deve a diferentes históricos e/ou comorbidades entre os pacientes dos dois estudos, já que a sensibilidade dos critérios utilizados era semelhante. Outro estudo, realizado por Hoste e Schurgers (2008), demonstrou que entre os pacientes acometidos por LRA, 55,6 % dos classificados como risco progrediram para lesão ou insuficiência, e 36,8 % dos classificados inicialmente como lesão progrediram para insuficiência renal aguda (de acordo com o critério RIFLE). E, apesar de alguns estudos relatarem que o prognóstico desses pacientes vem melhorando (Waikar *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2006), a incidência de insuficiência renal aguda tem aumentado 11 % ao ano e, desses, aproximadamente 13 % persistem com estágio terminal de doença renal com indicação para terapia renal substitutiva mesmo após receberem alta hospitalar (Hoste e Schurgers, 2008).

Os números referentes a DRC são igualmente preocupantes. Em um abrangente estudo realizado por Coresh e colaboradores (2007) foi observado que a prevalência da DRC nos Estados Unidos é alta e que tem aumentado ainda mais com o passar dos anos – de 10 % para

13 %, nos períodos de 1988-1994 e 1999-2004, respectivamente – taxas consideradas epidêmicas. Valor semelhante foi encontrado em Groningen, na Holanda, em que 12 % da população adulta apresentou algum estágio de lesão renal (de Zeeuw *et al.*, 2005). No Brasil, a prevalência não parece ser menor. Apesar de faltarem dados sobre as taxas de portadores de DRC em seus estágios iniciais, é possível fazer uma estimativa a partir de dados norte-americanos que sugerem que existiriam aproximadamente 20 a 25 pacientes com algum grau de disfunção renal para cada paciente mantido em programa de diálise crônica (Romão Junior, 2004). Dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) indicam que, em janeiro de 2007, havia 73.605 pacientes com estágio terminal de DRC mantidos sob diálise e que este número vem crescendo em torno de 8,1 % a cada ano (variação estimada tomando como base os anos de 2004 – 2007) (SBN, 2008).

Este quadro representa sério motivo de preocupação para as políticas de saúde pública, pois além do alto custo das terapias renais substitutivas financiadas pelo Governo Federal desde 1975, a DRC aumenta a taxa de inatividade e mortalidade dos pacientes. No Brasil, a média de custo anual, incluindo tratamentos ambulatoriais e admissões hospitalares, por paciente com estágio terminal de DRC mantido sob hemodiálise chega a US\$ 7.980, na rede pública, e US\$ 13.428, na rede privada (Sesso *et al.*, 2007); sendo que 94 % dos custos dos pacientes são financiados pelo governo (SBN, 2008). A hemodiálise apresenta outras questões desfavoráveis, que englobam desde o acesso às unidades de tratamento, frequência semanal e duração das sessões, até a morbidade e desgaste físico devido à agressividade do tratamento. Apesar disso a hemodiálise continua sendo o principal tratamento adotado (90,8 % dos pacientes) em comparação às duas únicas alternativas, que seriam a diálise peritoneal (9,2 % dos pacientes) (SBN, 2008) e o transplante renal, que também apresenta suas limitações, como compatibilidade de doador e disponibilidade de órgãos.

A crescente incidência da DRC pode ser explicada por uma mudança em sua patogênese (Zhang e Rothenbacher, 2008). Hoje a hipertensão e o diabetes (I e II) são considerados as principais causas da DRC (Coresh *et al.*, 2007), que antes era proveniente primariamente de infecções como a glomerulonefrite. Com isso, também a progressão da DRC se alterou, em vez de evoluir rapidamente para os estágios terminais, os pacientes progredem mais lentamente. Porém, apesar do estágio terminal da DRC ser seu resultado mais proeminente, as doenças cardiovasculares associadas à DRC são responsáveis pelas altas taxas de mortalidade antes mesmo que os pacientes atinjam o estágio terminal (Remuzzi *et al.*, 2006). Desta forma, esta é mais uma justificativa para que novas terapias, visando à regressão ou mesmo cura da DRC, sejam propostas.

Nas últimas décadas, diversas foram as descobertas relacionadas aos eventos celulares e moleculares responsáveis pela regeneração do tecido renal, o que antes parecia impossível, dada a diversidade de células terminalmente diferenciadas que compõem o parênquima renal e a baixa taxa de reposição das mesmas. Entretanto, ao mesmo tempo em que foi relatado potencial regenerativo para diferentes estruturas do néfron (túbulo e glomérulo), foi observado que, independente da causa primária da lesão renal, sua progressão para doença crônica segue mecanismos comuns e costuma ser consequência de um desbalanço entre o dano inicial e seus mecanismos de reparo (revisado por Rookmaaker *et al.*, 2004). Este desbalanço pode ocorrer tanto na fase inicial do reparo, em que citocinas e células do sistema imune, recrutadas para contrapor a injúria, acabam agravando a lesão (Daemen *et al.*, 2002); como também, numa fase mais avançada do processo regenerativo, em que, depois de removida a causa inicial da injúria, a sobrecarga hemodinâmica sofrida pelos néfrons ainda funcionais para compensar os néfrons perdidos desencadeia processos de cicatrização glomerular que acarretam a perda dos néfrons restantes (Hostetter *et al.*, 1981; Brenner, 2002).

Os tratamentos disponíveis até o momento não são capazes de reverter o processo de lesão ou restaurar a função renal, daí a crescente busca por novas terapias regenerativas e/ou estratégias que possam elevar a capacidade intrínseca de o órgão regenerar-se. Neste cenário, as terapias celulares se tornam uma promissora alternativa e são grandes os investimentos em pesquisas que investiguem a possibilidade do uso de células-tronco.

1.3 Células-tronco

Por definição, células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de se replicar indefinidamente, produzindo uma cópia idêntica a si mesma e outra com habilidade de se especializar, podendo dar origem a qualquer tipo celular do organismo (NIH, 2008). Dessa maneira, o termo ‘células-tronco’ engloba diversas populações de células distintas, classificadas de acordo com sua capacidade ou potencial de diferenciação. As totipotentes podem dar origem a células totalmente diferenciadas provenientes das três camadas germinativas (mesoderma, endoderma e ectoderma) e também células extra-embrionárias, como as células da placenta e do cordão umbilical. Nesta classificação encontramos o zigoto e as descendentes das primeiras divisões celulares (Anglani *et al.*, 2004; Brodie e Humes, 2005; NIH, 2008).

As células pluripotentes são aquelas que podem se diferenciar em qualquer tipo celular das três camadas germinativas; são as células que compõem a massa interna do blastocisto. Devido a sua existência somente no embrião, também são conhecidas como células-tronco embrionárias (ESC). Essas são as células mais ‘primitivas’ com possível aplicação terapêutica e, inicialmente, as mais atrativas à manipulação em laboratório, dado seu potencial de diferenciação. Em contrapartida, são as que apresentam maiores desafios técnicos (como manter a ESC indiferenciada e diferenciá-la para a célula de interesse), sem esquecer dos desafios políticos e éticos (Anglani *et al.*, 2004; Brodie e Humes, 2005; NIH, 2008).

As células-tronco multipotentes têm potencial de diferenciação mais restrito. Em princípio, seriam capazes de originar diferentes células especializadas apenas do próprio tecido onde residem. Por persistirem em tecidos do organismo adulto, também são conhecidas como células-tronco adultas (Anglani *et al.*, 2004; Brodie e Humes, 2005; NIH, 2008). Estas células se diferenciam das células progenitoras ou precursoras por serem indiferenciadas e em suas divisões darem origem a uma cópia idêntica a si mesma e outra célula especializada qualquer do mesmo tecido, enquanto as progenitoras são células comprometidas (parcialmente diferenciadas) que dão origem a duas células especializadas diferentes (Anglani *et al.*, 2004; NIH, 2008).

Já foram descritas populações de células-tronco adultas em diversos tecidos, como medula óssea, cérebro, sistema nervoso periférico, músculo esquelético, rim e pele. Essas células seriam responsáveis pela renovação natural do próprio tecido e/ou recuperação após trauma ou doença. Entretanto, estas ganharam grande destaque devido à observação de que são capazes de se diferenciar em células de diferentes linhagens, fenômeno que vai de encontro ao conceito original de células multipotentes, denominado transdiferenciação ou plasticidade².

Diversos estudos demonstraram que células-tronco provenientes da medula óssea contribuem para a recuperação de tecidos periféricos de mesma origem germinativa (mesoderma) como músculo esquelético (Ferrari *et al.*, 1998), músculo cardíaco (Orlic *et al.*, 2001) e fígado (Theisse *et al.*, 2000) e, também, o que seria menos esperado, tecidos de camada germinativa diferente, como no caso do tecido neural proveniente do ectoderma (Brazelton *et al.*, 2000). O contrário também foi demonstrado ser possível, células-tronco neurais deram origem a células sangüíneas, inclusive células mielóides, linfóides e precursoras hematopoiéticas (Bjornson *et al.*, 1998). Essa plasticidade das células neurais foi

² Capacidade das células-tronco adultas de um determinado tecido gerar células especializadas de outro tecido da mesma camada germinativa ou não.

confirmada por Clarke e colaboradores (2000), que demonstraram que, retiradas do cérebro de camundongos, elas contribuíam para a formação de pintos quiméricos e embriões de camundongos, podendo dar origem a células de todas as camadas germinativas. Porém, entre as células-tronco adultas, as provenientes da medula óssea receberam maior atenção, principalmente devido à facilidade de acesso e, conseqüentemente, maior probabilidade de uso terapêutico.

Entre as células-tronco da medula óssea, encontram-se as hematopoiéticas (HSC), responsáveis pela produção de todas as células sanguíneas, e as mesenquimais (MSC), responsáveis pelo suporte e manutenção das HSC, e, também, pela produção das células estromais (condrócitos, osteoblastos, adipócitos), fibroblastos, células endoteliais e miócitos (como revisado em Yin e Li, 2006).

Entre os tecidos não hematopoiéticos, possivelmente beneficiados pela ação das células-tronco de medula óssea, encontram-se o rim. Neste órgão, as primeiras pesquisas tiveram como objetivo investigar se as células da medula óssea contribuíam para a renovação fisiológica e/ou patológica de células do parênquima renal. Estudos utilizando animais com medula óssea marcada (GFP e cromossomo Y) demonstraram que ambos os processos ocorriam (Ito *et al.*, 2001; Poulsom *et al.*, 2001). Também em humanos, a análise, por biópsia, de rins de pacientes homens transplantados com órgão de uma doadora mulher revelou que havia células tubulares que continham o cromossomo Y no órgão transplantado (Grimm *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2002; Poulsom *et al.*, 2001); mostrando que células extra-renais atuam na regeneração do órgão. Esses estudos demonstraram que as células extra-renais não eram apenas leucócitos e apresentavam marcação positiva característica de células epiteliais tubulares (Gupta *et al.*, 2002) e glomerulares (Poulsom *et al.*, 2001); ainda que em pequena quantidade (1-8 %) sugeriam que as células da medula óssea se transdiferenciavam em células renais.

Kale e colaboradores (2003) propuseram que o modelo de isquemia e reperfusão (I/R) renal poderia induzir maior recrutamento de células da medula óssea, como já havia sido demonstrado para o tecido cardíaco e da retina. De fato, após transplante de HSC de camundongos Rosa26 em animais irradiados, demonstraram que a I/R induz mobilização dessas células e repopulação, acima dos 20 %, do segmento S3 do túbulo renal. Já Morigi e colaboradores (2004) verificaram que, em um modelo de insuficiência renal induzida por cisplatina, a administração de MSC e não das HSC, acelerou a melhora funcional do rim, possivelmente através da transdiferenciação dessas em células tubulares. Os autores encontraram células derivadas das MSC, 4 e 29 dias após a injeção de cisplatina, totalmente diferenciadas em células tubulares. Entretanto, não descartam a possibilidade de ter ocorrido fusão entre as células injetadas e células do tecido lesionado.

A fusão seria outro mecanismo de ação das células-tronco, no qual estas se associariam às células do tecido alvo e as resgatariam do processo degenerativo (Masuya *et al.*, 2003). As técnicas utilizadas nos estudos citados acima não são capazes de distinguir o processo de transdiferenciação do de fusão. Porém, estudos nos tecidos hepático, cerebral, cardíaco e em músculo esquelético, utilizando marcadores genéticos e citogenéticos, demonstraram que células-tronco da medula óssea são capazes de se fundir às células desses tecidos (revisado por Ricardo e Deane, 2005). Já no rim, um estudo conduzido por Masuya e colaboradores (2003) sugere que a recuperação de células glomerulares por células provenientes da medula óssea não se deve ao processo de fusão.

O que muitos desses estudos não levaram em consideração foi a capacidade intrínseca do rim regenerar-se, principalmente após episódios de insuficiência renal aguda. O processo de recuperação do epitélio renal se caracteriza por intensa proliferação e migração de células pouco diferenciadas, com indícios de precursoras epiteliais, que se especializam após recobrirem a membrana basal exposta (Witzgall *et al.*, 1994). Recentemente Stokman e

colaboradores (2008) argumentaram que esse processo poderia sobrepor-se à necessidade do recrutamento de células extra-renais. Ainda assim, a origem dessas células epiteliais regenerativas não é bem conhecida. Entre as três possibilidades (transição epitélio-mesenquimal³ (TEM) das células epiteliais sobreviventes, migração de células-tronco provenientes da medula óssea ou recrutamento de células-tronco renais adultas), Duffield e colaboradores (2005) descartam o envolvimento de células extra-renais. Os autores demonstraram, por três métodos diferentes (marcação da medula óssea por β -Gal, cromossomo Y e EGFP) que, após lesão por I/R, as células da medula óssea não haviam se transdiferenciado em células tubulares, porém eram encontradas em pequenas quantidades no espaço peritubular expressando marcadores de leucócitos e células endoteliais (Duffield *et al.*, 2005). Um resultado interessante deu-se quando injetadas intravenosamente sem ablação da própria medula do rato, tanto as MSC quanto fibroblastos preveniram o agravamento da função renal, sugerindo um suporte parácrino dessas células para o tecido renal (Duffield *et al.*, 2005).

Lin e colaboradores (2005) também investigaram a origem das células responsáveis pela regeneração do epitélio renal e demonstraram que, apesar das células provenientes da medula óssea serem capazes de se transdiferenciar em células renais (tubulares e glomerulares), a regeneração do tecido se deve principalmente (89 %) às células epiteliais intra-renais, que se desdiferenciam (TEM), se proliferam, e se diferenciam novamente, recuperando o parênquima.

Até o momento, a maioria dos estudos que investigaram possíveis benefícios da utilização de células-tronco provenientes de medula óssea utilizaram modelos de lesão renal aguda. Foram obtidos diferentes e controversos resultados, apesar disso, muitos apontaram

³ Representa a plasticidade das células tubulares que são capazes de se desdiferenciar adquirindo fenótipo de células precursoras mesenquimais

uma melhora da função do órgão, independente do mecanismo de ação das células (Duffield *et al.*, 2005; Stokman *et al.*, 2005; Tögel *et al.*, 2005).

Stokman e colaboradores (2008) argumentaram que, nos modelos de lesão renal aguda, o processo de regeneração intrínseco do rim poderia se sobrepôr à necessidade de ação das células-tronco administradas. Com o intuito de diminuir a interferência do processo natural de regeneração tecidual, utilizaram um modelo de lesão renal crônica induzida por obstrução ureteral unilateral (OUU) irreversível. Através de injeções subcutâneas das citocinas SCF (*Stem Cell Factor*) e G-CSF (*Granulocyte-Cell Stimulating Factor*), aumentaram a mobilização das HSC a partir da medula óssea durante o período de obstrução. Os autores verificaram que houve migração dessas células para o rim obstruído, porém, ao analisar diferentes características morfológicas (simplificação do epitélio tubular, fibrose intersticial e atrofia de capilares peritubulares) na progressão da lesão renal, não obtiveram nenhuma diferença entre os grupos (tratado e não tratado com as citocinas) (Stokman *et al.*, 2008). Este parece ser o primeiro estudo a utilizar um modelo de lesão renal crônica na investigação do potencial regenerativo de células-tronco. Apesar dos resultados não terem sido promissores, ressaltam-se que ainda restam muitos aspectos a serem investigados, como, por exemplo, a administração de diferentes frações de células provenientes da medula óssea, diferentes métodos e tempos de administração das células, a análise de parâmetros funcionais do epitélio renal e alterações moleculares induzidas pelas células; entre outros.

Embasados pelo que foi exposto até o momento, decidiu-se investigar o potencial regenerativo de células mononucleares provenientes de medula óssea no modelo de lesão renal crônica induzida pela obstrução ureteral unilateral em ratos. Este modelo engloba aspectos da maioria das doenças renais e se caracteriza por desencadear o desenvolvimento de fibrose intersticial (Klahr e Morrissey, 2002).

Uma vez que a literatura aponta o suporte parácrino como mecanismo predominante de ação das células-tronco, devido à intensa migração dessas células, e melhora da função observada, sem transdiferenciação significativa; e que estudos em animais demonstraram que a administração de fatores do crescimento (HGF, EGF, IGF-1) acelera a recuperação do tecido renal (Hammerman, 1998), postulam-se que as células-tronco seriam um excelente meio de administração desses fatores ao tecido lesionado. Hipótese corroborada por Neuss e colaboradores (2004), que demonstraram que as MSC secretam fatores como VEGF e HGF.

Os fatores de crescimento agem através de receptores específicos presentes na membrana, que desencadeiam cascatas de sinalização intracelulares e podem levar a eventos como apoptose e proliferação. Sabem-se que as vias de sinalização envolvem moléculas bioativas que podem ser desde íons, como o Ca^{2+} por exemplo, até macromoléculas, como peptídeos e lipídios, sendo estes últimos as biomoléculas de interesse nesse estudo.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Analisar a atividade e expressão de ATPases transportadoras de íons e a geração de lipídios bioativos no epitélio renal, em modelo de lesão renal crônica em ratos induzida por obstrução ureteral unilateral, e também na tentativa de reparo do tecido por tratamento dos animais obstruídos com células mononucleares de medula óssea (CMO).

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a atividade das ATPases transportadoras de Na^+ (Na^+K^+ -ATPase e Na^+ -ATPase) e Ca^{2+} (PMCA), em rins de ratos controle (SHAM) e obstruídos (não tratados e tratados com CMO);
- 2) Avaliar a expressão das ATPases citadas acima;
- 3) Investigar a formação de lipídios bioativos (PtdIns(4)P, PA, S1P e C1P) nos grupos experimentais descritos;
- 4) Avaliar os níveis dos receptores LPA_1 nos grupos experimentais;
- 5) Estudar os itens acima citados nos rins contra-laterais de cada grupo experimental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

ATP, sacarose, ouabaína, Hepes, Tris, Bis-Tris Propano, PMSF, furosemide, inibidor de tripsina (tipo II-S), EDTA, EGTA foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Os solventes, usados para cromatografia (clorofórmio, acetona, ácido acético, ácido clorídrico, metanol) e as placas de TLC foram obtidas da Merck (Rio de Janeiro). Todos os outros reagentes foram do mais alto grau de pureza. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada pelo Sistema Milli-Q de resinas (Millipore Corp., Marlboroug, MA). [32 Pi] foi obtido do Instituto Brasileiro de Energia e Pesquisas Nucleares (IPEN, São Paulo, Brasil). DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Anticorpos contra Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (clone 5F10), obtido da Sigma (Saint Louis, Missouri); contra Na^{+} K^{+} -ATPase, da Santa Cruz Biotechnology (California); e contra o LPA_1 (anti-EDG₂), da Abcam (EUA). Membrana de nitrocelulose (Hybond) e kit ECLTM foram comprados da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, RU). Filme X-OmatTM foi obtido da Eastman Kodak Co. (Resende, Brasil), assim como as soluções de revelação e fixadores dos filmes de raios-X.

3.2 Animais e grupos experimentais

Para composição dos grupos experimentais utilizaram-se ratos da linhagem Wistar, machos adultos, pesando de 200-300 g. Durante todo o período (pré e pós-operatório) os ratos foram mantidos em gaiolas apropriadas sob temperatura constante (23 ± 2 °C), no ciclo padrão claro/escuro (12/12 h), com acesso irrestrito à água e ração. Os ratos foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: SHAM – falso operados – ratos submetidos ao estresse da cirurgia, porém não obstruídos. Os animais deste grupo tiveram 1 ml de sangue retirado e receberam 1 ml de solução salina pela veia cava inferior; OUU – grupo obstruído não tratado – esses ratos tiveram seu ureter esquerdo obstruído, conforme descrito a seguir nesta sessão.

Destes animais foi retirado 1 ml de sangue e aplicado 1 ml de solução salina pela veia cava inferior; e OUU+CMO – grupo obstruído tratado – os ratos tiveram seu ureter esquerdo obstruído. E da veia cava inferior foi retirado 1 ml de sangue e injetado 1 ml de solução salina contendo 10^7 células mononucleares de medula óssea (CMO).

Após a cirurgia os ratos foram acompanhados durante 14 dias, quando foram sacrificados para retirada dos rins. Todos os procedimentos envolvendo os animais estão de acordo com as recomendações sobre uso de animais em experimentação conforme *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (DHHS publicação nº 85-23 / NIH revista em 1996, *Office of Science and Health Reports*, Bethesda MD). Os protocolos, assim como o projeto no qual esta dissertação encontra-se inserida, foram aprovados pela Comissão de Avaliação da Utilização de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ.

3.3 Obtenção de células mononucleares de medula óssea

Para obtenção das células mononucleares de medula óssea os ratos foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical, após terem sido anestesiados através de inalação de éter etílico. Os animais foram mergulhados em álcool e, em uma cabine de segurança biológica com auxílio de uma pinça e tesoura, a pele do animal foi retirada da região do fêmur e tíbia. Da mesma maneira, os músculos em torno do fêmur e tíbia foram dissecados, cuidadosamente para não romper a artéria femural, evitando contaminações. Após exposição e limpeza desses ossos, eles foram removidos e suas epífises cortadas de maneira a possibilitar a entrada de uma agulha na cavidade medular. Utilizando seringa de 10 ml, DMEM com soro foi injetado na cavidade medular, lavando seu conteúdo e recolhendo-o em tubos de 15 ml. O conteúdo do tubo foi ressuspensão e homogeneizado com pipeta Pasteur e centrifugado a $250 \times g$ durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em DMEM sem soro (cerca de 4 ml). O precipitado ressuspensão foi depositado cuidadosamente na superfície de um

gradiente de Ficoll (4 ml) em um tubo Falcon e depois centrifugado a 400 x g por 30 min com aceleração inicial de 120 s e desaceleração final de 150 s. Este procedimento permite o isolamento das células mononucleares através de sua densidade no gradiente de Ficoll. Após a centrifugação, verifica-se a formação de um anel na região mediana do tubo, onde se concentram as células mononucleares que foram, então, coletadas com uma pipeta Pasteur e transferidas para um novo tubo de ensaio. Estas células foram ressuspensas em solução salina (BSS) [em 1 l, 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,012 g de CaCl₂, 0,154 g de MgSO₄, 0,15 g de KH₂PO₄, 0,39 g de NA₂HPO₄, 1,1 g de glicose, 2,5 ml de vermelho de fenol], na proporção de 1 volume de células para 5 volumes de BSS. O tubo foi, então, centrifugado (250 x g por 10 min) e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido 3 vezes para retirada do excesso de Ficoll®, que é tóxico para as células. Após a última centrifugação, as CMO foram ressuspensas em 1 ml de DMEM. Uma alíquota foi separada para se avaliar a viabilidade celular por teste de exclusão com Azul de Tripán. A diferença entre o número total de células e o número de células mortas será o número de células vivas numa dada amostra. Para quantificar o número de células viáveis, a suspensão celular foi agitada e transferida posteriormente para um pequeno tubo (0,1 ml). A este tubo foi adicionado o corante Azul de Tripán 0,2% (0,3 ml). Após misturar o conteúdo do tubo, este foi aplicado na câmara de Neubauer, para realizar contagens de densidade e viabilidade celulares. Frações de CMO apresentando mais de 10% de células mortas eram descartadas.

3.4 Cirurgia para obstrução ureteral unilateral (OUU)

Cada rato operado foi sedado por inalação de éter etílico. Depois foi realizada anestesia geral através de injeção intraperitoneal de solução apropriada (3:1 de cloridrato de Ketamina 5% e cloridrato de Xilazina 2 g). O volume dessa solução correspondia a duas vezes o valor do peso corporal do rato, em microlitros. O rato foi considerado anestesiado

quando não reagia ao se realizar apreensão de uma de suas patas traseiras. O rato foi fixado em uma prancha cirúrgica forrada com papel alumínio e preso com fita adesiva pelos membros. Foi realizada assepsia da região abdominal com detergente e gaze, e os pêlos raspados com uma lâmina. Através de uma incisão abdominal de aproximadamente 6 cm, a cavidade abdominal foi exposta (laparotomia). Após identificação e isolamento do ureter esquerdo foi feita uma ligadura, utilizando-se linha de algodão 3-0, em dois pontos separados por aproximadamente 0,5 cm, entre os quais o ureter foi seccionado. Depois a veia cava inferior foi exposta para retirada de 1 ml de sangue, utilizando uma seringa de insulina, e posterior infusão de BSS ou CMO, conforme o grupo experimental em questão. A sutura foi feita com pontos simples separados, afrontando as bordas (pele e músculo) em plano único, com linha de nylon 3-0.

O grupo falso operado (SHAM) passou pelos mesmos procedimentos descritos acima exceto pela realização da ligadura no ureter. Em vez disso, seu ureter foi exposto e a linha de algodão apenas passada por debaixo deste. A solução injetada na veia cava inferior foi o BSS.

3.5 Retirada e pesagem dos rins

14 dias após a cirurgia, os ratos foram pesados e, após serem sedados por inalação de éter, foram sacrificados por decapitação com guilhotina. Os rins foram imediatamente retirados e pesados.

O índice renal (IR) foi calculado através da razão entre o peso úmido do rim e o peso total do rato (em gramas).

$$\text{IR} = \frac{\text{Peso úmido do rim}^*}{\text{Peso total do rato}}$$

* Os rins obstruídos foram perfurados para retirada do excesso de urina acumulada.

3.6 Obtenção de homogenato purificado de córtex renal

Para preparação do homogenato purificado de córtex renal, imediatamente após a retirada e pesagem, os rins, mantidos em gelo e imersos em solução isotônica tamponada (solução 1) [sacarose 250 mM, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM e inibidor de tripsina 0,15 mg/ml], foram dissecados e com auxílio de um micrótomo Stadie-Riggs, foi retirada a porção mais externa do córtex (*córtex-corticis*), porção composta predominantemente por células de túbulos proximais. A esses cortes foram adicionados 3 ml de solução 1 e essa suspensão foi tratada em homogenizador de tecido tipo Potter com pistilo de teflon. Este homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 1500 x g, a 4 °C, em uma centrífuga Sorvall RC-5B, utilizando um rotor SS-34. Nesta centrifugação, as células não rompidas durante a homogenização, núcleos e citoesqueleto sedimentam e foram descartados após retirada do sobrenadante. Este sobrenadante constitui o homogenato purificado de córtex renal, o qual foi aliquoteado em tubos *Eppendorf* e armazenado a -20 °C. A concentração de proteínas de cada preparação foi determinada através de método colorimétrico modificado de Lowry *et al.* (1951), utilizando o reagente Folin-Fenol, SDS 2,5% e a albumina bovina como padrão.

3.7 Preparação do [γ - ^{32}P]ATP

A marcação de ATP com ^{32}Pi na posição γ foi realizada como descrito por Maia e colaboradores (1983). O procedimento consiste em promover a ligação do ^{32}Pi (ortofosfato radioativo) ao ADP, formando [γ - ^{32}P]ATP. Para isso, são realizadas *in vitro* duas reações sucessivas da via glicolítica: a de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, com fosforilação concomitante por ^{32}Pi no carbono 1 formando o 1,3-difosfoglicerato e, a de transferência da fosfirila marcada deste último composto para o ADP. As concentrações dos reagentes e

enzimas envolvidas (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato cinase) foram escolhidas para garantir o deslocamento das reações (que envolvem pequenas variações de ΔG°) no sentido favorável à formação do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

3.8 Atividade da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase

A atividade da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase foi determinada através da quantificação da diferença de fosfato inorgânico (Pi), liberado pela hidrólise de ATP, na presença e ausência de ouabaína (inibidor específico da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase). O homogenato purificado (0,1 mg/ml) foi pré-incubado com e sem ouabaína (2 mM) em um meio de reação [Bis-Tris-propano 50 mM (pH 7,4), EDTA 0,2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 120 mM] para, no caso dos tubos com ouabaína, assegurar completa inativação da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de ATP e KCl (5 mM e 24 mM, respectivamente) e após 10 minutos parada pela adição de carvão ativado em HCl 0,1 N (1,5 vezes o volume da reação). O fosfato inorgânico liberado durante as reações foi quantificado por método colorimétrico em um espectrofotômetro Hitachi (U-2001), de acordo com o método descrito em Cabral e colaboradores (2007).

3.9 Atividade da Na^+ -ATPase

A atividade da Na^+ -ATPase foi determinada através da quantificação da diferença de ^{32}Pi liberado pela hidrólise do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na presença e ausência de furosemida (inibidor da Na^+ -ATPase), como descrito em Caruso-Neves e colaboradores (2000). O homogenato purificado (0,2 mg/ml) foi pré-incubado com e sem furosemida (2 mM) em meio de reação [Hepes-Tris 20 mM (pH 7,0) suplementado com ouabaína 2 mM, MgCl_2 10 mM, NaCl 120 mM]. A reação foi iniciada pela adição de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 5 mM ($\approx 1,7 \times 10^6$ cpm/nmol de ATP) e parada, após 10 minutos, pela adição de carvão ativado em HCl a 0,1 N. O ^{32}Pi liberado no

meio foi quantificado empregando um contador de cintilação líquida Packard Tri-carb 2100TR.

3.10 Atividade da Ca^{2+} -ATPase

A atividade da Ca^{2+} -ATPase foi mensurada pela quantificação da diferença do ^{32}Pi liberado pela hidrólise do $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na presença e ausência de Ca^{2+} livre, conforme descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981). Frações do homogenato purificado foram incubadas por 10 min a 37 °C em sacarose 250 mM e ouabaína 0,1 mM, para garantir a inibição da $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase e minimizar a hidrólise de ATP independente de Ca^{2+} . Após a incubação, foram adicionadas a um meio de reação [Bis-tris-propano 50 mM, ATP 5 mM, MgCl_2 5 mM, NaN_3 10 mM, KCl 120 mM, EGTA, e Ca^{2+} livre], e a reação foi iniciada pela adição de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($2,0 \times 10^6$ cpm/ μmol de ATP) a 37 °C e parada após 20 min pela adição de carvão ativado em HCl 0,1 N. O ^{32}Pi liberado no meio de reação foi quantificado utilizando-se um contador de cintilação líquida Packard Tri-carb 2100TR.

3.11 Eletroforese e imunoeletotransferência

As proteínas presentes no homogenato purificado foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 10%), transferidas para membranas de nitrocelulose as quais, por sua vez, foram incubadas com anticorpos primários específicos (diluídos em TBS, 1:500) durante 1 hora. Após lavagem com solução tampão TBS-T [Tris 10 mM (pH 7,4), Tween 0,1 %], as membranas foram incubadas, por 1 hora, com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (diluídos em TBS, 1:2500) e novamente lavada com TBS. As reações finais foram detectados pelo sistema quimioluminescente ECL[®]. Todas as membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau* e posteriormente escaneadas para o controle de carregamento e identificação das proteínas de interesse, comparando-as ao padrão de peso

molecular utilizado. Os controles negativos não apresentaram qualquer reação positiva (dados não mostrados).

3.12 Ensaios de fosforilação, extração e identificação de lipídios

Os ensaios de fosforilação de lipídios basearam-se na incorporação de ^{32}P a lipídios da membrana, segundo Einicker-Lamas e colaboradores (2003). Para medida da atividade da DGK e da PI4-K foram quantificadas as incorporações de ^{32}P em PA e PtdIns(4)P, respectivamente. Numa breve descrição do método, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína do homogenato purificado foram incubados em 1 ml de meio de reação [Mes Tris 30 mM (pH 7,0), MgCl_2 5 mM, NaN_2 1 mM, ouabaína 1 mM, EGTA 500 μM]. Para medida da atividade da SK foi acrescentado 0,1 mM de Sph a esse meio de reação e realizada a quantificação de S1P. A reação foi iniciada com a adição de ATP ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 mM, 10^8 cpm/ml). Após 20 min de incubação a 37 °C, a reação foi parada pela adição de 4 ml de solução clorofórmio:metanol:HCl (67:33:0,03, v/v). A extração de lipídios foi realizada como descrito em Horowitz e Perlman (1987). Depois de parada a reação, foram adicionados 1 ml de HCl (0,6 M), agitado, e, após 10 min de centrifugação dos tubos (600 x g), a fase aquosa (superior) foi removida e à fase orgânica (inferior) adicionou-se 1 ml de clorofórmio:metanol:HCl 0,6N (3:48:47, v/v), agitou-se, e novamente os tubos foram centrifugados por 10 min e a fase aquosa (superior) foi descartada. A fase orgânica (inferior) foi evaporada em fluxo constante de N_2 , deixando os lipídios secos no tubo. Estes foram ressuspensos em 90 μl de clorofórmio:metanol:água (75:25:2, v/v), e 60 μl deste material aplicados em cromatoplasas de sílica gel. Os lipídios foram separados por cromatografia em camada fina (TLC) em corrida unidimensional, realizada no seguinte solvente clorofórmio:acetona:metanol: ácido acético:água (80:30:26:24:16, v/v em 264 ml).

Já os ensaios de fosforilação para quantificação da C1P, também medidos pela incorporação de ^{32}P , foram realizados conforme descrito por Bektas e colaboradores (2003). 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína do homogenato purificado foram incubados em 500 μl de meio de reação [Mops Tris 20 mM (pH 7,2), NaCl 50 mM, DTT 1 mM, EGTA 2 mM, CaCl_2 3 mM, MgCl_2 100 mM, NaF 10 mM]. A reação foi iniciada com a adição de ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 mM, 1.10^8 cpm/ml). Após 20 min de incubação a 37 °C, a reação foi parada com 8,6 ml de clorofórmio:metanol (1:1 v/v). Para a etapa de extração dos lipídios foi acrescentado 3,6 ml de Mops (20 mM, pH 7,2) – KCl (1 ml) e, após homogenização com pipeta Pasteur, os tubos foram centrifugados por 15 min à 600 x g . A fase aquosa (superior) foi descartada e, a fase orgânica evaporada em fluxo constante de N_2 . Os lipídios secos no tubo foram ressuspensos em 90 μl de clorofórmio:metanol:água (75:25:2, v/v), e 60 μl aplicados em cromatoplasmas de sílica gel. A corrida, também unidimensional, para separação dos lipídios, foi realizada em solvente contendo clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água (10:4:3:2:1, v/v) com volume final de 264 ml.

Após secagem das placas, as mesmas foram expostas à tela de *phosphor screen* e a imagem revelada no *Phosphor Imager Storm 860* (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech). As bandas correspondentes aos fosfolipídios de interesse foram marcadas nas placas, raspadas e colocadas em *vials* contendo solução cintiladora (POPOP 0,1 g/l em tolueno). A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 2100 TR).

3.13 Análise estatística

Foi utilizada análise de variância de duas entradas, e quando observada diferença significativa entre as médias, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Nesse estudo foi estabelecido um $P < 0,05$ como nível de significância. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros resultados obtidos se referem à análises macroscópicas dos animais e rins; entre essas, observamos variações no peso corporal e renal, e realizamos avaliação morfológica dos rins no momento da retirada desses. O peso corporal dos ratos, assim como o peso úmido dos rins contra-laterais, não apresentou variações significativas entre os grupos (Tabela 1). Já o peso dos rins operados, tratados (OUU+CMO) ou não (OUU), aumentou significativamente em comparação ao grupo controle ($1,76 \pm 0,37$ g e $1,71 \pm 0,30$ g *vs.* $0,94 \pm 0,14$ g, com $P < 0,001$, respectivamente). Ao relacionarmos esses valores ao peso corporal (índice renal), observamos que entre os rins do lado operado, o aumento do grupo OUU foi maior tanto em relação ao controle quanto ao OUU+CMO ($7,9 \pm 2,4$ *vs.* $3,9 \pm 0,3$ e $6,4 \pm 0,9$; $P < 0,001$) apesar deste último ainda apresentar índice maior comparado ao controle ($P < 0,001$) (Figura 4). Enquanto nos rins contra-laterais dos animais OUU houve uma pequena variação, que indica que o índice renal aumentou em relação aos controles ($5,4 \pm 0,7$ *vs.* $4,08 \pm 0,4$, respectivamente; $P < 0,05$). O aumento no peso úmido dos rins obstruídos e seus pares contra-laterais já foi demonstrado pela literatura (Beharrie *et al.*, 2004; Thornhill *et al.*, 2005), e serve de parâmetro para avaliarmos os efeitos do tratamento com CMO. Postula-se que no lado operado, o aumento resulta do intenso dano causado pela obstrução, enquanto no rim contra-lateral indica uma adaptação compensatória devido à maior sobrecarga imposta a este rim. Nossos resultados indicaram a ocorrência de ambos os processos (aumento no índice renal dos rins obstruído e contra-lateral) no grupo OUU, e que o tratamento com CMO foi capaz de atenuar o aumento do índice renal no rim obstruído, comparado ao grupo OUU ($P < 0,05$), além de prevenir o aumento no índice renal do rim contra-lateral, mostrando que as CMO, apesar de migrarem seletivamente para o rim obstruído, também influenciam processos adaptativos no rim contra-lateral, conforme será discutido mais adiante.

Tabela 1. Peso corporal total e peso renal úmido 14 dias após obstrução ureteral

Grupos	Peso (g)		
	Corporal total	Rim	
		contra-lateral	operado
Sham	240,2 ± 38,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
OOU	229,7 ± 41,2	1,2 ± 0,3	1,8 ± 0,4 ***
OOU+CMO	266,8 ± 41,8	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,3 ***

Valores expressos por média ± desvio padrão, n = 21

*** $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham

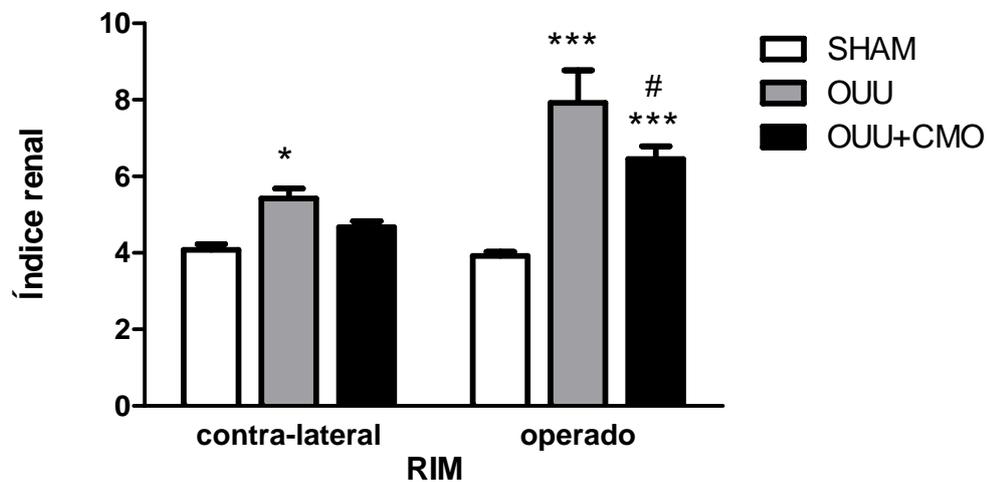


Figura 4. Índice renal. Razão entre o peso renal úmido e peso corporal total. Valores expressos por média ± erro padrão médio (n = 21), * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham, # $P < 0,05$ comparado ao grupo OOU.

A obstrução ureteral leva ao acúmulo de urina a partir do local da obstrução, o que provoca a dilatação do ureter, pelve e rim. 14 dias após a obstrução, os rins operados encontravam-se bastante dilatados em comparação aos controles (Figura 5a). A administração de CMO não alterou este padrão (Figura 5b), apesar de alguns rins tratados (8 % do total analisado) não edemaciarem tanto quanto os não tratados (Figura 5c). A diferença observada, entre os tamanhos dos rins, pode ser justificada por uma possível diferença entre os ritmos de filtração destes. A obstrução ureteral acarreta em constrição dos capilares renais, diminuindo o fluxo sanguíneo renal e o ritmo de filtração glomerular, fenômeno explicado pelo desbalanço entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores (Klahr e Morrissey, 2002). Já foi relatado que após 24 horas de obstrução ureteral a intensa vasoconstrição renal se deve a fatores como angiotensina II, tromboxano A₂, e hormônio antidiurético (Klahr e Morrissey, 2002). Acreditamos que a administração de CMO no grupo OUU+CMO pode ter alterado a liberação desses fatores nos rins obstruídos que não edemaciaram tanto, porém, não descartamos a variabilidade fisiológica entre os animais estudados devido ao baixo percentual observado.

O acúmulo de urina no rim obstruído leva também à atrofia do parênquima renal, processo denominado hidronefrose, o que observamos em todos os rins obstruídos, tratados ou não, inclusive nos que não haviam edemaciado tanto (Figura 5d). No modelo experimental usado, o caráter definitivo da obstrução dificulta uma possível alteração macroscópica no sentido de reparo, induzida pelo tratamento com CMO, já que o acúmulo de urina é inevitável, uma vez que a lesão primária (secção do ureter) permanece. Porém, dados recentes do nosso grupo demonstraram que o tratamento com CMO é capaz de promover eventos que retardam a progressão da lesão renal, como por exemplo o grupo OUU+CMO apresentou menor formação de fibrose, menos infiltração de macrófagos no rim obstruído, e

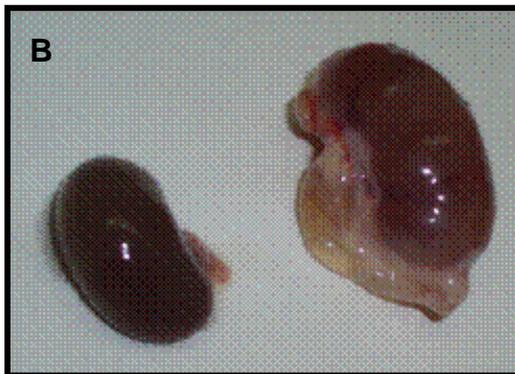


Figura 5. Fotos dos rins contra-lateral (esquerda) e obstruído (direita) 14 dias após obstrução. Em (A) rins de rato obstruído tratado com solução salina (OUU), (B e C) rins de rato obstruído tratado com CMO, e (D) rins de rato obstruído tratado com CMO cortados no plano frontal.

teve inibida a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), em comparação ao grupo obstruído tratado apenas com solução salina (Barreira, 2008; comunicação oral). Também foi observado que as CMO injetadas, marcadas com traçador *Far Red*, apesar de migrarem seletivamente para o rim obstruído (células detectadas 6 dias após administração pela veia cava inferior), não permaneciam no mesmo durante os 14 dias de obstrução (Barreira, 2008; comunicação oral). Dados da literatura confirmam que células da medula óssea (HSC, MSC, CMO) possuem grande afinidade por tecidos lesionados. Em diferentes modelos de lesão renal aguda, foi demonstrado que células-tronco (HSC, MSC, e CMO) injetadas migram seletivamente para o rim lesionado, permanecendo neste apenas temporariamente (de 2 a 7 dias) (Stokman *et al.*, 2005; Tögel *et al.*, 2005). Esse estabelecimento, mesmo que temporário, das células-tronco no tecido renal lesionado, poderia permitir que estas secretassem fatores ou sinalizassem às células do tecido a produção de moléculas bioativas, as quais, por sua vez, poderiam atuar no sentido de recuperação do tecido. Esta hipótese (de suporte parácrino) é mais aceita hoje em dia, visto que já foi demonstrada a recuperação do tecido renal em animais tratados com células da medula óssea, porém, sem transdiferenciação significativa destas em células renais (Duffield *et al.*, 2005; Stokman *et al.*, 2005; Tögel *et al.*, 2005).

Com base nestes dados, decidiu-se investigar se a migração das CMO para o tecido renal após OUU exerceria efeito sobre a atividade e expressão das principais ATPases transportadoras de íons, presentes no epitélio renal. A manutenção da atividade das ATPases, após o tratamento com CMO, poderia indicar uma preservação funcional do rim obstruído induzida por estas células. Trabalhamos com a hipótese de que as CMO injetadas, uma vez estabelecidas no tecido lesionado, secretariam fatores ou estimulariam a produção de moléculas bioativas que poderiam repercutir na preservação/reparo da função do rim, corroborando a hipótese de suporte parácrino (Tögel *et al.*, 2005). Conhecida a complexidade

das vias de sinalização envolvidas na regulação das ATPases e o papel regulador de alguns lipídios bioativos sobre estes transportadores, decidimos focalizar nossos estudos nesta classe de moléculas bioativas, e objetivamos correlacionar sua presença ou ausência com a atividade das ATPases e as alterações no tecido renal observadas recentemente por nosso grupo (Barreira, 2008; comunicação oral), induzidas pelo tratamento com as CMO.

Os primeiros experimentos visaram quantificar a atividade das ATPases transportadoras de Na^+ , as quais, são responsáveis pela reabsorção de Na^+ , formação e manutenção do seu gradiente eletroquímico, possibilitando a reabsorção de outros solutos pela membrana apical, e influenciando toda a função renal que repercute no organismo como um todo.

Entre as alterações funcionais e bioquímicas sofridas pelo rim após obstrução ureteral, a redução na atividade e expressão da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase foi previamente descrita (Brunskill *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). Nossos experimentos confirmaram a queda significativa na atividade deste transportador em frações de homogenato purificado do córtex renal de ratos OUU em comparação ao grupo controle ($26,5 \pm 4,4$ vs. $98,0 \pm 11,2$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $P < 0,001$) (Figura 6). O rim contra-lateral dos ratos obstruídos teve sua atividade $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPásica aumentada ($120,2 \pm 8,6$ vs. $73,5 \pm 5,0$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ no grupo controle, $P < 0,001$), sugerindo uma compensação na atividade da ATPase neste rim, provavelmente devido à maior carga de Na^+ recebida por este como resultado da obstrução no outro rim. A Figura 6 também mostra que o tratamento com CMO não preveniu, ou mesmo restaurou, a queda da atividade da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase no rim obstruído ($28,7 \pm 2,4$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $P < 0,001$). Porém, analisando o rim contra-lateral do grupo OUU+CMO observamos que a atividade $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPásica compensatória foi um pouco menor do que nos animais

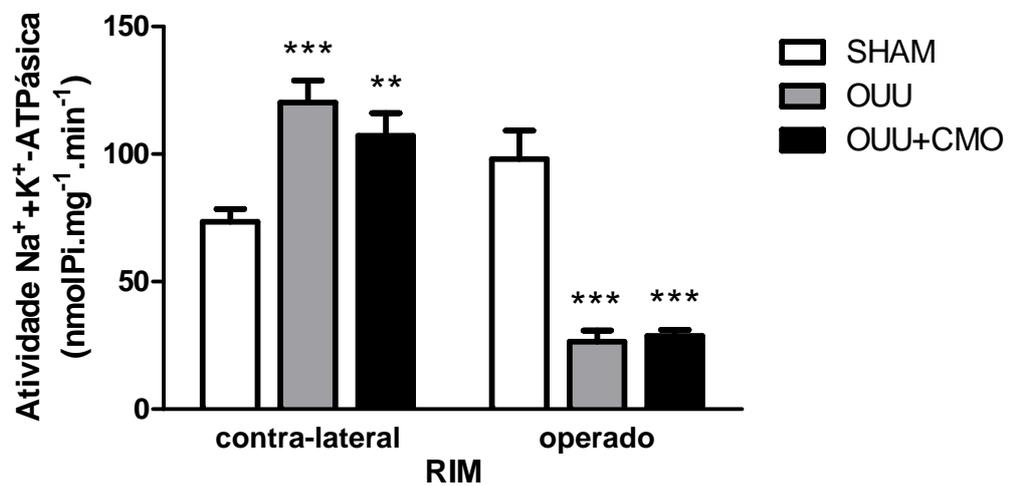


Figura 6. OUU reduz atividade da Na⁺+K⁺-ATPase e tratamento com CMO não impede este efeito. A atividade da Na⁺+K⁺-ATPase foi determinada conforme descrito em Material e Métodos. Valores expressos por média ± erro padrão médio (n = 25), ** *P* < 0,01 e *** *P* < 0,001 comparado ao grupo Sham.

OOU em relação ao grupo controle ($107,2 \pm 8,8 \text{ nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $P < 0,01$), sugerindo que, mesmo discreta, haveria alguma adaptação ou influência do tratamento com CMO nos rins obstruídos, que se refletiu na atividade $\text{Na}^{++} \text{K}^{+}$ -ATPásica do rim contra-lateral. Em um estudo conduzido por Hauser e colaboradores (2005) foi observado que os rins intactos, em dois modelos distintos de inativação do rim contra-lateral (nephrectomia e OOU), sofriam diferentes adaptações à maior sobrecarga recebida por estes. Enquanto no rim intacto, dos ratos que passaram por nephrectomia do rim contra-lateral, eram observados estímulos de hipertrofia causados por reguladores do ciclo celular (como ciclinas e supressão de inibidores do crescimento); no rim intacto, dos ratos que tiveram seu ureter contra-lateral obstruído, foram identificados estímulos que resultariam em maior ativação de diversos transportadores. Os autores sugeriram que poderia haver um *crosstalk* neuroendócrino entre os rins dos animais, ou ainda, que o rim obstruído, porém ainda perfundido, enviaria sinais através da corrente sanguínea que seriam percebidos pelo rim intacto, ativando seus transportadores (Hauser *et al.*, 2005). Em nosso modelo acreditamos que o tratamento com CMO pode ter influenciado o *crosstalk*, entre o rim contra-lateral e obstruído, ou ainda, alterado os sinais liberados pelo rim obstruído resultando nas diferentes adaptações entre os rins contra-laterais dos ratos OOU e OOU+CMO.

Dados da literatura mostram que alterações na composição do entorno lipídico influenciam a atividade da $\text{Na}^{++} \text{K}^{+}$ -ATPase (Brunskill *et al.*, 1991; Cornelius *et al.*, 2003; Cornelius, 2008), e que 24 horas de obstrução ureteral já são capazes de diminuir significativamente a quantidade de colesterol e de alguns fosfolipídios; o que poderia explicar, ao menos em parte, a queda na atividade da $\text{Na}^{++} \text{K}^{+}$ -ATPase (Morrissey *et al.*, 1986; Brunskill *et al.*, 1991). Outra explicação para o decréscimo da atividade $\text{Na}^{++} \text{K}^{+}$ -ATPásica observada seria a diminuição na quantidade de cópias do transportador, o que nos

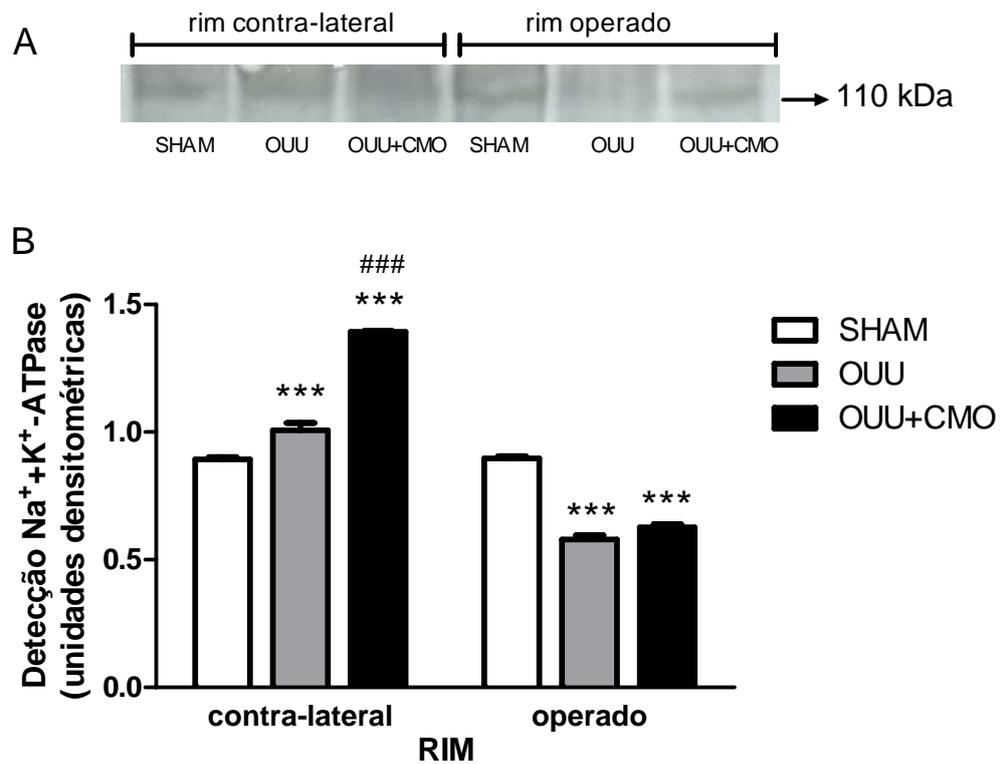


Figura 7. Expressão da $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Em (A) imunoeletroforese utilizando o anticorpo para subunidade $\alpha 1$ da $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Em (B) razão entre os valores obtidos pela densitometria das bandas visualizadas pelo controle de carregamento (vermelho de *Ponceau*). Valores expressos por média \pm erro padrão médio ($n = 3$), *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham, ### $P < 0,001$ comparado ao grupo OUU.

levou ao próximo passo, que foi analisar, por imunoblotting, a presença da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase nas frações utilizadas para quantificar sua atividade.

A eletroforese seguida de imunoeletrtransferência para a subunidade $\alpha 1^4$ da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase revelou que os rins obstruídos (OUU e OUU+CMO) apresentavam significativa redução na expressão do transportador em relação ao controle ($0,58 \pm 0,02$ e $0,63 \pm 0,01$ vs. $0,90 \pm 0,01$ unidades densitométricas, respectivamente, $P < 0,001$) (Figura 7). Enquanto no lado contra-lateral observamos uma compensação com maior expressão tanto no grupo OUU ($1,01 \pm 0,03$ vs. $0,89 \pm 0,01$ unidades densitométricas – SHAM, $P < 0,001$), quanto no OUU+CMO ($1,39 \pm 0,01$ unidades densitométricas, $P < 0,001$). A queda na expressão deste transportador, em frações de córtex e medula externa de rins obstruídos, já foi relatada (Li *et al.*, 2003) e está de acordo com nossos resultados. Porém, Li e colaboradores (2003) não observaram expressão compensatória nos rins contra-laterais, e ainda demonstraram que havia menor expressão da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase na medula interna desses rins, o que não foi avaliado neste trabalho. As variações na expressão da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase acompanharam as alterações na atividade do transportador (Figura 6), mostrando que a queda na atividade pode ser explicada pela menor expressão do transportador nos rins obstruídos e que a compensação no lado contra-lateral pode ser, ao menos em parte, devido a maior expressão da enzima nesses rins. O aumento de expressão da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase nos rins contra-laterais dos animais OUU+CMO muito superior ao aumento na atividade dessa bomba sugere um incorreto endereçamento da proteína ou, mesmo, degradação.

O segundo transportador de Na^+ avaliado foi a Na^+ -ATPase, responsável pelo ajuste fino da reabsorção de Na^+ . Nossos experimentos não identificaram alterações significativas na atividade desta ATPase entre os grupos avaliados ($43,2 \pm 8,3$, $56,8 \pm 9,9$ e $50,1 \pm 5,2$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ nos rins contra-laterais, e $48,9 \pm 8,5$, $60,0 \pm 17,6$ e $59,2 \pm 15,3$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1}$

⁴ Já foram descritas 4 isoformas para a subunidade α da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase, sendo que a $\alpha 1$ é a predominantemente expressa no epitélio renal (Féraille e Doucet, 2001).

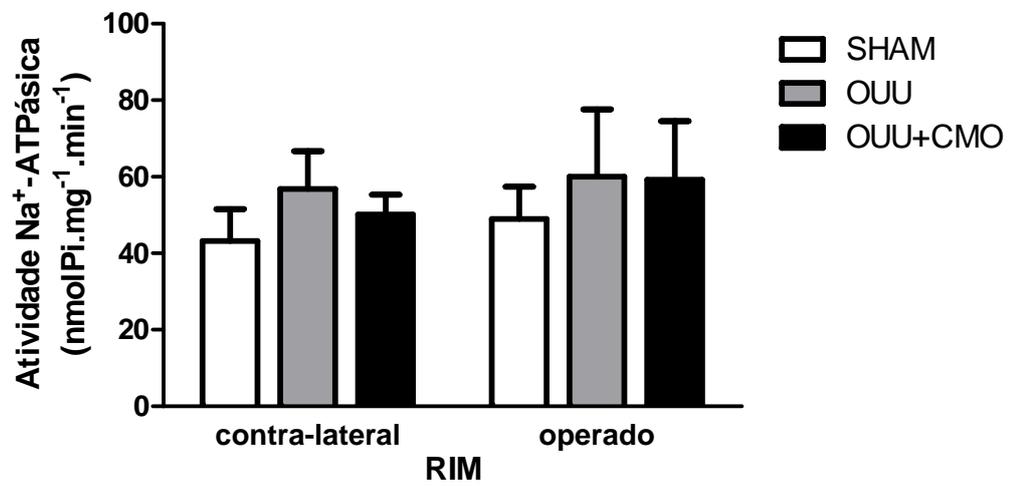


Figura 8. O UU e tratamento com CMO não influenciam atividade da Na⁺-ATPase. A atividade da Na⁺-ATPase foi determinada conforme descrito em Material e Métodos. [valores médios ± erros padrão médio (n = 21)].

.min⁻¹ nos rins operados, SHAM, OUU e OUU+CMO respectivamente), o que sugere uma menor susceptibilidade deste transportador ao mecanismo de lesão causado pela obstrução ureteral (Figura 8). Não foi possível avaliar a expressão da Na⁺-ATPase nas frações utilizadas para verificação da atividade, já que esta proteína ainda não foi isolada em mamíferos, e por isso não existe anticorpo para a mesma.

Outra ATPase transportadora de nosso interesse foi a Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática (PMCA), responsável pelo ajuste fino da concentração intracelular de Ca²⁺, um importante segundo mensageiro intracelular. Entretanto, por limitações da nossa amostra, não foi possível quantificar a atividade dessa enzima. A utilização de homogenato purificado, em vez de frações de membrana basolateral, provavelmente impediu a detecção da atividade da PMCA devido à baixa quantidade do transportador na preparação. O método utilizado, descrito na seção de Material e Métodos, é rotineiramente utilizado em nosso laboratório para quantificar a atividade da PMCA em membrana basolateral de rins de rato, ovelha e porco, consistindo, portanto, em método eficaz. Porém, nesse trabalho, como haviam poucos rins por preparação de homogenato (n =3) não foi possível purificar a fração de membrana basolateral. Devido a esta limitação, decidimos apenas avaliar a expressão da PMCA nas frações de homogenato purificado.

Na Figura 9 observamos claramente que o rim operado do grupo OUU+CMO apresentou níveis da PMCA semelhantes ao do grupo controle ($0,98 \pm 0,13$ e $1,13 \pm 0,06$ unidades densitométricas, respectivamente), e superior ao do grupo OUU ($0,66 \pm 0,14$ unidades densitométricas). Esta preservação nos níveis de expressão da PMCA se repetiu no rim contra-lateral, no qual foi observado que houve aumento na expressão deste transportador induzido pela obstrução no grupo OUU ($1,15 \pm 0,08$ unidades arbitrárias), e que o tratamento com CMO foi capaz de manter semelhantes os níveis entre os grupos OUU+CMO e controle ($0,89 \pm 0,06$ e $0,8 \pm 0,05$ unidades arbitrárias). Esta é a primeira vez que se avalia a expressão

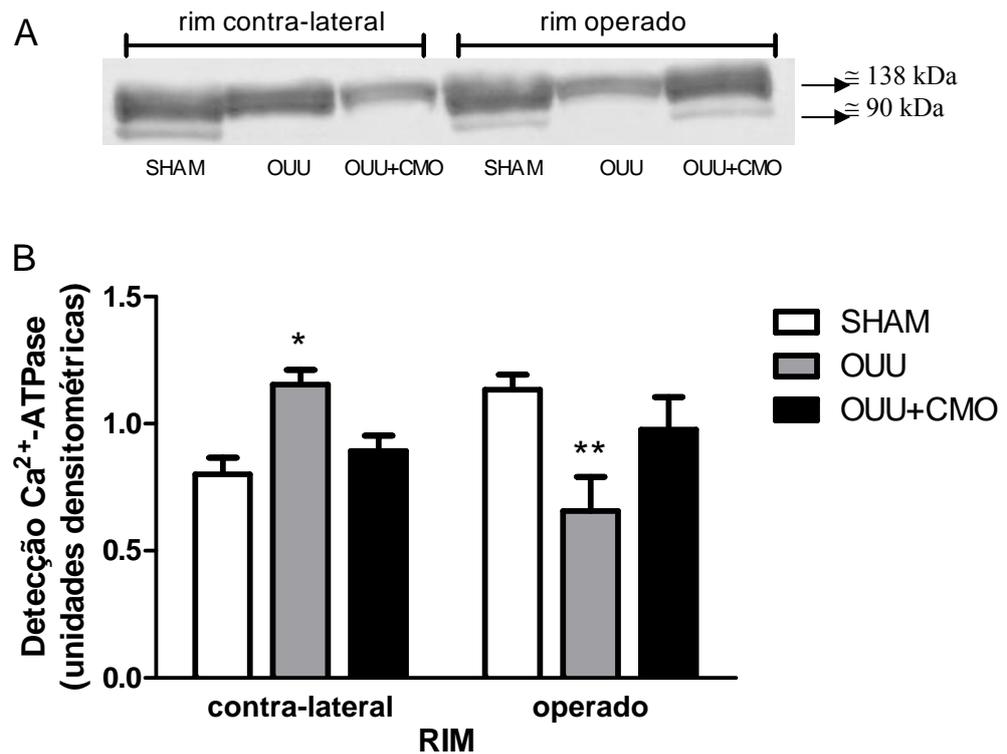


Figura 9. Expressão da Ca²⁺-ATPase (PMCA). Em (A) imunoelctrontransferência representativa, utilizando o anticorpo 5F10. Em (B) razão entre os valores obtidos pela densitometria, das bandas visualizadas, pelo controle de carregamento (vermelho de *Ponceau*). Valores expressos por média ± erro padrão médio (n = 3), * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Sham.

da PMCA em modelo de lesão renal crônica. A manutenção da expressão da PMCA a níveis controle indica uma importante ação das CMO na preservação funcional do tecido renal lesionado, uma vez que a PMCA por controlar a concentração intracelular de Ca^{2+} , é diretamente responsável por todos os eventos celulares dependentes de flutuações na concentração intracelular deste íon, principalmente o transporte iônico, base da fisiologia renal. Altos níveis de Ca^{2+} intracelular por tempo prolongado podem significar superativação de vias de sinalização, que poderiam causar a evolução da lesão renal e ainda culminar em apoptose celular. Experimentos futuros, com grupos de maior número de animais, permitirão a obtenção de frações purificadas de membranas basolaterais, e com isso, a medida da atividade da PMCA, de modo que possamos detectar não apenas a manutenção de sua expressão, como também, a preservação de sua atividade.

Conforme revisado na Introdução, vias de sinalização envolvendo fosfoinosítídeos influenciam a atividade dos transportadores iônicos avaliados, não só pela subsequente ativação de proteínas cinases, e nesta destacamos a via da PKC; mas também, pela interação direta do lipídio com o transportador, como no caso da ativação da PMCA pelo PtdIns(4)P (Guilherme *et al.*, 1998). Portanto, nesta parte do trabalho objetivamos avaliar a geração de PA e PtdIns(4)P, através de ensaios de fosforilação (conforme descrito em Material e Métodos).

Observamos a formação de PA a partir de DAG endógeno, e PtdIns(4)P a partir do PI, sob a ação da DGK e PtdIns-4K, respectivamente. Os rins operados, tanto OUU quanto OUU+CMO, apresentaram maior formação de PA em relação ao controle ($2,4 \pm 0,4$ e $2,4 \pm 0,3$ vs. $1,0 \pm 0,2$ pmol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente, $P < 0,001$) (Figura 10), o que podemos traduzir em maior disponibilidade de DAG nesses grupos em função da intensa atividade metabólica primariamente causada pela obstrução. Classicamente, a ativação de fosfolipases C (PLCs) promovem a clivagem do PtdIns(4,5) P_2 gerando IP_3 e DAG (Nishizuka, 1987).

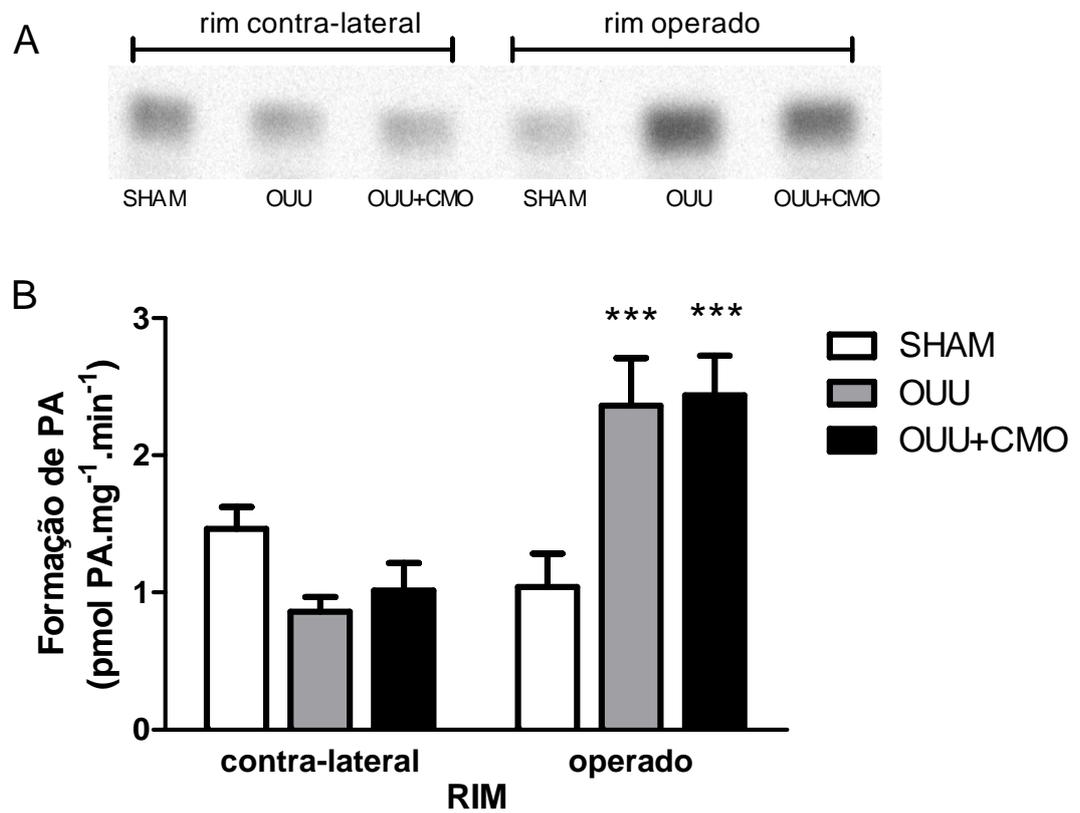


Figura 10. Aumento da formação de PA (ácido fosfatídico) induzido pela OUU. Em (A) imagem representativa de uma TLC em Phosphor Screen. Em (B) quantificação do ³²Pi nas bandas visualizadas, através de contador de cintilação líquida. Valores expressos por média ± erro padrão médio (n = 15), *** *P* < 0,001 comparado ao grupo Sham.

Sabe-se, também, que lesões intensificam a atividade de PLCs (Yanagisawa *et al.*, 1997; Cuzzo *et al.*, 2002), gerando assim mais DAG que é o substrato da DGK para formação de PA. No grupo OUU+CMO também era esperado um alto nível de PA, em função da própria lesão induzida pela obstrução, e mesmo pelo possível remodelamento estimulado pelo tratamento com CMO. O DAG é um lipídio bioativo que participa em diversas vias de sinalização desencadeadas através da ativação de PLCs, estas vias podem levar a respostas tão diversas quanto migração, proliferação, apoptose e diferenciação celular, entre outras (Dempsey *et al.*, 2000), sendo muitos destes eventos também fundamentais para o reparo tecidual. Ou seja, deste resultado podemos apenas inferir que o rim obstruído, nos dois grupos (OUU e OUU+CMO), apresenta intensa taxa metabólica. Porém, ressaltamos a possibilidade de que o tratamento com CMO altere os sinais aos quais o rim obstruído está exposto, influenciando vias que levariam a respostas celulares que participariam do remodelamento do tecido renal no sentido do reparo.

A formação de PtdIns(4)P não apresentou diferença significativa entre os grupos, apesar de ter sido observada uma tendência de aumento no grupo OUU, melhor visualizada quando os valores foram normalizados, tomando como referência o grupo controle, tanto no rim operado quanto no contra-lateral (Figura 11). Essa grande variação na formação do PtdIns(4)P pode ser devido a rápida metabolização desses lipídios. Realmente, o tecido renal possui um *turnover* de fosfoinosítídeos extremamente elevado. O que pode ser facilmente explicado pelo intenso transporte de íons, característico neste tecido, aliado à função desses fosfolipídios como moduladores de ATPases e de canais iônicos, presentes nas membranas apical e basolateral de células epiteliais renais (Balzer-Yost e Nofziger, 2005). A existência de vias de geração e integração do metabolismo desses lipídios bioativos, na membrana basolateral de túbulos renais, tem sido demonstrada por nosso grupo (Rangel *et al.*, 2001, 2005; Einicker-Lamas *et al.*, 2003; Nogaroli *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2007). Mais

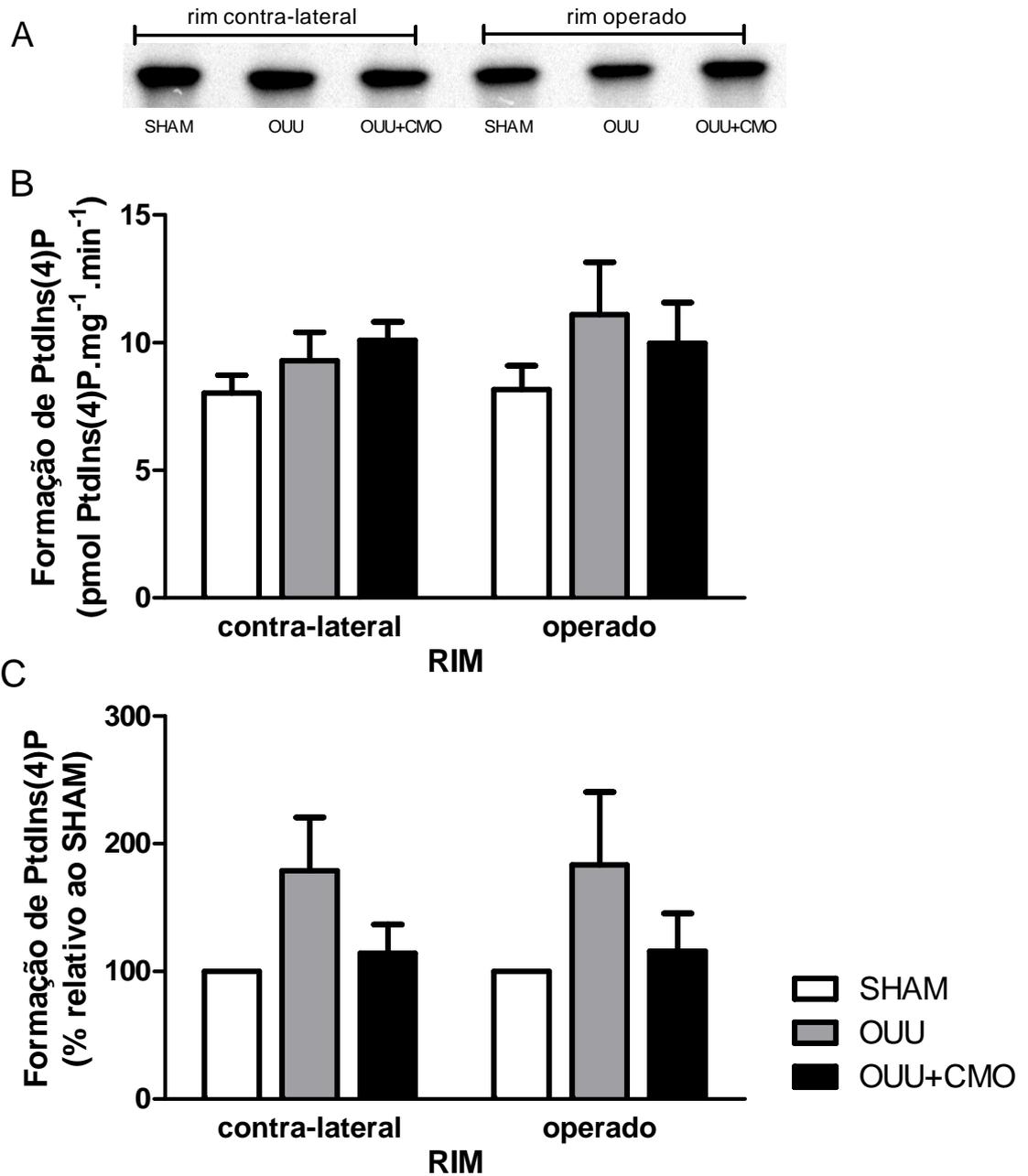


Figura 11. O UU aumenta variação na formação de PI(4)P (fosfatidilinositol-4-fosfato). Em (A) imagem representativa Phosphor Screen. Em (B) quantificação do PtdIns(4)P nas bandas visualizadas, através do ³²Pi em contador de cintilação líquida. Em (C) valores de B normalizados, tendo o grupo SHAM como referência. Valores expressos por média ± erro padrão médio (n = 15).

recentemente, vem sendo relatado o aumento da expressão da PtdIns-4K em rins lesionados por diferentes modelos de injúria (rim policístico e exposição à toxinas) (Cuozzo *et al.*, 2002; Aukema *et al.*, 2004), o que poderia justificar a maior formação de PtdIns(4)P nos rins obstruídos. A importância deste aumento na expressão da PtdIns-4K ainda não é conhecida, mas pode estar relacionada ao aumento do metabolismo renal.

Na segunda parte deste trabalho nos concentramos na geração de esfingolípídios bioativos nos rins obstruídos tratados e não tratados com CMO, acompanhando sua formação também no rim contra-lateral. Já foi mencionada a importância do balanço entre esses lípidios para o comportamento celular. Eventos como apoptose, proliferação, inflamação, e sobrevivência, entre outros, podem ser desencadeados dependendo da quantidade relativa de Sph, Cer, e seus derivados fosforilados. Todos esses eventos exercem papel no desenvolvimento da lesão, assim como no processo de regeneração tecidual.

Primeiramente, avaliamos a atividade da SK (esfingosina cinase), enzima responsável pela conversão da Sph (esfingosina), lípídio relacionado a indução de apoptose e inibição da proliferação celular, em S1P (esfingosina-1-fosfato), que tem como característica efeitos opostos a Sph, ou seja, inibe a apoptose e aumenta a proliferação celular (Iwata *et al.*, 1995). Os ensaios de fosforilação realizados permitiram demonstrar que nos rins obstruídos dos animais do grupo OUU+CMO a atividade da SK estava significativamente aumentada (Figura 12), pode-se observar a maior formação de S1P neste grupo ($52,2 \pm 7,6$ vs. $36,5 \pm 3,0$, no sham, e $34,7 \pm 6,2$ pmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹, no OUU, $P < 0,05$). Este resultado indica que as CMO podem exercer um efeito protetor sobre o tecido renal lesionado, aumentando, de maneira ainda não conhecida, a atividade da SK, e a formação de S1P.

A atividade da SK mostrou-se relevante no processo de reparo, dado que transformou um lípídio pró-apoptótico e anti-proliferativo em um lípídio anti-apoptótico e indutor de proliferação. Da mesma forma, a CerK converte Cer, um lípídio relacionado a apoptose, em

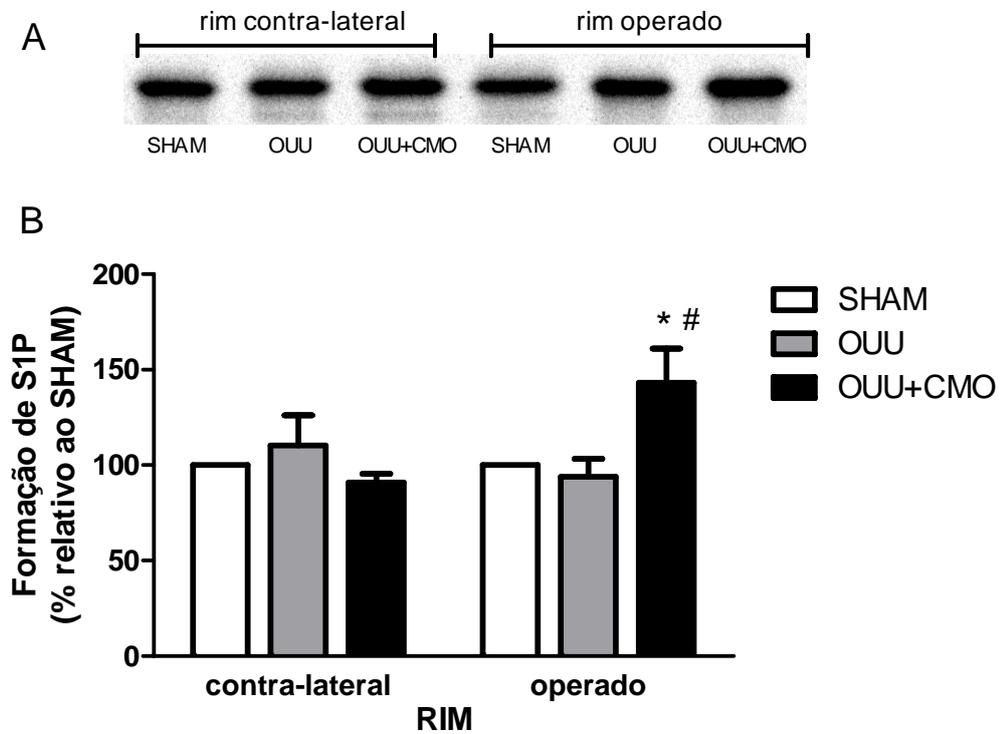


Figura 12. Maior atividade da SK em rins OUU tratados com CMO. Nesta figura é visualizada a formação de S1P a partir de Sph exógena. Em (A) imagem representativa Phosphor Screen. Em (B) quantificação da S1P nas bandas visualizadas, através do ^{32}Pi em contador de cintilação líquida. Valores expressos por média \pm erro padrão médio ($n = 9$), * $P < 0,05$ comparado ao grupo Sham, e # $P < 0,05$ comparado ao grupo OUU.

C1P, que possui atividade parecida a da S1P. Com base nisso, decidimos analisar os estoques de Cer endógena, através da quantificação de C1P (ceramida-1-fosfato), conforme descrito em Material e Métodos. Nossos resultados demonstram que o rim obstruído do grupo OUU apresentou maior formação de C1P em relação ao controle ($42,0 \pm 9,1$ vs. $22,7 \pm 6,8$ fmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹, $P < 0,05$), e que o tratamento com CMO foi capaz de prevenir parcialmente esse aumento ($30,4 \pm 7,0$ fmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹), indicando menor disponibilidade de Cer nesses rins, e, conseqüentemente, menor propensão à lesão (Figura 13). O acúmulo de Cer intracelular tem sido relacionado ao desenvolvimento e progressão de lesão tecidual em rins (Zager *et al.*, 1998; Ueda *et al.*, 1998; Zager, 2000). Zager (2000) ressalta que o aumento da Cer se deve não só à clivagem da SM, mas também pelo seu menor catabolismo. Em outro estudo, conduzido por Matsuda e colaboradores (2007) foi demonstrado que o acúmulo de Cer nos rins, devido à falha no seu processo de degradação, resultou em hidronefrose e esclerose renal. A ação da Cer parece ser lesão específica, podendo em alguns casos (citotoxicidade induzida por Fe) exacerbar, enquanto noutros (citotoxicidade por ácido araquidônico) atenuar o processo de injúria (Zager, 2000). Também foi demonstrado que não só o acúmulo de Cer, mas também, a depleção de SM (não avaliada neste estudo) é decisiva na progressão da lesão (Zager *et al.*, 1998; Zager, 2000).

Os resultados obtidos relativos à atividade da SK e disponibilidade de Cer endógena, além de indicar concordância entre os fenômenos observados, sugerem que o tratamento com CMO influenciou múltiplos níveis de regulação do metabolismo de esfingolípídios. Diferentes estudos já demonstraram que um agonista celular pode regular, coordenadamente, mais de uma enzima, direcionando seletivamente o sentido de vias específicas (Huwiler *et al.*, 1996; Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997; Harada-Shiba *et al.*, 1998). Por exemplo, Huwiler e colaboradores (1996) demonstraram que o óxido nítrico, simultaneamente à ativação de uma esfingomielinase, inibiu a ceramidase, resultando no acúmulo de Cer em células mesangiais.

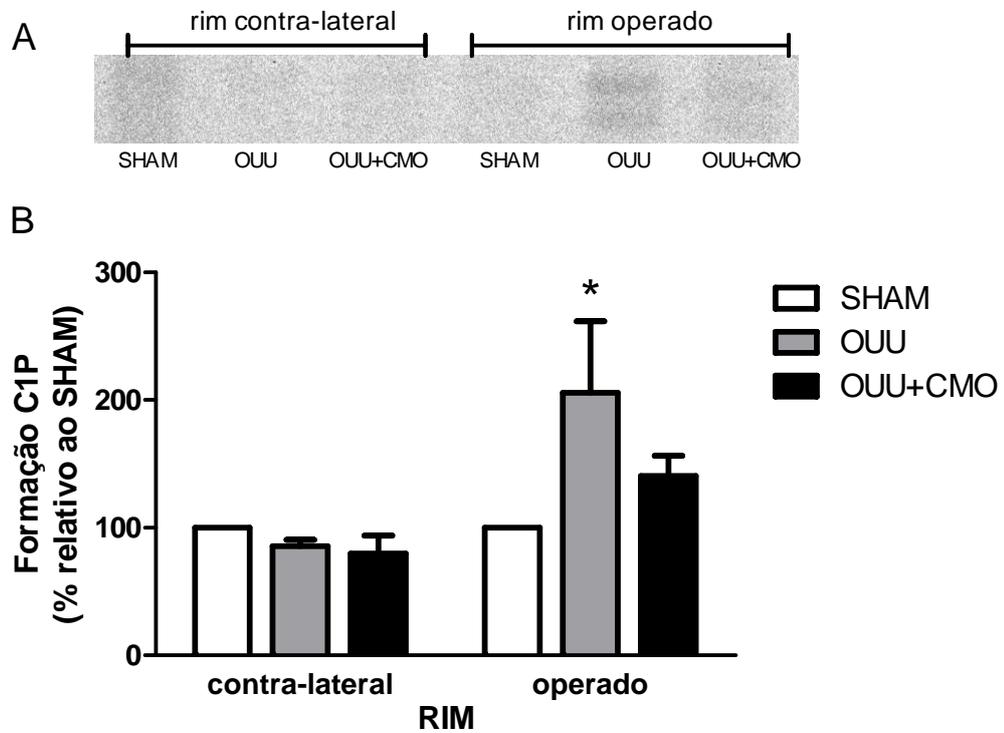


Figura 13. Maior formação de C1P em rins OUU é prevenida parcialmente pelo tratamento com CMO. Ensaio de fosforilação realizado conforme descrito em Material e Métodos. Em (A) imagem representativa Phosphor Screen. Em (B) quantificação da C1P nas bandas visualizadas, através do ^{32}P i em contador de cintilação líquida. Valores expressos por média \pm erro padrão médio ($n = 9$), * $P < 0,05$ comparado ao grupo Sham.

Em contrapartida, nessas mesmas células, o fator de necrose tumoral (TNF) resultou na ativação concomitante da esfingomielinase e ceramidase, fazendo com que a Cer formada fosse rapidamente convertida a Sph, e através da fosforilação desta, a morte celular era prevenida (Huwiler *et al.*, 1996).

Outro lipídio bioativo, envolvido na regulação do desenvolvimento e função de diversos sistemas fisiológicos, é o ácido lisofosfatídico (LPA). O LPA é um fosfolípido, presente naturalmente na circulação sanguínea, que possui diversas ações biológicas como sobrevivência, proliferação, migração, desdiferenciação, invasão de células tumorais, agregação celular, e, contração e relaxamento da musculatura lisa (Gardell *et al.*, 2006). O envolvimento do LPA em eventos de remodelamento tecidual tem sido observado em diferentes estudos. A ação benéfica deste lipídio já foi demonstrada em processos de cicatrização cutânea e intestinal, através de sua aplicação local (Sturm *et al.*, 1999; Balazs *et al.*, 2001). Ainda no epitélio intestinal, a administração oral do LPA, demonstrou ter efeito protetor contra apoptose induzida por radiação (Deng *et al.*, 2002). Já em um modelo de lesão renal, o LPA preveniu o desenvolvimento da lesão por inibição da apoptose e sistema complemento (de Vries *et al.*, 2003). Suas ações são mediadas por receptores específicos acoplados às proteínas G, inicialmente descritos como receptores EDG (Fukushima *et al.*, 2001). Até o momento já foram descritas 3 isoformas (LPA₁, LPA₂ e LPA₃) amplamente distribuídas pelo organismo humano, e todas expressas no tecido renal (Gardell *et al.*, 2006).

Mais recentemente estudos demonstraram que a sinalização do LPA através do seu receptor do tipo 1 (LPA₁) leva ao desenvolvimento e progressão de fibrose intersticial (Pradère *et al.*, 2007; Tager *et al.*, 2008), principal característica da doença renal crônica. Com base nestas informações, decidimos avaliar a expressão do LPA₁ em nossos grupos experimentais.

Na Figura 14 é possível observar que na altura da banda referente à forma monomérica do receptor (45 kDa) não havia diferença entre os grupos avaliados. Porém, na amostra de rins do grupo OUU apareceu uma segunda banda de maior peso molecular, sugerindo a formação de dímeros ou mesmo oligômeros. Esta banda não foi observada nos grupos controle e OUU+CMO. Em um estudo conduzido por Pradère e colaboradores (2007), foi verificado que camundongos submetidos à obstrução ureteral apresentavam possível aumento de expressão do receptor LPA₁ (avaliado por quantificação do RNAm), e que camundongos *knockout* para este receptor não desenvolviam fibrose intersticial como os animais selvagens. Nossos resultados estão de acordo com os apresentados por Pradère e colaboradores (2007), uma vez que, se considerarmos a soma das bandas (imunodetectadas pelo anticorpo monoclonal para o LPA₁) nos animais OUU, identificamos o aumento da expressão do LPA₁ neste grupo. Além disto, observamos que no grupo OUU+CMO, em que o tratamento foi capaz de prevenir esse aumento, houve menor desenvolvimento de fibrose intersticial (dados de Barreira, 2008; comunicação oral). A análise do LPA₁ por quantificação do RNAm, utilizada por Pradère e colaboradores (2007), não permitiu observar a formação de dímeros, verificada no presente estudo, porém este fenômeno já foi demonstrado por Zaslavsky e colaboradores (2006). Estes autores demonstraram ser possível a formação de homo e heterodímeros entre as diferentes isoformas dos receptores para o LPA, além de heterodímeros entre os receptores de LPA e os para S1P, apesar de desconhecerem a importância dessas associações, ressaltam a necessidade de, no estudo da transdução de sinais, observar-se o estado de interação dos receptores, além de sua expressão e ativação (Zaslavsky *et al.*, 2006). No presente estudo, os experimentos realizados, não nos permitem precisar se a banda adicional se constitui de oligômeros, homo ou heterodímeros, e nem qual seria a relevância fisiológica deste fato.

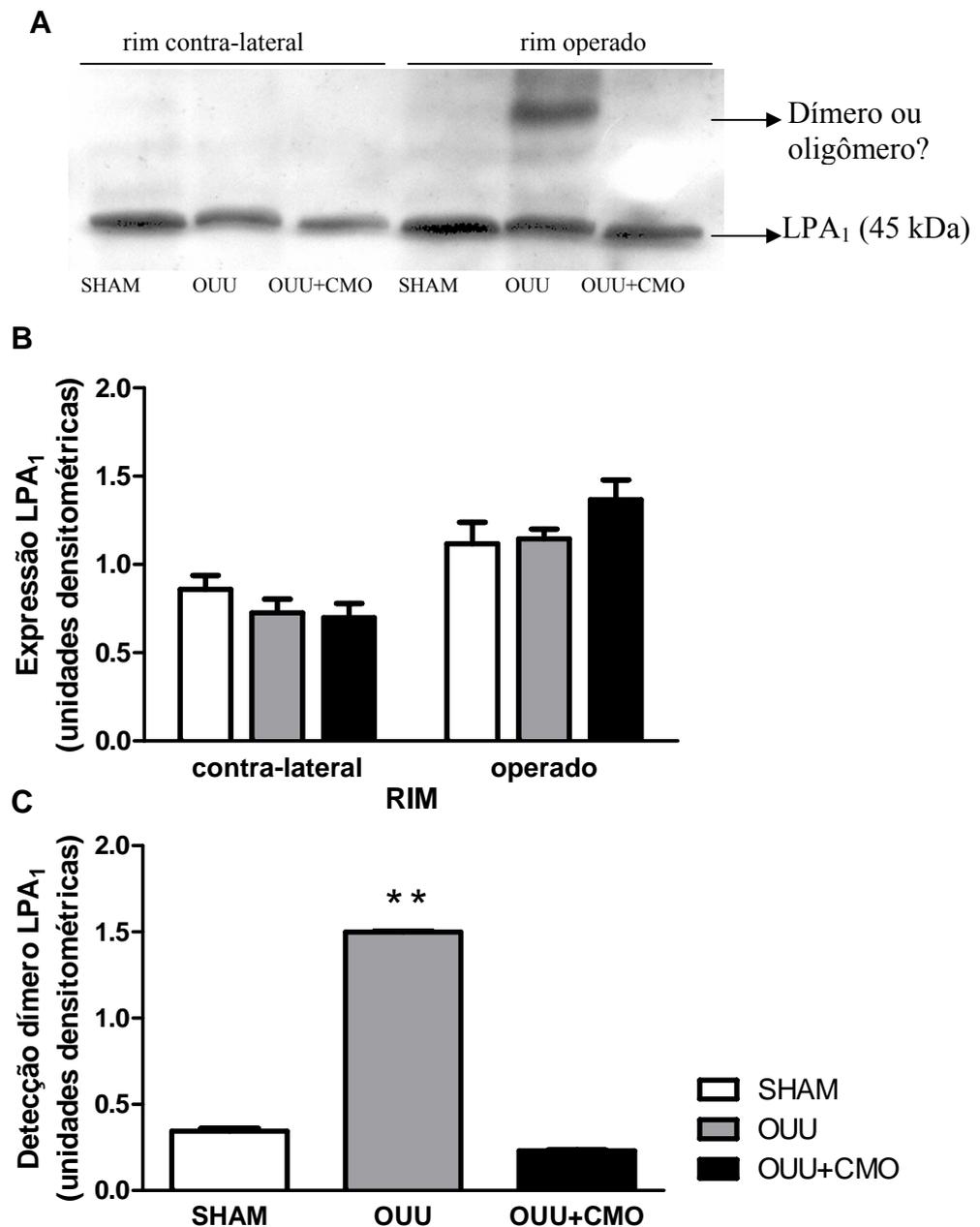


Figura 14. Expressão do receptor LPA₁. Em (A) imunoblotting representativo utilizando o anticorpo EDG2 (LPA₁). Em (B e C) razão entre os valores obtidos pela densitometria das bandas visualizadas, pelo controle de carregamento (vermelho de *Ponceau*), (B) valores referentes à banda monomérica (banda inferior) e (C) referente ao dímero (banda superior). Valores expressos por média ± erro padrão médio (n = 3), ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Sham.

No estudo das alterações moleculares induzidas pela OUU é comum serem relatadas alterações nos rins contra-laterais (Tannenbaum *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004). Acreditava-se que estas adaptações compensatórias seriam estimuladas apenas pela maior sobrecarga de solutos imposta ao rim funcional remanescente. Porém, recentemente foi demonstrado que dependendo do mecanismo de inativação do rim lesionado, o rim contra-lateral recebe diferentes estímulos compensatórios, indicando que deve haver um *crosstalk* neuroendócrino entre os rins, como mencionado anteriormente (Hauser *et al.*, 2005).

Os rins contra-laterais de animais submetidos à OUU recebem estímulos transcricionais, pela supressão de genes pertencentes à família de inibidores do crescimento, que resultariam em ativação de diversos transportadores (Hauser *et al.*, 2005). Neste estudo foi possível verificar este fenômeno pela avaliação da expressão de transportadores, como $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, e pela atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. Os resultados referentes à $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ já haviam sido relatados anteriormente (Hwang *et al.*, 2002), contudo, para a $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, este é o primeiro relato de sua expressão compensatória em rins contra-laterais. As alterações de alguns dos parâmetros analisados para valores controle nos rins contra-laterais, induzidas pelas CMO, preferencialmente estabelecidas no rim obstruído, também são resultados inéditos, e indicam que as CMO minimizam as adaptações no rim contra-lateral, provavelmente através da secreção ou mesmo indução da síntese de moléculas bioativas que atuam tanto no rim obstruído como em seu par contra-lateral. Estes dados sugerem que as CMO têm potencial de preservação do tecido renal, nos parâmetros avaliados.

5. CONCLUSÕES

A lesão renal causada por OUU acarreta considerável disfunção do órgão devido a danos causados em diferentes processos de transporte iônico e por desequilíbrios nas vias de sinalização por lipídios (glicerolipídios e esfingolipídios).

Observou-se que, apesar do caráter definitivo do modelo de lesão utilizado, as células mononucleares de medula óssea têm potencial regenerativo no rim. Entre os possíveis mecanismos de ação das CMO investigou-se a capacidade dessas células influenciarem vias de sinalização envolvendo lipídios bioativos. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com estas células alterou o padrão de geração de lipídios em importantes vias moduladoras de eventos como: proliferação, sobrevivência e apoptose, fazendo com que moléculas associadas à preservação do tecido lesionado predominassem nos rins dos animais tratados. Acredita-se que a não reversão da obstrução do ureter, causa primária da lesão, tenha limitado uma ação mais eficaz das CMO. Dessa maneira, tem-se como perspectiva futura investigar o potencial do tratamento com as CMO em um modelo de lesão renal reversível.

REFERÊNCIAS

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Garland Science, New York
- Anglani F., Forino M., Del Prete D., Tosetto E., Torregrossa R., D'Angelo A. (2004) In search of adult renal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **8**: 474-487
- Aukema H. M., House J. D., Bankovic-Calic N., Ogborn M. R. (2004) Increased renal fibrosis and expression of renal phosphatidylinositol 4-kinase-beta and phospholipase C(gamma1) proteins in piglets exposed to ochratoxin-A. *Nephron Physiol.* **96**: P19-25
- Axelband F. (2008) A agiotensina-(3,4) antagonize os efeitos da angiotensina II na Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática renal via receptores AT_2 e dissociação de heterodímeros AT_1/AT_2 . 177 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
- Balazs L., Okolicany J., Ferrebee M., Tolley B., Tigyi G. (2001) Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**: R466-R472
- Balzer-Yost B., Nofziger C. (2005) Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for transepithelial signal transduction. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* **450**: 75-82
- Beharrie A., Franc-Guimond J., Rodriguez M. M., Au J., Zilleruelo G., Abitbol C. L. (2004) A functional immature modelo f chronic partial ureteral obstruction. *Kidney Int.* **65**: 1155-1161
- Bektas M., Jolly P. S., Milstien S., Spiegel S. (2003) A specific ceramide kinase assay to measure cellular levels of ceramide. *Anal. Biochem.* **320**: 259-265
- Bellomo R., Ronco C., Kellum J. A., et al. (2004) Acute renal failure: Definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs. The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit. Care.* **8**: R204-R212
- Berne R. M., Levy M. N. (2000) Fisiologia renal - In *Fisiologia* (4ª ed.) Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, pp.634-699
- Bjornson C. R. R., Rietze R. L., Reynolds B. A., Magli M. C., Vescovi A. L. (1998) Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo. *Science* **283**: 534-537
- Bourne H. R. (1997) How receptors talk to G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 134-142
- Brazelton T. R., Rossi F. M. V., Keshet G. I., Blau H. M. (2000) From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. *Science* **290**: 1775-1779
- Brenner B. M. (2002) Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J. Clin. Invest.* **110**: 1753-1758
- Brodie J. C. e Humes H. D. (2005) Stem Cell Approaches for the Treatment of Renal Failure. *Pharmacol. Rev.* **57**: 299-313

- Brunskill N., Hayes C., Morrissey J., Klahr S. (1991) Changes in lipid environment decrease Na,K-ATPase activity in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* **39**: 843-849
- Cabral L. M. P. (2008) Geração de ceramidas nas membranas basolaterais de células epiteliais de túbulos proximais renais, e seu papel na regulação do transporte de Na⁺. 102 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
- Cabral L. M. P., Wengert M., da Ressurreição A. A. A., Feres-Elias P. H., Almeida F. G., Vieyra A., Caruso-Neves C., Einicker-Lamas M. (2007) Ceramide is a potent activator of plasma membrane Ca²⁺-ATPase from kidney proximal tubule cells with protein kinase A as an intermediate. *J. Biol. Chem.* **282**: 24599-24606
- Carafoli E. (1991) The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 531-547
- Caruso-Neves C., Coelho-Souza S. A., Vives D., Goes G., Lara L. S., Lopes A.G. (2002) Modulation of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg(2+), MgATP and furosemide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1586-1593
- Caruso-Neves C., Lara L. S., Rangel L. B., Grossi A. L., Lopes A. G. (2000) Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1467**: 189-197.
- Caruso-Neves C., Malaquias A. T., Lóss F. F., Corrêa da Costa V. M., Gomes V. O., Lopes A.G. (2003) Bradykinin B1 receptor stimulates the proximal tubule Na(+)-ATPase activity through protein kinase C pathway. *Regul. Pept.* **115**: 195-201
- Caruso-Neves C., Meyer-Fernandes J. R., Saad-Nehme J., Proverbio F., Marín R., Lopes A. G. (1998) Ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **119**: 807-811
- Chalfant C. E., Spiegel S. (2005) Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* **118**: 4605-4612
- Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlström H., Landahl U., Frisén J. (2000) Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells. *Science* **288**: 1660-1663
- Cohen P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 408-413
- Cooper G. M., Hausman R E. (2007) *The Cell: A Molecular Approach* (4th ed) Sinauer Associates, Incorporated, New York
- Coresh J., Selvin E., Stevens L. A., Manzi J., Kusek J. W., Eggers P., van Lente F., Levey A. S. (2007) Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA.* **298**: 2038-2047
- Cornelius F. (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics. *Biochemistry* **40**: 8842-8851

- Cornelius F. (2008) Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na,K-ATPase. *Biochemistry* **47**:1652-1658
- Cornelius F., Turner N., Christensen H. R. (2003) Modulation of Na,K-ATPase by phospholipids and cholesterol. II. Steady-state and presteady-state kinetics. *Biochemistry* **42**: 8541-8549
- Cuozzo F. P., Mishra S., Jiang J., Aukema H. M. (2002) Overexpression of kidney phosphatidylinositol 4-kinasebeta and phospholipase C(gamma1) proteins in two rodent models of polycystic kidney disease. *Biochim. Biophys Acta* **1587**:99-106
- da Silva P. A. (2007) Alterações nos transportadores renais de Na⁺ e na sua regulação por angiotensina II estão envolvidos na gênese de hipertensão arterial na desnutrição crônica. 127 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
- Daemen M. A., de Vries B., Buurman W. A. (2002) Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* **73**:1693-700
- de Ferrari G., Italian Society of Nephrology. (2003) Guidelines for diagnosis and therapy of diabetic nephropathy. *G. Ital. Nefrol.* **24**: S96-S108
- de Souza A. M., Carvalho T. L., Sabino P. M., Vives D., Fontes C. F., Lopes A. G., Caruso-Neves C. (2007) Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase in MDCK I cells. *Biochimie.* **89**: 1425-1432
- de Vries B., Matthijsen R. A., van Bijen A. A. J. H. M., Wolfs T. G. A. M., Buurman W. A. (2003) Lysophosphatidic Acid Prevents ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis and complement activation. *Am J. Pathol.* **163**: 47-56
- de Zeeuw D., Hillege H. L., de Jong P. E. (2005) The Kidney, a cardiovascular risk marker, and a new target for therapy. *Kidney Int.* **68**: S25-S29
- Dempsey E. C., Newton A. C., Mochly-Rosen D., Fields A. p., Reyland M. E., Insel P. A., Messing R. O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J Physiol.* **279**: 429-438
- Deng W., Balazs L., Wang D. A., van Middlesworth L., Tigyi G., Johnson L. R. (2002) Lysophosphatidic Acid Protects and Rescues Intestinal Epithelial Cells From Radiation- and Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Gastroenterology* **123**: 206-216
- Duffield J. S., Park K. M., Hsiao L., Kelley V. R., Scadden D. T., Ichimura T., Bonventre J. V. (2005) Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J. Clin. Invest.* **115**: 1743-1755
- Einicker-Lamas M., Wenceslau L. D., Bernardo R. R., Nogaroli L., Guilherme A., Oliveira M. M., Vieyra A. (2003) Sphingosine-1-phosphate formation activates phosphatidylinositol-4 kinase in basolateral membranes from kidney cells: crosstalk in cell signaling through sphingolipids and phospholipids. *J. Biochem.* **134**: 529-536

- Férraille E., Doucet A. (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev.* **81**: 345-418
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998) Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science* **279**: 1528-1530
- Filomatori C. V., Rega A. F. (2003) On the mechanism of activation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by ATP and acidic phospholipids. *J. Biol. Chem.* **278**: 22265-22271
- Fukushima N., Ishii I., Contos J. J. A., Weiner J. A., Chun J. (2001) Lisophospholipid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 507-534
- Futerman A., Hannun Y. A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**: 777-782
- Gardell S. E., Dubin A. E., Chun J. (2006) Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling. *Trends Mol. Med.* **12**: 65-75
- Goto K., Hozumi Y., Nakano T., Saino-Saito S., Martelli A. M. (2008) Lipid messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: history and perspective. *Tohoku J. Exp. Med.* **214**: 199-212
- Grimm P. C., Nickerson P., Jeffery J., Savani R. C., Gough J., McKenna R. M., Stern E., Rush D. N. (2001) Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med.* **345**: 93-97
- Grubmeyer C., Penefsky H. S. (1981) Cooperatively between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **256**: 3728-3734
- Guilherme A., Reis-Silva C., Moraes-Albuquerque J. H., Oliveira M. M., Vieyra A. (1998) A novel phosphorylated lipid counteracts activation of the renal plasma membrane ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)ATPase by endogenous phosphatidylinositol-4-phosphate. *Biosci. Rep.* **18**: 79-89
- Gupta S., Verfaillie C., Chmielewski D., Kim Y., Rosenberg M. E. (2002) A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int.* **62**: 1285-1290
- Hammerman M. R. (1998) Growth factors and apoptosis in acute renal injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**: 419-424
- Hannun Y. A., Luberto C. (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* **10**: 73-80
- Hannun Y. A., Luberto C. (2004) Lipid metabolism: ceramide transfer protein adds a new dimension. *Curr. Biol.* **14**: R163-R165
- Hannun Y. A., Luberto C., Argraves K. M. (2001) Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* **40**: 4893-4903
- Hannun Y. A., Obeid L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Rev. Mol. Cell Bio.* **9**: 139-150

- Harada-Shiba M., Kinoshita M., Kamido H., Shimokado K. (1998) Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms *J. Biol. Chem.* **273**: 9681-9687
- Hauser P., Kainz A., Perco P., Bergmeister H., Mitterbauer C., Schwarz C., Regele H. M., Mayer B., Meyer T. W., Oberbauer R. (2005) Transcriptional response in the unaffected kidney after contralateral hydronephrosis or nephrectomy. *Kidney Int.* **68**: 2497-2507
- Hokin M. R., Hokin L. E. (1953) Enzyme secretion and the incorporation of ³²P into phospholipides of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* **203**: 967-977
- Horowitz J., Perlman R. L. (1987) Phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. *Methods Enzymol.* **141**: 169-175
- Hoste E. A. J., Kellum J. A. (2006) Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Curr. Opin Crit Care.* **12**: 531-537
- Hoste E. A. J., Schurgers M. (2008) Epidemiology of acute kidney injury: How big is the problem? *Crit. Care Med.* **36**: S146-S151
- Hostetter T. H., Olson J. L., Rennke H. G., Venkatachalam M. A., Brenner B. M. (1981) Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am. J. Physiol.* **241**: F85-F93
- Huwiler A., Brunnert J., Hummel R., Vervoordeldonk M., Stabel S., van den Bosch H., Pfeilschifter J. (1996) Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6959-6963
- Hwang S. J., Chang J. M., Chen H. C., Tsai J. H., Lai Y. H. (2002) Changes of renal cortical Na-K ATPase activity, protein, and mRNA expression in ureteral obstruction. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **18**: 273-280
- Ito K., Chen J., Char M. E., Stern J. M., Seshan S. V., Khodadadian J. J., Richardson I., Hyman M. J., Vaughan Jr. E. D., Poppas D. P., Felsen D. (2004) Renal damage progresses despite improvement of renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in adult rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**: F1283-F1293
- Ito T., Suzuki A., Imai E., Okabe M., Hori M. (2001) Bone Marrow Is a Reservoir of Repopulating Mesangial Cells during Glomerular Remodeling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**: 2625-2635
- Iwata M., Herrington J., Zager R. A. (1995) Sphingosine: a mediator of acute renal tubular injury and subsequent cytoresistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8970-8974
- Kale S., Karihaloo A., Clark P., R., Kashgarian M., Krause D. S., Cantley L. G. (2003) Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J. Clin Invest.* **112**: 42-49
- Kester M., Kolesnick R. (2003) Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol. Res.* **47**:365-71

- Klahr S., Morrissey J. (2002) Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **283**: F861–F875
- Lara L. S., Correa J. S., Lavelle A. B., Lopes A. G., Caruso-Neves C. (2008) The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidyl inositol phospholipase Cbeta-protein kinase C pathway is involved in activation of proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1-7) in pig kidneys. *Exp. Physiol.* **93**: 639-647
- Li C., Wang W., Kwon T. H., Knepper M. A., Nielsen S., Frøkiaer J. (2003) Altered expression of major renal Na transporters in rats with unilateral ureteral obstruction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**: F155-F166
- Libano-Soares J. D., Gomes-Quintana E., Melo H. K., Queiroz-Madeira E. P., Roubach R. G., Lopes A. G., Caruso-Neves C. (2008) B2 receptor-mediated dual effect of bradykinin on proximal tubule Na⁺-ATPase: sequential activation of the phosphoinositide-specific phospholipase Cbeta/protein kinase C and Ca²⁺-independent phospholipase A2 pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1316-1323
- Lin F., Moran A., Igarashi P. (2005) Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J. Clin. Invest.* **115**: 1756-1764
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Marín R., Proverbio F., Proverbio T., Ventrella N., Pagliarane A., Trombette G., Trigari A., Borgatti R. (1999) Phosphorilated intermediate associated with ouabain-insensitive Na⁺-ATPase. *Satellite Symposium 'Cell homeostasis: Channels and transporters' in XVth Internacional Congress of Nephrology* **9**, 1999
- Masuya M., Drake C. J., Fleming P. A., Reilly C. M., Zeng H., Hill W. D., Martin-Studdard A., Hess D. C., Ogawa M. (2003) Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood* **15**: 2215-2218
- Matsuda J., Yoneshige A., Suzuki K. (2007) The function of sphingolipids in the nervous system: lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies. *J. Neurochem.* **103**: 32-38
- Mello-Aires M. (1999) Fisiologia Renal - In *Fisiologia* (2^a ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil. pp. 561-645
- Merrill Jr. A. H., Schmelz E.-M., Dillehay D. L., Spiegel S., Shayman J. A., Schroeder J. J., Riley R. T., Voss K. A., Wang E. (1997) Sphingolipids – The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**: 208-225
- Michell B. (1995) Early steps along the road to inositol-lipid-based signalling. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 326-329
- Michell R. H. (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta.* **415**: 81-47
- Michell R. H. (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 151-161

- Missiaen L., Raeymaekers L., Droogmans G., Wuytack F., Casteels R. (1989) Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca^{2+} -transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochem. J.* **263**: 687-694
- Morigi M., Imberti B., Zoja C., Corna D., Tomasoni S., Abbate M., Rottoli D., Angioletti S., Benigni A., Perico N., Alison M., Remuzzi G. (2004) Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**: 1794-1804
- Morrissey J., Windus D., Schwab S., Tannenbaum J., Klahr S. (1986) Ureteral occlusion decreases phospholipid and cholesterol of renal tubular membranes. *Am. J. Physiol.* **250**: F136-F143
- Muller G., Ayoub M., Storz P., Rennecke J., Fabbro D., Pfizenmaier K. (1995) PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* **14**: 1961-1969
- Na S., Collin O., Chowdhury F., Tay B., Ouyang M., Wang Y., Wang N. (2008) Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *PNAS* **105**: 6626-6631
- Nahorski S. R. (2006) Pharmacology of intracellular signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* **147**: S38-S45
- Nash K., Hafeez A., Hou S. (2002) Hospital-acquired renal insufficiency. *Am. J. Kidney Dis.* **39**: 930-936
- Nelson D. L., Cox M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry* 4th ed. Freeman, New York
- Neuss S., Becher E., Woltje M., Tietze L., Jahn-Dechent W. (2004) Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* **22**: 405-414
- NIH – National Institutes of Health (2008) <http://stemcells.nih.gov/info/basics/> último acesso em maio/2008
- Nikolova-Karakashian M., Morgan E. T., Alexander C., Liotta D. C., Merrill, Jr A. H. (1997) Bimodal Regulation of Ceramidase by Interleukin-1 β . *J. Biol. Chem.* **272**: 18718-18724
- Nishizuka Y. (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**: 1365-1370
- Nogaroli L., Silva O. F., Bonilha T. A., Moreno P. A. M., Bernardo R. R., Vieyra A., Einicker-Lamas M. (2005) Diacylglycerol kinase activity in purified basolateral membranes of kidney tubules I. Evidence for coupling with phospholipase C. *I. J. Biochem. Cell Biol.* **37**: 79-90
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**: 701-705

- Overduin M., Cheever M. L., Kutateladze T. G. (2001) Signalling with phosphoinositides: Better than binary. *Mol. Interv.* **1**: 150-159
- Pendaries C., Tronchère H., Plantavid M., Payrastré B. (2003) Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Letters* **546**: 25-31
- Poulsom R., Forbes S. J., Hodivala-Dilke K., Ryan E., Wyles S., Navaratnarajah S., Jeffery R., Hunt T., Alison M., Cook T., Pusey C., Wright N. A. (2001) Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J. Pathol.* **195**: 229-235
- Pradère J. P., Klein J., Grès S., Guigné C., Neau E., Valet P., Calise D., Chun J., Bascands J. L., Saulnier-Blache J., Schanstra J. P. (2007) LPA₁ receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**: 3110-3118
- Prasad R. (1996) *Manual on Membrane Lipids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Germany
- Proverbio F., Marín R., Proverbio T. (1989) The “second” sodium pump and cell volume. *Curr. Top. Membr. Transp.* **34**: 105-120
- Rangel L. B., Lopes A. G., Lara L. S., Carvalho T. L., Silva I. V., Oliveira M. M., Einicker-Lamas M., Vieyra A., Nogaroli L., Caruso-Neves C. (2005) PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. *Regul. Pept.* **127**: 177-182
- Rangel L. B., Malaquias A. T., Lara L. S., Silva I. V., de Souza A. M., Lopes A. G., Caruso-Neves C. (2001) Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na(+)-ATPase activity from proximal tubules. *Biochim. Biophys. Acta* **1512**: 90-97
- Remuzzi G., Benigni A., Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J. Clin. Invest.* **116**: 288-296, 2006
- Ricardo S. D. e Deane J. A. (2005) Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology* **10**: 276-282
- Rivard C. J., Almeida N. E., Berl T., Capasso J. M. (2005) The gamma subunit of Na/K-ATPase: an exceptional, small transmembrane protein. *Front Biosci.* **10**: 2604-2610
- Romão Junior J. E. (2004) Doença renal crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *J. Bras. Nefrol.* XXVI (3): supl. 1-3
- Rookmaaker M. B., Verhaar M. C., van Zonneveld A. J., Rabelink T. J. (2004) Progenitor cells in the kidney: Biology and therapeutic perspectives. *Kidney Int.* **66**: 518-522
- SBN Jan/2007. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/>. Acessado em 08/06/2008
- Seldin D. W., Giebisch G. (1985) *The Kidney: physiology and pathophysiology*. Raven Press Books, New York
- Sesso R., da Silva C. B., Kowalski S. C., Manfredi S. R., Canziani M. E., Draibe S. A. (2007) Dialysis care, cardiovascular disease, and costs in end-stage renal disease in Brazil. *Int J Technol. Assess. Health Care.* **23**: 126-130
- Singer S. J., Nicholson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731

- Spiegel S., Milstien S. (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **277**: 25851-25854
- Stokman G., Leemans J. C., Claessen N., Weening J. J., Florquin S. (2005) Hematopoietic Stem Cell Mobilization Therapy Accelerates Recovery of Renal Function Independent of Stem Cell Contribution. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**: 1684-1692
- Stokman G., Leemans J. C., Stroo I., Hoedemaeker I., Claessen N., Teske G. J. D., Weening J. J., Florquin S. (2008) Enhanced mobilization of bone marrow cells does not ameliorate renal fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**: 483-491
- Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schulz I. (1983) Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**: 67-69
- Strehler E. E., Filoteo A. G., Penniston J. T., Caride A. J. (2007) Plasma-membrane Ca^{2+} pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 919-922
- Strehler E. E., Zacharias D. A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* **81**: 21-50
- Sturm A., Sudermann T., Schulte K. M., Goebell H., Dignass A. U. (1999) Modulation of Intestinal Epithelial Wound Healing In Vitro and In Vivo by Lysophosphatidic Acid. *Gastroenterology* **117**: 368-377
- Sudhakar C. G., Haney R. M., Xue Y., Stahelin R. V. (2008) Cellular membranes and lipid-binding domains as attractive targets for drug development. *Curr. Drug Targets* **9**: 603-613
- Tager A. M., LaCamera P., Shea B. S., Campanella G. S., Selman M., Zhao Z., Polosukhin V., Wain J., Karimi-Shah B. A., Kim N. D., Hart W. K., Pardo A., Blackwell T. S., Xu Y., Chun J., Luster A. D. (2008) The lysophosphatidic acid receptor LPA_1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nature Med.* **14**: 45-54
- Tannenbaum J., Purkerson M. L., Klahr S. (1983) Effect of unilateral ureteral obstruction on metabolism of renal lipids in the rat. *Am. J. Physiol.* **14**: F254-F262
- Theisse N. D., Nimmakayalu M., Gardner R., Illei P. B., Morgan G., Teperman L., Henegariu O., Krause D. S. (2000) Liver from Bone Marrow in Humans. *Hepatology* **32**: 11-16
- Thornhill B. A., Burt L. E., Chen C., Forbes M. S., Chevalier R. L. (2005) Variable chronic partial ureteral obstruction in the neonatal rat: A new model of ureteropelvic junction obstruction. *Kidney Int.* **67**: 42-52
- Tögel F., Hu Z., Weiss K., Isaac J., Lange C., Westenfelder C. (2005) Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**: F31-F42
- Uchino S., Bellomo R., Goldsmith D., et al. (2006) An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Crit. Care Med.* **34**: 1913-1917

- Ueda N., Kaushal G. P., Hong X., Shah S. V. (1998) Role of enhanced ceramide generation in DNA-damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC PK1 cells. *Kidney Int.* **54**: 399-406
- Vague P., Coste T. C., Jannot M. F., Raccach D., Tsimaratos M. (2004) C-peptide Na^+ , K^+ -ATPase, and diabetes. *Exp. Diabetes Res.* **5**: 37-50
- Valverde R. H., Tortelote G. G., Lemos T., Mintz E., Vieyra A. (2005) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca^{2+} -ATPase by calmodulin and protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **280**: 30611-30618
- van Blitterswijk W. J., van der Luit A. H., Veldman R. J., Verheij M., Borst J. (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* **369**: 199-211
- van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 112-124
- Waikar S. S., Curhan G. C., Wald R., et al. (2006) Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**: 1143-1150
- Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* Jul **243**: 3763-3765
- Wengert M., Adão-Novaes J., Assaife-Lopes N., Leão-Ferreira L. R., Caruso-Neves C. (2007) Adenine-induced inhibition of Na^+ -ATPase activity: Evidence for involvement of the G_i protein-coupled receptor in the cAMP signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**: 261-267
- Witzgall R., Brown D., Schwarz C., Bonventre J. V. (1994) Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J. Clin. Invest.* **93**: 2175-2188
- Wymann M. P., Schneider R. (2008) Lipid signalling in disease. *Nature Rev. Mol. Cell Bio.* **9**: 162-176
- Xue J. L., Daniels F., Star R. A., et al. (2006) Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**: 1135-1142
- Yanagisawa H., Moridaira K., Nodera M., Wada O. (1997) Ureteral obstruction enhances eicosanoid production in cortical and medullary tubules of rat kidneys. *Kidney Blood Press Res.* **20**: 398-405
- Yin T., Li L. (2006) The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* **116**: 1195-1201
- Zager R. A. (2000) Sphingomyelinase and membrane sphingomyelin content: determinants of Proximal tubule cell susceptibility to injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**: 894-902
- Zager R. A., Conrad S., Lochhead K., Sweeney E. A., Igarashi Y., Burkart K. M. (1998) Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Kidney Int.* **53**: 573-582

- Zaslavsky A., Singh L. S., Tan H., Ding H., Liang Z., Xu Y. (2006) Homo- and heterodimerization of LPA/S1P receptors, OGR1 and GPR4. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 1200-1212
- Zhang Q., Rothenbacher D. (2008) Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: Systematic review. *BMC Public Health* **8**: 117
- Zylinska L., Soszynski M. (2000) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim Pol.* **47**: 529-539

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](#)