

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica

EVIDÊNCIA DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO DO
TIPO P2X₇ EM MODELO MURINO DE DOENÇA TUBULO-
INTERSTICIAL RENAL

RÔMULO GOMES GONÇALVES

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



**EVIDÊNCIA DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO DO
TIPO P2X₇ EM MODELO MURINO DE DOENÇA TUBULO-
INTERSTICIAL RENAL**

RÔMULO GOMES GONÇALVES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Clínica Médica

Orientadores: Prof Dr Maurilo de Nazaré de Lima Leite Junior
Prof^a. Dr^a Cristina Maeda Takiya
Prof Dr Robson Coutinho Silva

Rio de Janeiro
Agosto/2009

Gonçalves, Rômulo Gomes

Evidência da participação do receptor purinérgico do tipo P2X₇ em modelo murino de doença túbulo-intersticial renal / Rômulo Gomes Gonçalves – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2009. xii, 97 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Maurilo de Nazaré de Lima Leite Junior, Cristina Maeda Takiya e Robson Coutinho Silva

Tese (Doutorado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Clínica Médica, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 60-68

1. Obstrução ureteral unilateral. 2. Fibrose renal. 3. Inflamação renal. 4. Receptores purinérgicos. 5. Receptor P2X₇. 6. Nefrologia – Tese. I. Leite Jr, Maurilo de Nazaré de Lima. II. Takiya, Cristina Maeda. III. Coutinho-Silva, Robson. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Clínica Médica. V. Título.

EVIDÊNCIA DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO DO TIPO P2X₇ EM MODELO MURINO DE DOENÇA TUBULO-INTERSTICIAL RENAL

Rômulo Gomes Gonçalves

Orientadores: Prof Dr Maurilo de Nazaré de Lima Leite Junior
Prof^a Dr^a Cristina Maeda Takiya
Prof Dr Robson Coutinho silva

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Rio de Janeiro
Agosto/2009

**Dedico esta Tese aos meus filhos
Isabel e João Pedro que são a minha
inspiração e minha motivação...**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelos momentos de inspiração, proteção e consolo.

Aos meus queridos orientadores, Prof^a.Cristina que sempre me recebeu com todo carinho em seu laboratório e teve paciência para me ensinar a arte da imunohistoquímica. Mesmo nos momentos em que estava mais estressada, sempre me ouviu e me deu atenção. Profa chuchu muito obrigado por tudo. Prof.Robson, sempre disponível para atender minhas dúvidas e sempre empolgado com nossos resultados. Foi muito bom tê-lo conhecido. Prof. Maurilo, um verdadeiro pai para mim dentro da pesquisa. Há 8 anos nos conhecemos e desde então se tornou uma referência para mim de médico, professor e pesquisador. Tenho muito orgulho de ter sido seu aluno.

Ao Dr. Marco Aurélio de Biato por ter me ensinado a técnica de obstrução ureteral unilateral em ratos

A Dra. Mônica por ter me incentivado a continuar com a linha de pesquisa quando eu era seu aluno de iniciação científica.

Ao Prof Mauro Pavão por ter me aceitado em seu laboratório sempre disposto a colaborar com o que precisava.

Ao meu amigo Ricardo Felipe, que entrou comigo na iniciação científica no laboratório multidisciplinar e quando resolveu sair da pesquisa para se dedicar a residência médica, deixou palavras de incentivo e carinho. Foram muitas cirurgias e muitas gaiolas lavadas no biotério. Tenho certeza que você vai ser um excelente médico cirurgião.

As minhas alunas de iniciação científica Letícia e Fernanda, pela disposição e competência ao realizar conosco os experimentos e análise de dados.

Aos amigos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa que sempre foram solidários e me ajudaram quando precisava de algum material que estava faltando. Em especial a Alessandra Coelho, que me quebrou altos “galhos” durante esses anos com muita paciência.

A Cesônia e ao Alyson que tiveram toda paciência do mundo para me ensinar os segredos do laboratório e participaram ativamente desta tese. Devo muito a vocês

Aos meus amigos de faculdade Rodrigo, Ednei e Cristiano que estavam sempre no laboratório ajudando nas cirurgias e batendo papo, fazendo com o que o tempo passasse mais leve e de forma mais agradável. Foram boas risadas que demos durante todo esse tempo.

A minha amiga Viviane, que conheci por coincidência em Petrópolis e descobri que também era aluna do Prof. Maurilo. Foram muitas conversas na cozinha da clínica e muita troca de idéia com boas risadas é claro.

Aos meus irmãos Rodrigo e Junior que mesmo distantes estiveram sempre presentes em meu coração.

Aos meus avós maternos Arlete e Antônio que apesar da minha ausência sempre me passaram força e admiração.

Aos meus avós paternos Amaro e Lalá que não estão mais aqui conosco para viver esse momento, mas que com certeza estão em minha memória e pensamento.

A minha mãe e meu pai que foram minha fortaleza. Nos momentos mais difíceis tive o apoio que precisava para continuar em frente e realizar esse sonho que compartilho com vocês. Meu amor e admiração por vocês são infinitos.

A Maria Isabel, mãe de meus filhos, que esteve ao meu lado durante boa parte desse tempo e supriu com responsabilidade e carinho a minha ausência junto aos nossos filhos. Só tenho a agradecer a você.

Ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina – UFRJ, por ter me oferecido a oportunidade de iniciar minha carreira como pesquisador.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

RESUMO

EVIDÊNCIA DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO DO TIPO P2X₇ EM MODELO MURINO DE DOENÇA TUBULO-INTERSTICIAL RENAL

Rômulo Gomes Gonçalves

Orientadores: Prof Dr Maurilo de Nazaré de Lima Leite Junior
Prof^a Dr^a Cristina Maeda Takiya
Prof Dr Robson Coutinho Silva

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor Clínica Médica.

Introdução: Os receptores do tipo P2X₇ já foram demonstrados em granulócitos, monócitos/macrófagos e linfócitos B e T e estão envolvidos em vários mecanismos celulares incluindo os relacionados à inflamação e resposta imunológica. **Objetivos:** investigar a atuação desses receptores na resposta inflamatória e fibrogênica em rins após obstrução ureteral unilateral, usando camundongos Knockout para P2X₇ (-/-). Camundongos C57Bl6 foram submetidos à obstrução ureteral unilateral (OUU) esquerda e sacrificados após 7 e 14 dias. **Métodos** Histopatologia usando hematoxilina–eosina, Ácido periodico de Schiff e Picrosirius, imunohistoquímica para macrófagos, miofibroblastos, transforming growth factor- β (TGF- β)1 e P2X₇, e imunofluorescência para células apoptóticas (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) foram realizadas. **Resultados:** foram os seguintes: (1) controle; (2) sham; (3) controle P2X₇ (-/-); (4) sham P2X₇ (-/-); (5) OUU selvagem (WT); (6) OUU P2X₇ (-/-). Miofibroblastos e a coloração de Picrosirius foram significativamente menores no grupo OUU P2X₇ (-/-) após 7 e 14 dias, comparados ao grupo OUU selvagem. Rins dos camundongos OUU P2X₇ (-/-) mostraram redução no número de células inflamatórias em 14 dias, mas não em 7 dias, comparados ao grupo UUU selvagem. TGF- β 1 foi menor nos camundongos OUU P2X₇ (-/-) após 7 e 14 dias quando comparado ao grupo UUU selvagem. Infiltração de macrófagos e apoptose tubular foi menor no grupo OUU P2X₇ (-/-) após 14 dias, mas não após 7 dias, comparado ao grupo OUU selvagem. P2X₇ foi expresso somente em células epiteliais tubulares após 7 dias de OUU em camundongos selvagens. **Conclusão:** Constituem a primeira evidência de que os receptores P2X₇ estão implicados na infiltração de macrófagos, deposição de colágeno e apoptose em resposta à obstrução ureteral unilateral em camundongos.

Palavras-chave: Fibrose renal; Inflamação renal; Obstrução ureteral unilateral; Receptor P2X₇

Rio de Janeiro
Agosto/2009

ABSTRACT

EVIDENCE OF PARTICIPATION OF PURINERGIC RECEPTOR P2X₇ IN A MURINE MODEL OF RENAL TUBULO-INTERSTITIAL DISEASE

Rômulo Gomes Gonçalves

Orientadores: Prof Dr Maurilo de Nazaré de Lima Leite Junior
Prof^a Dr^a Cristina Maeda Takiya
Prof Dr Robson Coutinho Silva

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Introduction: Receptors of the P2X₇ type have been demonstrated in granulocytes, monocytes/macrophages, B and T lymphocytes, and have been involved in several cellular mechanisms including those related to inflammation and immunological response. **Objective:** Attempted to investigate the role of these receptors on the inflammatory and fibrogenic response in the kidneys of unilateral ureteral obstruction (UUO), by using P2X₇ knockout mice (-/-). C57Bl6 mice were submitted to left unilateral ureteral obstruction (UUO) and killed after 7 and 14 days. **Methods:** Histopathology using hematoxylin–eosin, periodic-acid Schiff and Sirius-red staining, immunohistochemistry for macrophages, myofibroblasts, transforming growth factor- β (TGF- β)1 and P2X₇, and immunofluorescence for apoptotic cells (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) were performed. **Results:** Was follows: (1) control; (2) sham; (3) control P2X₇ (-/-); (4) sham P2X₇ (-/-); (5) UUO wild type (WT); (6) UUO P2X₇ (-/-). Myofibroblasts and Sirius-red staining were significantly lower in UUO P2X₇ (-/-) mice at days 7 and 14, compared to UUO WT. Kidneys from UUO P2X₇ (-/-) mice showed reduced number of inflammatory cells at day 14 but not at day 7, compared to UUO WT. TGF- β 1 was less in UUO P2X₇ (-/-) mice at days 7 and 14 when compared to UUO WT. Macrophage infiltration and tubular apoptosis were lower in UUO P2X₇ (-/-) at day 14 but not at day 7, compared to UUO WT. P2X₇ was expressed only in tubular epithelial cells at day 7 of UUO WT mice. **Conclusion:** These findings constitute the first evidence that P2X₇ receptors are implicated in macrophage infiltration, collagen deposition and apoptosis in response to ureteral obstruction in mice.

Key Words: Renal fibrosis; Renal inflammation; Unilateral ureteral Obstruction; P2X₇ Receptors.

Rio de Janeiro
Agosto/2009

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE QUADROS E DE TABELAS.....	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos de fisiopatologia renal	1
1.2 O estímulo purinérgico	8
1.3 Receptores purinérgicos	11
1.4 O papel da ativação purinérgica nas doenças renais	19
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais e protocolo experimental.....	24
3.2 Histomorfometria	26
3.3 Técnica de hematoxilina-eosina	27
3.4 Técnica de PicroSirius.....	28
3.5 Imunohistoquímica	29
3.6 Atrofia tubular	31
3.7 Detecção de apoptose	31
4 ESTATÍSTICAS	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Descrição da histomorfologia renal	34
5.2 Inflamação renal.....	37
5.3 Colágeno e fibrose renal	40
5.4 Atrofia tubular	50
5.5 Apoptose tubular	511
5.6 Imunohistoquímica para P2X ₇	533
6 DISCUSSÃO	566
7 CONCLUSÕES	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α-SMA	Actina de músculo liso α
A₁	Receptores de adenosina tipo 1
A₂	Receptores de adenosina tipo 2
A₃	Receptores de adenosina tipo 3
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ARPKD	Doença renal policística autonômica recessiva
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPe	Trifosfato de adenosina extracelular
ATPo	Trifosfato de adenosina oxidado
BBG	Azul brilhante G
BSA	Albumina de soro bovino
BzATP	Benzoyl-4-benzoyl trifosfato de adenosina
C	Grupo controle
Ca⁺⁺	Cálcio
COX2	Ciclooxigenase tipo 2
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
Cu⁺⁺	Cobre
DAB	Diaminobenzidina
DAP	4',6'-diamidino-2-fenilindole
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
ICAM	Molécula de adesão intercelular 1
ICE	Enzima conversora de interleucina
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-1RA	Antagonista do receptor interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-18	Interleucina 18
kDa	Quilodáton

K⁺	Potássio
LPS	Lipoproteína de superfície
Mac-1	Molécula de adesão celular
MAPK	Proteína cinase ativadora de mitogênese
MMP	Metaloproteinases
Na⁺	Sódio
OUU	Obstrução ureteral unilateral
P1	Receptores purinérgicos tipo P1
P2	Receptores purinérgicos tipo P2
P2X	Receptores purinérgicos do tipo P2X
P2X₇(-/-)	Camundongos knockout para P2X ₇
P2Y	Receptor purinérgico tipo P2Y
PAI-1	Inibidor de ativador de plasminogênio
PAS	Coloração ácido periódico-SCHIFF
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PKD	Proteína cinase D
PPADS	Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfônico
RNA_m	RNA mensageiro
SH	Grupo Sham
TGF-β	Fator de crescimento tecidual β.
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TUNEL end-labeling	Terminaldeoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC Nick
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VCAM1	Molécula de adesão celular-vascular-1
WT	Camundongos selvagens
Zn⁺⁺	Zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DE QUADROS E DE TABELAS

Figura 1	Esquema proposto para patogênese da fibrose intersticial em doença renal progressiva (klahr e Morrissey, 2002)	6
Figura 2	Mecanismos teóricos de liberação do ATP	9
Figura 3	Ação das ecto-nucleotidases sobre o ATPe.....	11
Figura 4	Topologia dos receptores de membrana P2Y e P2X.	13
Figura 5	Esquema representativo do processamento e libertacao de IL-1 β	18
Figura 6	Representação esquemática do modelo de obstrução ureteral.....	26
Figura 7	Morfologia renal pela coloração de Hematoxilina eosina	35
Figura 8	Atrofia tubular pela coloração de PAS.....	36
Figura 9	Marcação de macrófagos através de imunohistoquímica para f4/80	38
Figura 10	Quantificação do número de células f4/80 positivas	39
Figura 11	Marcação de colágeno através da coloração de Picro Sirius.....	41
Figura 12	Quantificação de área de colágeno positiva através do Picrosirius.....	42
Figura 13	Marcação de colágeno através da coloração de α -SMA.....	45
Figura 14	Quantificação de miofibroblastos	46
Figura 15	Imunohistoquímica para TGF- β	48
Figura 16	Quantificação de TGF- β	49
Figura 17	Quantificação de túbulos atróficos	51
Figura 18	TUNEL para detecção de células apoptóticas	52
Figura 19	Quantificação de células apoptóticas.....	53
Figura 20	Imunohistoquímica para o receptor P2X ₇	54

Tabela 1	Resultado de imunohistoquímica para F4/80, α -SMA e TGF- β após 7 dias de OUU.....	50
Tabela 2	Resultado de imunohistoquímica para F4/80, α -SMA e TGF- β após 14 dias de OUU.....	50
Tabela 3	Resultado de PicroSirius, atrofia tubular e apoptose após 7 dias de OUU.....	55
Tabela 4	Resultado de PicroSirius, atrofia tubular e apoptose após 14 dias de OUU.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos de fisiopatologia renal

Muitas doenças que acometem os rins são passíveis de iniciar um processo progressivo de fibrose e queda da função renal. A perda de néfrons funcionantes desencadeia alterações hemodinâmicas, humorais e inflamatórias que levam à esclerose glomerular, proteinúria e fibrose intersticial (Brenner, 1985). A progressão da doença renal é, portanto, tronco comum de diversas doenças que acometem o parênquima renal. Afecções inflamatórias glomerulares e do interstício podem eventualmente evoluir com destruição e fibrose intersticial, intimamente correlacionada à queda da filtração glomerular (Mackensen-Haen *et al.*, 1981). Assim, nas circunstâncias em que as glomerulopatias ou doenças túbulo-intersticiais, imunológicas e não imunológicas, são fontes de estímulo inflamatório propiciadores de fibrogênese intersticial, a progressão da doença renal é a regra na evolução para a doença renal terminal.

Muitos modelos de doença renal evolutiva têm sido utilizados com a finalidade de investigar os mecanismos de progressão da doença renal em cada um deles. O modelo de ablação renal tem sido fiel como ferramenta para estudo de mecanismos de progressão da doença renal por redução de massa renal funcional. A esclerose glomerular que se desenvolve gera proteinúria intra-tubular com aglutinação de macromoléculas na luz tubular e tráfego transepitelial de polipeptídeos. A fibrose intersticial é consequente à reação inflamatória monocitária que inunda o interstício renal, mediada pela ação fibrogênica de citocinas como o

TGF- β (Griffin *et al.*, 2000).

O modelo da obstrução ureteral unilateral (OUU) proporciona um rápido desenvolvimento de fibrose intersticial a partir de dilatação e atrofia tubular, a exemplo de quadros agudos e crônicos de nefropatia túbulo-intersticial e nefropatias obstrutivas (Klahr e Morrissey, 2002). O estudo de Tanner e Evan (1989), demonstra a lesão túbulo-intersticial com obstrução de néfron único. Assim, a OUU tem sido uma ferramenta importante no estudo dos processos de inflamação túbulo-intersticial a partir de lesão da célula epitelial tubular, e a evolução da fibrose intersticial e apoptose destas células.

A nefropatia obstrutiva constitui importante causa de morbidade e mortalidade na população geral. Suas consequências variam desde lesão cicatricial com dilatação da pelve até fibrose intersticial com consequente perda da função renal.

Em um estudo de 59.064 necrópsias, 3,1% possuíam hidronefrose. Entre as idades de 20 e 60 anos, a obstrução do trato urinário foi mais comum em mulheres. Por outro lado, após 60 anos a nefropatia obstrutiva foi mais observada em homens, em função da doença prostática (Bell, 1950). Outro estudo envolvendo necrópsias de indivíduos até 15 anos de idade mostrou que 80% dos casos de hidronefrose ocorreram naqueles abaixo de 12 meses de idade (Campbell, 1970)

A real proporção de nefropatia obstrutiva está provavelmente subestimada por estes estudos, tendo em vista casos temporários de obstrução do trato urinário por cálculos e gravidez. No entanto, quadros agudos de obstrução ureteral são susceptíveis de desencadear lesão túbulo-intersticial, cuja gravidade e extensão são uma função do tempo de obstrução. Desse modo, a redução da evolução da lesão túbulo-intersticial deve ser a meta inicial diante de um quadro agudo de obstrução

ureteral. Entretanto, são freqüentes os casos de hidronefrose com obstrução prolongada, em que boa parte ou quase a totalidade do parênquima renal desenvolve fibrose intersticial. Assim, a tentativa de bloqueio farmacológico da reação inflamatória reativa ao processo obstrutivo, deve constituir-se em objeto de investigação em modelos animais de obstrução ureteral.

Diversos modelos animais de obstrução ureteral, uni e bilateral foram desenvolvidos inicialmente para estudo hemodinâmico e por curtos períodos de tempo. Posteriormente, trabalhos experimentais em modelos animais revelaram os aspectos histopatológicos característicos da reação inflamatória que se segue à obstrução ureteral (Schreiner *et al.*, 1988). A análise temporal da progressão da doença renal secundária à OUU ajuda a desvendar o processo fisiopatológico que culmina com a perda progressiva da função renal. Estudos morfológicos sobre as alterações precoces e tardias da obstrução ureteral unilateral em coelhos, mostraram que nos 4 primeiros dias de obstrução, as células tubulares apresentaram vacuolização do citoplasma e os túbulos mais distais, como o contornado distal e os segmentos coletores, mostraram extensa dilatação, a qual era mais proeminente nos níveis mais profundos da medula e da papila. O interstício cortical e medular mostrou alargamento e presença de fibroblastos, monócitos e algumas hemácias, além de leucócitos polimorfonucleares nos capilares peritubulares. A partir do quarto dia de obstrução, todos os rins mostraram graus variados de necrose papilar com dilatação tubular, exceto nos segmentos mais proximais, os quais apareciam freqüentemente colabados. Após o 16^o dia, muitos segmentos coletores apresentaram macrófagos na sua luz, fagocitando restos celulares. No interstício cortical e medular externo apareceram numerosos fibroblastos e miofibroblastos, macrófagos e houve aumento progressivo e difuso de

fibras colágenas. Nas porções mais profundas, fibras densas de colágeno foram observadas circundando áreas de necrose papilar (Nagle *et al.*, 1973; Nagle e Bulger, 1978).

Os modelos de obstrução ureteral unilateral em ratos têm mostrado a ocorrência de lesão túbulo-intersticial grave, caracterizada por infiltrado de monócitos, com o aparecimento de miofibroblastos e proliferação de células epiteliais tubulares. Em seguida observa-se o desenvolvimento de fibrogênese no interstício renal e apoptose de todos os tipos celulares, levando respectivamente à fibrose e perda de tecido renal (Klahr e Morrissey, 2002). A atrofia tubular encontrada após obstrução ureteral está intimamente relacionada à apoptose das células epiteliais (Gobe e Axelsen, 1987)

A infiltração de monócitos após obstrução ureteral unilateral foi inicialmente descrita em 1976 (Nagle *et al.*, 1976). Estudos subseqüentes relacionaram a infiltração leucocitária com produção aumentada de PGE₂ pelo rim obstruído (Okegawa *et al.*, 1983). Esta infiltração ocorre precocemente no curso da obstrução ureteral e atrai linfócitos, macrófagos e fibroblastos para o interstício renal, o que é observado desde algumas horas após a obstrução (Diamond *et al.*, 1994). Provavelmente há uma relação entre o influxo de macrófagos e o envolvimento de miofibroblastos no interstício medular, enquanto o interstício do córtex renal fica preenchido por macrófagos desde o 6^o dia pós-obstrução (Yamate *et al.*, 1998). Diversas substâncias atraem macrófagos para o tecido renal após obstrução ureteral. A osteopontina, uma proteína de adesão de macrófagos, é mediadora da infiltração dessas células no interstício renal na fase inicial após obstrução ureteral (Ophascharoensuk *et al.*, 1999). Outros estudos mostraram expressão aumentada de outras moléculas de adesão como ICAM-1, Mac-1 e VCAM-1, como evidência

para o seu papel na infiltração de células inflamatórias e na patogênese da lesão túbulo-intersticial crônica secundária à obstrução ureteral (Diamond *et al.*, 1994).

Os fibroblastos no rim normal interagem com diversos componentes da matriz extracelular, relacionados ou não com inflamação. Essas células são as principais responsáveis pela deposição de matriz extracelular (Liu, 2004) Durante o processo de fibrose intersticial, o fibroblasto passa a sua forma ativa quando a expressa α -actina de músculo liso (α -SMA), sendo então denominado como miofibroblasto. Após a OUU ocorre um aumento de miofibroblastos em tecido renal e, conseqüentemente, aumento na produção de colágeno e matriz extracelular (Liu, 2004). A origem dessas células durante a fibrogênese ainda é incerta, sendo aceitas três hipóteses para explicá-las. A primeira hipótese propõe que células de medula seriam progenitores de fibroblastos teciduais, que chegaria aos órgãos alvo via circulação sanguínea (Prockop, 1997). A segunda hipótese diz que os miofibroblastos são derivados de ativação local de fibroblastos intersticiais residentes (Liu, 2004). Finalmente, a terceira hipótese e mais bem aceita nos dias atuais, propõe uma transição epitélio-mesenquimal (EMT) para a geração de fibroblastos intersticiais locais (Strutz *et al.*, 1995). A EMT é um processo em que as células epiteliais tubulares perdem seu fenótipo epitelial e adquirem novas características mesenquimais. Portanto, a EMT é um importante contribuidor para o aparecimento de fibroblastos e, conseqüentemente, para evolução da fibrogênese em nefropatia obstrutiva, se tornando um importante alvo no tratamento da fibrose intersticial (Iwano *et al.*, 2002).

“Transforming Growth Factor” ou TGF- β é um fator de crescimento descrito como molécula chave em processos fibróticos (Klahr e Morrissey, 2002). Sua expressão se encontra aumentada em numerosas condições pró-fibróticas, incluindo

a hidronefrose (Kaneto *et al.*, 1999). A síntese de TGF- β está intimamente ligada ao estímulo pela angiotensina II e a ação pró fibrogênica dessa citocina envolve a redução da expressão de metaloproteínas (MMP), aumento da expressão de inibidor tecidual de metaloproteínas (TIMP) e inibidor de ativador de plasminogênio (PAI-1) e aumento da síntese de proteínas de matriz (Bascands e Schanstra, 2005). Entretanto, o mecanismo como isto ocorre ainda não é claro (Figura 1). Os efeitos pró-fibróticos do TGF- β também podem envolver interações com outros fatores de crescimento, como o CTGF (fator de crescimento de tecido conjuntivo) e o PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta), que são sintetizados por fibroblastos. Esses fatores de crescimento possuem atividade mitogênica e induzem a produção de colágeno e fibronectina. Quando os fibroblastos são estimulados por TGF- β , passam a sintetizar esses fatores de forma amplificada (Igarashi *et al.*, 1993)

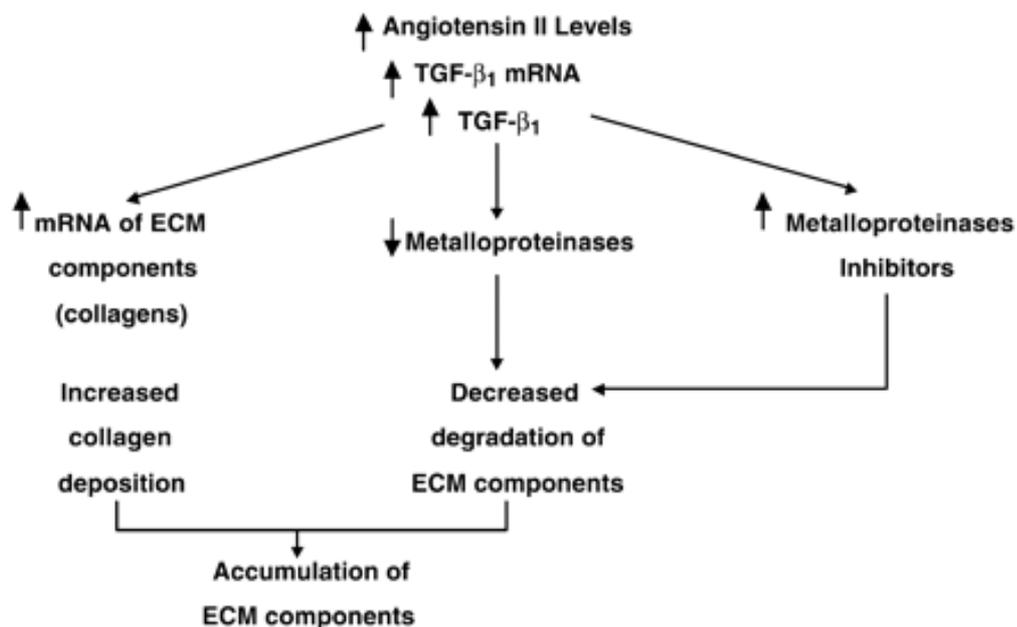


Figura 1 Esquema proposto para patogênese da fibrose intersticial em doença renal progressiva (Klahr e Morrissey, 2002)

O óxido nítrico, um vasodilatador importante no desenvolvimento de fibrose renal, tem sido implicado como efetor de vasodilatação aferente que tem seu efeito

atribuído às prostaglandinas secretadas precocemente após a obstrução ureteral. O papel do óxido nítrico na vasodilatação observada na fase precoce da lesão renal obstrutiva tem sido documentado como fator de proteção do tecido renal, e por isso, sugerido como possível ferramenta terapêutica para atenuar a fibrogênese consequente ao processo obstrutivo (Miyajima *et al.*, 2001). O óxido nítrico é responsável pela hiperemia e vasodilatação da fase inicial da obstrução ureteral. A redução do óxido nítrico durante o curso de uma obstrução ureteral deve contribuir para a queda da circulação renal e da taxa de filtração glomerular, com consequente piora da função renal (Felsen *et al.*, 2003).

Estudos em modelo animal de obstrução ureteral demonstraram que a angiotensina II, um potente vasopressor, estimula a síntese de TGF- β e aumenta o catabolismo de óxido nítrico tendo, portanto, um papel fundamental na progressão da fibrogênese renal (Morrissey *et al.*, 1996). As evidências de que a fibrogênese, consequente à obstrução do fluxo urinário e hidronefrose, é atenuada por diferentes tipos de drogas, indicam a importância de testes em modelos experimentais de nefropatia obstrutiva. A prevenção da fibrose renal e da evolução para a doença renal terminal na nefropatia obstrutiva, sustenta a importância destes estudos experimentais com drogas e manobras que possa modificar a evolução da nefropatia obstrutiva crônica.

Estes modelos, propiciam o estudo dos mecanismos implicados na fibrogênese, desde a reação inflamatória perivascular e intersticial que acompanha o dano túbulo-intersticial com recrutamento de monócitos e infiltrado de macrófagos e miofibroblastos, passando pelo processo de apoptose das células epiteliais seguida da deposição de colágeno no interstício renal com consequente perda funcional do órgão.

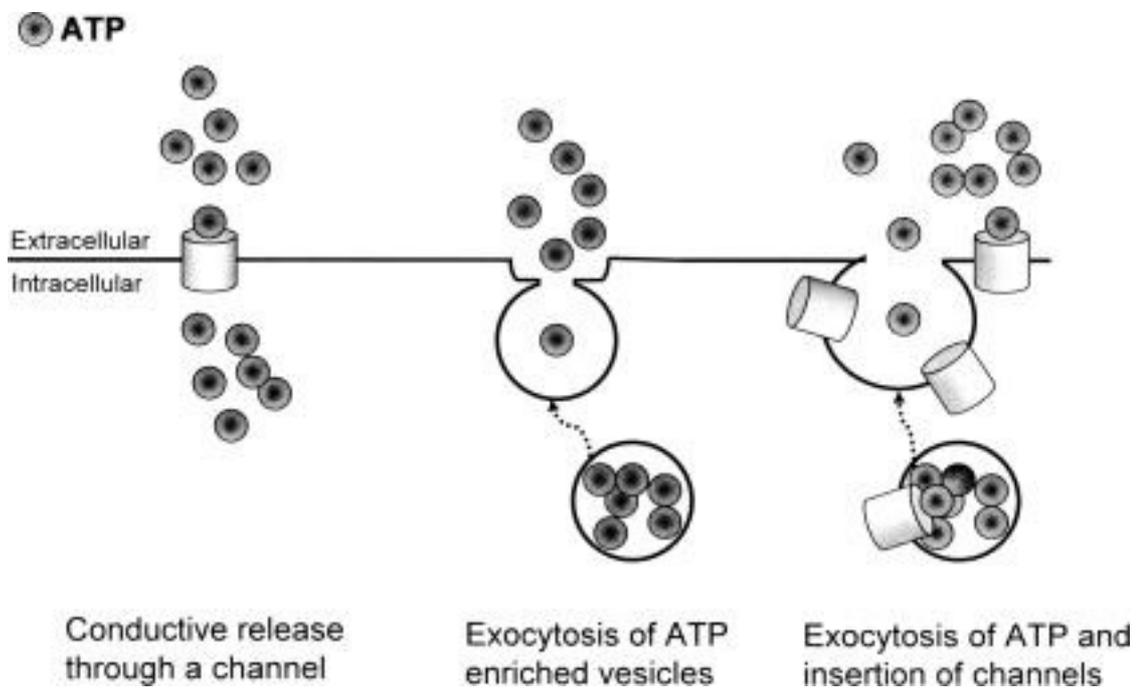
Estudos realizados em nosso laboratório utilizando o micofenolato mofetil, uma droga anti-proliferativa, usada como imunossupressora em transplantes de órgãos, demonstrou que esta droga atenuou o processo inflamatório e fibrogênico em rins de ratos obstruídos, um efeito que não foi alterado pela adição de lisinopril, um inibidor de enzima conversora da angiotensina II (Goncalves *et al.*, 2004). Em outro estudo, utilizamos tratamento com heparina não fracionada que possui um potente efeito anti-inflamatório independente de seu poder anti-coagulante (Wang *et al.*, 2003). Neste trabalho, observamos um efeito benéfico da heparina de baixo peso molecular sobre a deposição de colágeno em interstício renal de ratos submetidos à obstrução ureteral unilateral. No entanto, esta droga levou a um aumento na celularidade como constatado pelo aumento de macrófagos em interstício renal (Pecly *et al.*, 2006).

A doença renal obstrutiva tem um importante papel para o desenvolvimento de perda progressiva da função renal e buscas de novos alvos terapêuticos são cada vez mais importantes no sentido de prevenir ou retardar tal progressão. Neste sentido, os receptores purinérgicos, especificamente o tipo P2X₇, tem sido apontado como um importante indutor de estímulo pró-inflamatório e pró-apoptótico em modelos de doenças reumatológicas (Dell'Antonio *et al.*, 2002) e neurológicas (Sperlagh *et al.*, 2006), porém, ainda pouco estudado em modelos de doença inflamatória renal.

1.2 O estímulo purinérgico

A descoberta de receptores purinérgicos alterou fortemente o nosso conceito acerca da função de nucleotídeos, desde substratos de energia e unidades

estruturais até mensageiros com ações extras e intracelulares (Snyder, 1985). Os primeiros estudos que tentaram demonstrar como o ATP atinge o meio extracelular funcionando como um transmissor, baseando-se no fato de que após ocorrer lise celular, todo o conteúdo da célula é liberado para o meio extracelular, inclusive o ATP (Ferrari *et al.*, 2006). Porém, atualmente sabe-se que a liberação de ATP por muitas células é uma resposta fisiológica e fisiopatológica a estresse mecânico, hipóxia, inflamação e alguns agonistas (Bodin e Burnstock, 2001). Vários estudos demonstraram que existem outros meios de liberação de ATP para o meio extracelular sem necessariamente ocorrer à morte celular como através de exocitose de grânulos ou ações envolvendo canais iônicos e transportadores de membrana (Figura 2) (Bodin e Burnstock, 2001; Lazarowski *et al.*, 2003; Fitz, 2007)



Os mecanismos de liberação do ATP para o meio extracelular incluem a abertura de canais iônicos permeáveis ao ATP, exocitose em vesículas enriquecidas de ATP e/ou exocitose em vesículas contendo canais iônicos. (Fitz, 2007)

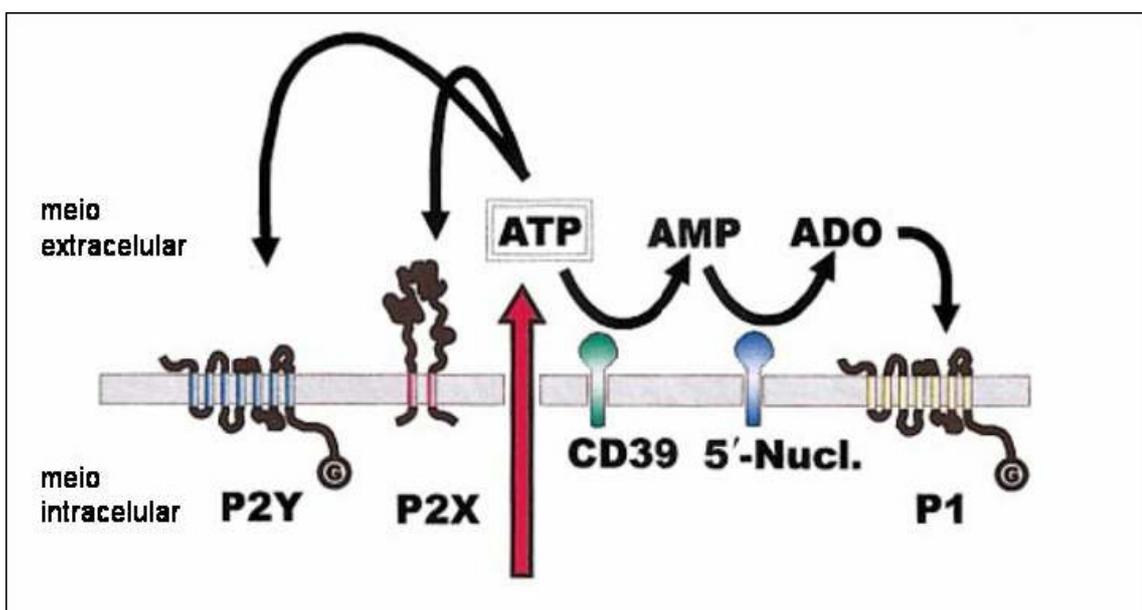
Figura 2 Mecanismos teóricos de liberação do ATP

Uma vez no meio extracelular, o ATP pode atuar em receptores próprios, ser metabolizado por ecto-nucleotidases em suas formas di- ou monofosfato ativando

diferentes receptores (Figura 3) (Zimmermann, 2001).

Os estudos iniciais sobre o papel de nucleotídeos extracelulares revelaram que em determinadas circunstâncias, tais substâncias podem atuar como agentes neurotransmissores Drury e Szent-Gyorgyi (1929). Dean (1978) identificou o ATP como um neurotransmissor. Os estudos de Linden e colaboradores (1985) revelaram a existência de processos celulares mediados por receptores do ATP. Trabalhos utilizando substâncias não metabolizáveis análogas ao ATP, deram suporte definitivo à noção de sítios únicos de reconhecimento do ATP em membrana celular (Burnstock e Kennedy, 1985).

Tendo em vista a larga distribuição de ectonucleotidases nos tecidos, a maioria dos efeitos do ATP extracelular era atribuída ao seu metabólito adenosina. No entanto, estudos utilizando-se de análogos não hidrolizáveis do ATP demonstraram que o nucleotídeo pode afetar a função específica de algumas células, como sugerido pela identificação do ATP em terminações nervosas adrenérgicas e colinérgicas (Williams, 1987).



O esquema ilustra uma situação hipotética de liberação de ATP, onde uma vez no meio extracelular este pode atuar em receptores próprios, ou ainda ser metabolizado pela ecto-nucleotidase fosfato difosfatase 1 (CD39) e pela 5'-nucleotidase,

gerando AMP e adenosina respectivamente. A adenosina por sua vez é capaz de ativar os receptores próprios. (Di Virgilio *et al.*, 2001)

Figura 3 Ação das ecto-nucleotidases sobre o ATPe.

Em 1978, a existência de receptores de membrana plasmática para nucleotídeos extracelulares, receptores purinérgicos P₂, foram formalmente reconhecidos e passaram a ser alvos de intensos estudos Burnstock (1978).

1.3 Receptores purinérgicos

Os receptores purinérgicos têm sido identificados em diferentes tipos de células e se dividem em dois subtipos: P₁ e P₂. Receptores P₁ são sítios de ligação de adenosina e receptores P₂ são responsivos ao ATP (Burnstock, 1983). Os primeiros foram posteriormente subdivididos em quatro grupos (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) os quais se diferenciam pela sua estimulação resultar em aumento ou diminuição de atividade da adenil ciclase via um acoplamento com as proteínas G_S (estimuladora) nos casos dos receptores A_{2A} e A_{2B} e G_i (inibidora) no caso dos receptores A₁ e A₃ (Fredholm *et al.*, 2001). Os receptores P₂ foram formalmente reconhecidos em 1978 por Burnstock (1978) e foram divididos em duas subfamílias: Receptores acoplados a proteína G (P_{2Y}) e receptores ligados a canais iônicos (P_{2X}) (Abbracchio e Burnstock, 1994). Em células de mamíferos, oito receptores P_{2Y} (P_{2Y}₁, P_{2Y}₂, P_{2Y}₄, P_{2Y}₆, P_{2Y}₁₁, P_{2Y}₁₂, P_{2Y}₁₃, P_{2Y}₁₄) e sete receptores P_{2X} (P_{2X}₁₋₇) foram clonados e reconhecidos farmacologicamente (Ralevic e Burnstock, 1998). Os receptores P_{2X} apresentam duas regiões transmembranas com ambas as terminações N- e C- localizadas no meio intracelular. A exceção é o receptor P_{2X}₇ que apresenta uma terminação C- mais longa que os demais receptores da mesma família. Os receptores P_{2Y} apresentam sete regiões transmembranas com as terminações N- e C- no meio extracelular e intracelular respectivamente (Burnstock, 2006)

Os nucleosídeos e nucleotídeos de purinas funcionam como mensageiros intercelulares. (Drury e Szent-Gyorgyi, 1929) demonstraram que a adenosina causa bradicardia, vasodilatação coronariana e diminui a pressão arterial sistêmica em mamíferos. As investigações feitas até o momento demonstram que a adenosina age como vasodilatadora na maioria dos vasos exceto no rim, onde funciona como um vasoconstritor potente (Oswald, 1983). Substâncias como as xantinas, teofilina e cafeína, apesar de inibidores da fosfodiesterase, inibem a formação do AMP cíclico agindo como antagonistas das adenosinas.

Nossos estudos prévios com o sistema purinérgico mostraram aspectos fisiológicos do epitélio tubular renal em que se observou efeito inibitório da ativação purinérgica sobre o efeito antidiurético da vasopressina (Leite Jr. *et al.*, 1990). Ao final dos anos 80, em experimentos utilizando a técnica da microperfusão de túbulo renal isolado, pudemos documentar a presença funcional de receptores purinérgicos do tipo P2Y2 em membrana basolateral (Rouse *et al.*, 1994), e posteriormente em membrana apical de ducto coletor de rim de coelho (Figura 4) (Woda *et al.*, 2002).

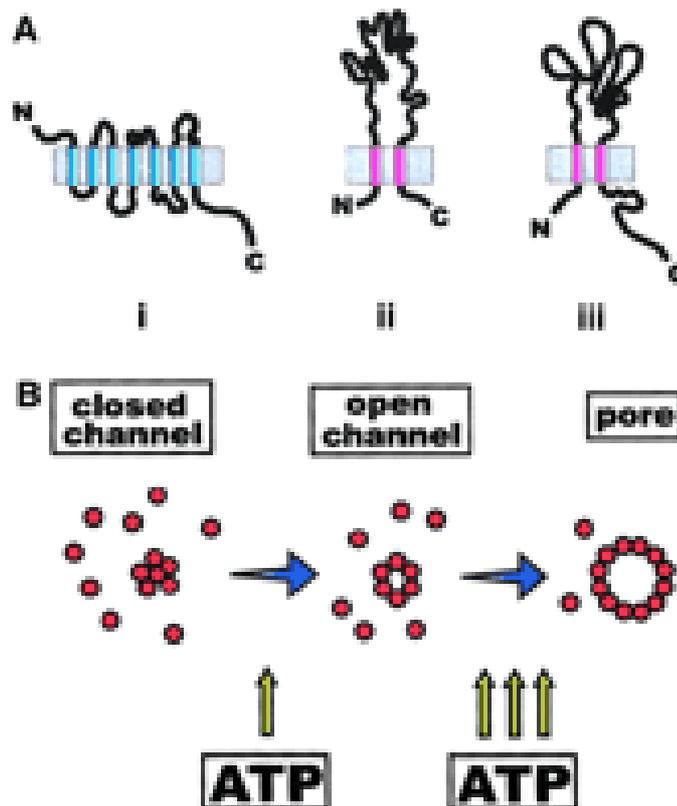


Figura 4 Topologia dos receptores de membrana P2Y e P2X. (A) Receptores P2Y (i) apresentam sete regiões transmembranas e terminais N- e C- nas porções extra e intra-plasmática respectivamente. Receptores P2X (ii) apresentam duas regiões transmembranas e as porções N- e C- terminal são citoplasmáticas. O receptor P2X₇ (iii) diferencia-se dos demais receptores P2X por apresentar uma cadeia C- terminal mais longa. (B) O receptor P2X₇ é capaz de formar um poro diante de estímulo continuado de ATP. (Di Virgilio *et al.*, 2001)

1.3.1 Receptores P2X

Os receptores P2X são canais iônicos capazes de mediar mudanças rápidas na permeabilidade de cátions monovalentes e divalentes (Na^+ , K^+ , e Ca^{++}) quando ligados ao ATP. São formados por subunidades que cruzam a membrana plasmática em dois locais, possuindo as terminações amino (N-) e carboxi (C-) no citoplasma das células (Buell *et al.*, 1996). Um dos membros desta subfamília, P2X₇, tem uma característica peculiar de formar poros de membrana não-seletivos quando

submetidos a estímulos contínuos (Di Virgilio *et al.*, 1995). Estes receptores apresentam uma terminação carboxi maior que a dos outros receptores P2X, a qual está relacionada à propriedade de formação de poros (figura 4) (Di Virgilio *et al.*, 2001) Os receptores P2X são amplamente distribuídos e têm sido associados a muitos dos efeitos dos nucleotídeos extracelulares. Estudos genéticos em camundongos têm identificado muitas propriedades e funções destes receptores, principalmente em neurônios, músculo liso e macrófagos (Buell *et al.*, 1996).

Os receptores P2X são capazes de formar homotrímeros e heterotrímeros, com as exceções do P2X₆, que é capaz apenas de formar heterotrímeros. Os receptores P2X formam canais iônicos, seletivos para os cátions Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ (North e Surprenant, 2000; North, 2002) com grande homologia entre si, com abertura em menos de 10 milisegundos após o estímulo, podendo levar à despolarização da membrana e ao aumento na concentração de Ca²⁺ livre no meio intracelular (North, 2002; Egan *et al.*, 2004).

O quadro 1 mostra um resumo da farmacologia dos receptores da família P2X.

Quadro 1 A família dos receptores P2X.

Receptor	EC50 ATP (μ M)	Antagonistas	Dessensibilização
P2X ₁	1	Suramina PPADS	Rápida
P2X ₂	10	PPADS Suramina	Lenta
P2X ₃	1	PPADS Suramina	Rápida
P2X ₄	7	TNP-ATP	Muito Lenta
P2X ₅	0,5	PPADS Suramina	Pouca
P2X ₆	0,5	PPADS	Não se sabe
P2X ₇	> 100	KN-62 BBG	Inexistente

Principais antagonistas de cada receptor, a dose de ATP para ativá-los e a velocidade de dessensibilização. Rápida = 100 ms. Lenta = 5 – 10 s. (Erb *et al.*, 2006).

1.3.2 Receptores P2X₇

O receptor purinérgico do tipo P2X₇ é um canal iônico que, como outros membros da família P2X, é um mediador não-seletivo da condutância a cátions após a ligação de um agonista purinérgico como o ATP (Collo *et al.*, 1997). Uma breve exposição do receptor P2X₇ ao ATP ou seu ao análogo estável 2',3' O-(benzoyl-4 benzoyl) ATP (BzATP) resulta na abertura de um canal de cátions não seletivo. Entretanto, uma exposição prolongada deste receptor a seu agonista promove a formação de um poro não seletivo que permite a passagem de moléculas hidrofílicas de até 900 Da, incluindo nucleotídeos e corantes fluorescentes (Erb *et al.*, 2006;

Roberts *et al.*, 2006)

A atividade deste receptor se manifesta em poucos tipos celulares, porém pode ser detectada em células da linhagem hematopoiética, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Collo *et al.*, 1997; Di Virgilio *et al.*, 2001)

Em 1996, foi identificado que o BzATP era o principal agonista para o receptor P2X₇, seguido por ATP, 2MeSATP, ATP_S e ADP (Burnstock e Knight, 2004). Por outro lado, este receptor apresenta como antagonistas Zn²⁺, Cu²⁺, suramina e seu análogo NF279, PPADS, azul brilhante G-250 (BBG – brilliant blue G) (Burnstock e Knight, 2004). Sendo o ATP oxidado (ATPo) o mais seletivo estudado (Michel *et al.*, 2000; Fumagalli *et al.*, 2003) capaz de inibir por completo fenômenos dependentes de P2X₇ (Fumagalli *et al.*, 2003) No entanto, o mecanismo exato de ação do ATPo não é completamente conhecido e, recentemente, tem sido discutido sua seletividade, por poder atuar em cinases intracelulares (Di Virgilio, 2003) e possivelmente também em receptores P2Y (da Cruz *et al.*, 2006).

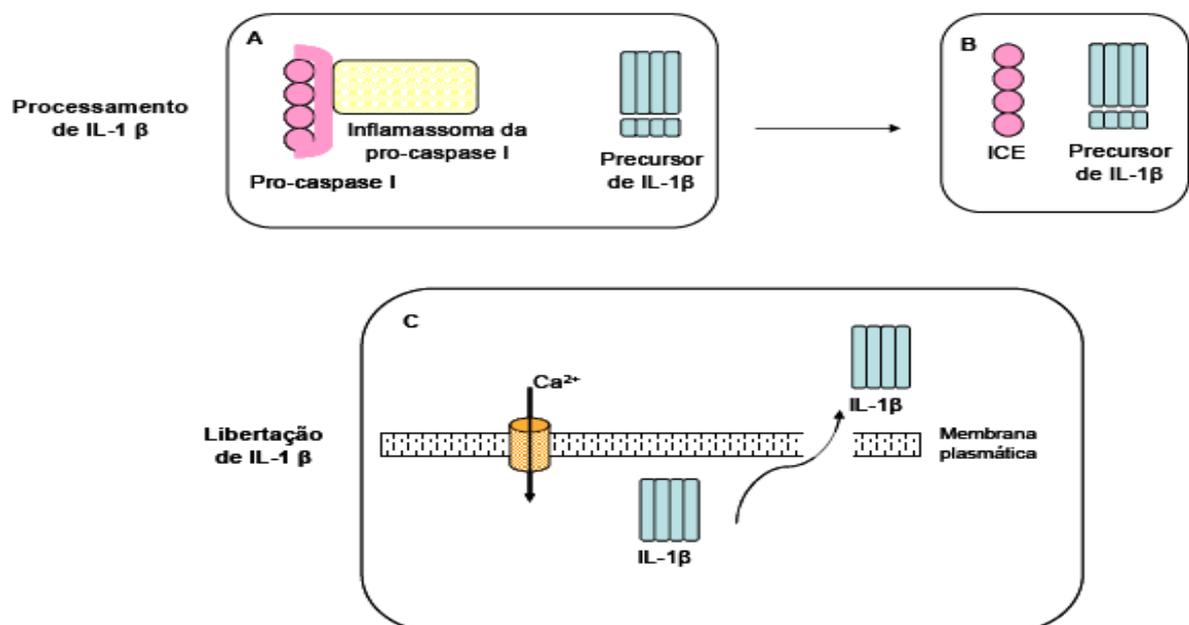
Nucleotídeos, como o ATP, são normalmente encontrados no citoplasma das células e sua presença no meio extra-celular (por exemplo durante o processo de citólise) provoca um sinal de perigo que leva antígenos presentes nas células a iniciar uma resposta imune inata (la Sala *et al.*, 2003) Esta resposta imune pode ser iniciada por uma grande variedade de citocinas como IL-1-β, IL-18, IL-6 e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). Todas essas citocinas podem ser produzidas pela ativação do receptor P2X₇. Em contraste, exposição crônica a doses baixas de ATP ativa células dendríticas e macrófagos a produzirem citocinas anti-inflamatórias (IL-10, antagonista do receptor IL-1 (IL-1RA)) que atuam no sentido de suprimir a resposta inflamatória e favorecem o desenvolvimento de uma resposta mediada por linfócitos Th2. O receptor P2X₇ tem um importante papel em todo esse processo de

resposta imune e/ou antiinflamatória desenvolvida pelo organismo (la Sala *et al.*, 2003). Originalmente produzida como um precursor de 31-kDa, as duas isoformas de IL-1, pró-IL-1 α e pró-IL-1 β , são clivadas subsequentemente pela enzima conversora de interleucina (ICE, também conhecida como caspase 1) a produzir suas formas maduras de 17-kDa. IL-1 α e IL-1 β são conhecidas por possuírem ações biológicas idênticas, apesar da IL-1 β ser inativa na sua forma imatura. A liberação de IL-1 β é conhecida por promover diversas respostas, como a ativação de macrófagos, células T e cascatas de sinalização, assim como a indução da ciclooxigenase do tipo 2 (COX 2) e febre. Já foi demonstrado que a IL-1 é importante em uma série de doenças como artrite reumatóide, esclerose múltipla, asma e doença da obstrução pulmonar crônica (Dinarello, 2002; Lister *et al.*, 2007).

A sinalização intracelular em resposta à ativação de receptores do tipo P2X₇ pelo ATP resulta na estimulação de transcrição genética e formação de pro IL-1 β e uma diminuição dos níveis intracelulares de K⁺. Após seu efluxo via receptor P2X₇, esta mudança na concentração de K⁺ leva ao estímulo da enzima caspase 1 que cliva a pro IL-1 β em IL-1 β que é secretada para o meio extra-celular como documentado em macrófagos de camundongos (Perregaux *et al.*, 1992). O estímulo dos receptores P2X₇ pode induzir a proliferação e apoptose celular, e esta sinalização parece estar ligada a ativação de fosfolipase D e proteína cinase D (PKD). No entanto, estudos mostram que a ativação de proteína Kinase C e MAPK (*mitogen activated protein kinase*) pode ter um papel intermediário na ativação de PKD (Auger *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2005).

(Mariathasan *et al.*, 2006) descreveu a importância da regulação da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 pelo receptor P2X₇ e o mecanismo pelo qual esta regulação ocorre. Foi demonstrado que o receptor P2X₇

está acima do inflamossomo na cascata de sinalização, um importante complexo de proteínas citosólicas que é conhecido por regular a ativação da caspase 1 e, subsequentemente, o processamento da IL-1 β e IL-18 (Figura 5). Considerando-se que a não regulação do inflamossomo provoca doenças inflamatórias, fica claro que a inibição da ativação do inflamossomo por antagonistas do receptor P2X₇ pode afetar a extensão dessas doenças inflamatórias (Mariathasan *et al.*, 2006; Lister *et al.*, 2007). Entretanto, o receptor P2X₇ pode não ser o único receptor purinérgico envolvido na liberação de IL-1 β . Um estudo recente mostrou que a liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares dependente de ATP também está envolvida na secreção de pró-IL-1 β , apesar de não ser capaz de liberar IL-1 β madura de forma independente (Lister *et al.*, 2007)



A) a IL-1 β é sintetizada na forma de precursor. Nos lisossomas secretores, além do precursor da IL-1 β , existe a procaspase I inativa. Um complexo proteico, designado por inflamossoma de pro-caspase I, B) torna a enzima numa sua forma ativa, a caspase I (ICE). C) A ICE transforma o precursor de IL-1 β na sua forma ativa, e a IL-1 β é liberada dos lisossomas para o exterior celular.

Figura 5 Esquema representativo do processamento e liberação de IL-1 β .

Além da secreção de IL-1 β , o receptor P2X₇ também está envolvido na síntese e liberação da citocina IL-18 (fator indutor de interferon- γ), que também é

produzida através da quebra da pró-IL-18 pela caspase 1. Diferentemente da secreção de IL-1 β , a secreção de IL-18 parece ser menos dependente de um estímulo inicial com LPS (Mariathasan *et al.*, 2006; Lister *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que a ausência ou o bloqueio de receptores P2X₇ está associado à reação inflamatória de menor intensidade, como observado em nosso estudo em que utilizamos camundongos com deleção para o gene deste receptor (Goncalves *et al.*, 2004).

1.4 O papel da ativação purinérgica nas doenças renais

A fibrose intersticial renal é o final da maioria das doenças renais progressivas, guardando forte correlação com a perda da função renal. Alguns modelos de doença renal têm sido úteis no estudo dos mecanismos de doença renal progressiva e fibrose intersticial como os modelos de glomerulonefrite, ablação de massa renal funcionante com hiperfiltração glomerular, esclerose glomerular e proteinúria. A obstrução ureteral unilateral (OUU) em animais tem sido amplamente empregada como um modelo de doença túbulo-intersticial evolutiva (Bell, 1950) (Yarger *et al.*, 1991). A OUU está associada à infiltração mononuclear, diferenciação e proliferação de fibroblastos, aumento da deposição extracelular de proteínas de matriz e atrofia tubular (Nagle *et al.*, 1973; Nagle e Bulger, 1978; Schreiner *et al.*, 1988). Embora muitas citocinas estejam envolvidas na fisiopatologia da OUU, tem sido bem documentado que o *transforming growth factor* β (TGF- β) é a mais importante molécula fibrogênica, assumindo um papel preponderante também na patogênese da fibrogênese renal (Klahr e Morrissey, 2002). Macrófagos são uma fonte de TGF- β , embora a sua secreção pelas células epiteliais assumam também

grande importância neste modelo (Diamond *et al.*, 1994).

O modelo de fibrose intersticial renal da obstrução ureteral unilateral vem sendo utilizado por vários pesquisadores para a elucidação dos diversos mecanismos implicados na fibrogênese renal. Além disso, diversos testes terapêuticos que possam atenuar a evolução da fibrose renal têm sido feitos em animais obstruídos. Recentemente, documentamos os efeitos de drogas como o micofenolato mofetil, uma droga anti-proliferativa utilizada rotineiramente como, imunossupressor em indivíduos transplantados, associada ou não ao lisinopril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina. Este estudo demonstrou que a diminuição da população de macrófagos pode atenuar a deposição de colágeno neste modelo fibrogênico (Goncalves *et al.*, 2004).

Muito embora a fisiopatologia de várias doenças renais tenha sido amplamente explorada, até o momento poucos estudos têm investigado o papel dos receptores purinérgicos nos mecanismos de doença renal. Ainda que já se saiba da existência da proteína do receptor P2X₇ no trato urinário, as funções biológicas e o potencial patológico desse receptor e suas cascatas sinalizadoras no rim ainda não foram adequadamente exploradas e elucidadas (Hillman *et al.*, 2004). Um estudo recente elaborado por (Vonend *et al.*, 2004) mostrou que receptores do tipo P2X₇ estão pouco expressos no rim em condições normais. Dois grupos mostraram que embora pouco expressos em condições normais em rins de ratos, células mesangiais em culturas mostraram um aumento da expressão desses receptores quando expostos a mediadores inflamatórios como LPS, interferon- γ ou TNF- α (Schulze-Lohoff *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 2000). RNAm do P2X₇ também foi encontrado em podócitos diferenciados em cultura (Fischer *et al.*, 2001). O receptor P2X₇ foi primeiramente encontrado no endotélio normal de bexiga de ratos adultos

(Lee *et al.*, 2000) e agora tem sido encontrado em tipos celulares específicos de rins de camundongos em desenvolvimento, epitélio tubular normal adulto e epitélio de cistos em modelos de doença renal policística em camundongo (Hillman *et al.*, 2002), assim como em doença renal policística autonômica recessiva em humanos (ARPKD) (Hillman *et al.*, 2004). No mesmo trabalho (Hillman *et al.*, 2002) comprovou a existência de receptores P2X₇ em epitélio de ducto coletor normal em camundongos após 4 semanas de vida embora a importância funcional desta descoberta permaneça obscura.

Solini *et al.*, 2005 examinaram recentemente os efeitos do estímulo a estes receptores sobre a expansão da matriz mesangial induzida pela hiperglicemia. Neste estudo, os autores demonstraram a importância da ativação deste receptor sobre a secreção de TGF- β , uma importante citocina fibrogênica e, como consequência, um aumento da matriz mesangial secundária ao estímulo do receptor P2X₇ por ATP e. Outro estudo mostrou que a ativação de receptores P2X₇ em culturas de células mesangiais por ATP e levaram a apoptose e necrose das mesmas o que comprova a participação desses receptores como causadores de morte de células mesangiais em doenças glomerulares (Schulze-Lohoff *et al.*, 1998).

Diante das evidências da presença do receptor P2X₇ em vários tipos celulares do trato urinário, surgem propostas interessantes de como seria o funcionamento deste receptor no rim. Trabalhos recentes estão em curso para tentar determinar a função desses receptores *in vivo* e que tipo de efeito biológico eles teriam (Hillman *et al.*, 2004).

A identificação das funções do receptor P2X₇ no rim, particularmente no contexto de doenças, pode levar a descoberta de novos alvos terapêuticos em humanos como a manipulação da sinalização de APT alterando a expansão cística e

se esses receptores estão envolvidos em processos de morte celular e inflamatória, eles podem ser alvos terapêuticos para redução de perda da função renal em condições patológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar o papel do receptor purinérgico P2X₇ no processo de inflamação e fibrose renal após 7 e 14 dias obstrução ureteral unilateral

2.2 Objetivos específicos

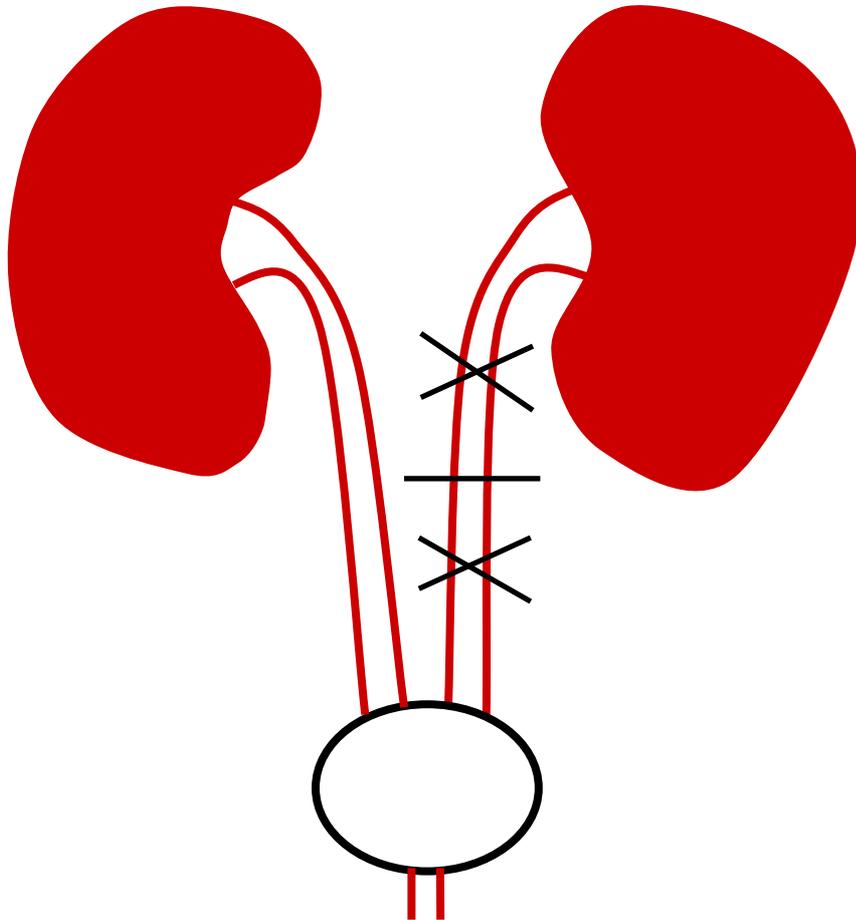
- Quantificar a inflamação intersticial em todos os grupos após OUU
- Quantificar a deposição de colágeno intersticial em todos os grupos após OUU
- Quantificar a citocina TGF- β em todos os grupos após OUU
- Quantificar o número de túbulos atróficos em todos os grupos após OUU
- Quantificar o número de apoptose em todos os grupos após OUU
- Localizar o receptor P2X₇ em cortes histológicos em todos os grupos após OUU

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e protocolo experimental

O estudo foi realizado em camundongos machos da raça C57Bl6 pesando entre 30 e 35 gramas e com idade entre 11 e 13 semanas. Os camundongos Knockout para o receptor P2X₇ [P2X₇ (-/-)] foram inicialmente gerados em camundongos 129/Ola x C57Bl6 e posteriormente cruzados por 12 gerações de camundongos C57Bl6 conforme descrito recentemente (Burnstock, 1978; Coutinho-Silva *et al.*, 1999) e gentilmente cedidos pelo Dr. James Mobley (PGRD, Pfizer inc, Groton, CT, USA). Os animais P2X₇ (-/-) foram desalinhados na região T1527 a T1605 localizada no exon 13. Camundongos selvagens (WT) de mesmo background genético (C57Bl6) foram usados como controle. Os animais foram mantidos em ciclo sono-vigília e temperatura de 25°C sendo alimentados com ração padrão de camundongos e água *ad libitum*. Os camundongos foram anestesiados com ketamina (50mg/kg) e Xilazina (5mg/Kg) intraperitonealmente em condições estéreis. Posteriormente realizou-se incisão mediana abdominal de cerca de 3cm com exposição do ureter esquerdo onde foram feitas ligaduras com fios de seda 6-0 em dois pontos um proximal e outro distal ao rim, sendo o ureter seccionado entre as duas ligaduras (Figura 6). A pele foi suturada com fio de mononylon 4-0 e os camundongos foram mantidos em gaiolas limpas. Os animais foram divididos em 6 grupos com 5 animais cada como se segue: Grupo controle (C): animais não foram submetidos a nenhuma manipulação cirúrgica; Grupo sham (SH): animais selvagens foram submetidos a manipulação cirúrgica de cavidade abdominal sem ligadura do

ureter; Grupo sham P2X₇ (-/-) (SHKo): animais knockout foram submetidos a manipulação cirúrgica de cavidade abdominal sem ligadura do ureter; Grupo OUU WT: animais selvagens foram submetidos à obstrução ureteral unilateral e grupo OUU P2X₇ (-/-) (OUUKo): animais knockout foram submetidos à obstrução ureteral unilateral. No final de 7 e 14 dias após OUU, os camundongos foram anestesiados novamente com ketamina e xilasina e submetidos a punção de ventrículo esquerdo com scalp numero 18 e perfusão sistêmica com solução de citrato (3.5%) por 20 minutos seguido de secção de veia femural esquerda por onde se deu a saída do soro injetado. Após remoção de sangue dos tecidos renais, os animais foram submetidos à nefrectomia bilateral e os rins foram seccionados longitudinalmente em dois fragmentos. Um dos fragmentos foi imerso numa solução de formol tamponado 10% onde permaneceu por 24 horas e posteriormente foi incluído em blocos de parafina, enquanto a outra metade foi conservada em um freezer a – 70 °C. Para a análise histomorfométrica, os blocos foram cortados na espessura de 3µm num micrótomo e montados em laminas histológicas sem lisina, enquanto que para análise imunohistoquímica, as lâminas foram previamente lisinadas para receber os cortes de tecido.



Ureter esquerdo obstruído em dois pontos distintos com secção entre eles.

Figura 6 Representação esquemática do modelo de obstrução ureteral unilateral.

3.2 Histomorfometria

A avaliação histomorfométrica foi realizada usando um sistema de análise de imagem constituído por uma câmara digital (Coolpix 990, Nikon, Japan) acoplada a um microscópio de luz (Eclipse 400, Nikon, Japan). As imagens histológicas foram capturadas usando uma lente objetiva com aumento de 40x de forma aleatória, sem o observador saber qual o grupo estava analisando. Foram avaliados 20 campos histológicos por animal em um total de 100 campos por grupo, sendo 50 de córtex e

50 de medula. A área intersticial do córtex e medula renal ocupada por colágeno foi estimada pela captação de imagens de alta qualidade (2048 x 1536 pixels buffer) considerando a percentagem de áreas coradas no total de campos histológicos usando o programa Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) conforme descrito previamente (Fukuda *et al.*, 2001). Foi realizada análise morfológica através da coloração por hematoxilina-eosina (HE) para identificar as relações morfológicas entre núcleos e citoplasmas celulares e Periodic-acid Schiff (PAS) para mensuração de atrofia tubular.

3.3 Técnica de hematoxilina-eosina

A técnica em hematoxilina-eosina (HE) é clássica, dicrômica e geral, uma vez que possui dois corantes: hematoxilina, que cora todos os núcleos de todas as células, e eosina, que cora o citoplasma de todas as células. O objetivo dessa técnica é a visualização do núcleo e do citoplasma das células. No método padrão, utilizamos mais comumente a hematoxilina de Harris e a eosina aquosa. Os núcleos, polirribossomas, e alguns sais de cálcio se coram de azul; músculo, fibrina, colágeno, hemácias em rosa forte. HE, um corante, cujo princípio ativo é a hemeína ou hematina, resultante da oxidação da primeira. A oxidação se obtém da maturação da hematoxilina, a qual pode ser obtida naturalmente ou acelerada pela adição de sais oxidantes com: óxido de mercúrio, água oxigenada, permanganato de potássio, perborato de sódio ou iodato de potássio. Estes oxidantes iniciam o processo de maturação que continua com o tempo. O método de HE produz excelentes resultados desde que se observem rigorosamente as regras de fixação, idade do corante, etc. Há dois métodos de coloração com a HE:

Método Regressivo: os cortes são super corados em solução de hematoxilina neutra. O excesso é removido por meio de diferenciador (solução de álcool-ácido) controlando-se os cortes ao microscópio. Os cortes são depois neutralizados com solução fraca de água amoniacal ou carbonato de lítio. Um corte bem diferenciado deve mostrar citoplasma incolor, e o núcleo deve estar bem corado e mostrando metacromasia nuclear. A eosina demonstra inclusões e alterações citoplasmáticas. A hematoxilina cora os elementos basófilos nucleares e citoplasmáticos e a eosina cora as estruturas citoplasmáticas acidófilas.

Neste trabalho, utilizamos o método regressivo de coloração.

3.4 Técnica de PicroSirius

O PicroSirius é um método reconhecidamente seletivo para a detecção de colágeno nos tecidos (Junqueira *et al.*, 1979), mas pode obscurecer estruturas colágenas mais finas sob certas condições de microscopia de campo claro, devido à intensa coloração citoplasmática em amarelo. Este problema é solucionado realizando-se um tratamento prévio do tecido com ácido fosfomolibdico 0,2%, por 1 minuto, o que torna o citoplasma menos corado (Dolber e Spach, 1987)

A afinidade química do PicroSirius pelas fibras colágenas é demonstrada pela coloração vermelha, na observação das lâminas em microscopia óptica (Dolber *et al.*, 1993).

Então, para confirmar a presença de colágeno nos rins obstruídos dos camundogos, os cortes renais foram desparafinizados em xilol, reidratados em alccol e tratados com uma solução de ácido fosfomolibdico 0,2% por 1 minuto. Após a retirada deste ácido, as lâminas foram coradas em solução de PicroSirius F3BA

0,1% em ácido pícrico aquoso saturado, por 90 minutos. A seguir, os cortes foram lavados com ácido clorídrico 0,01N durante 2 minutos e, subseqüentemente, em etanol 70% por 45 segundos. As lâminas foram então desidratadas rapidamente em soluções crescentes de etanol, clarificadas em xileno e montadas em Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha) para posterior análise quantitativa.

3.5 Imunohistoquímica

A celularidade intersticial foi caracterizada e os macrófagos foram identificados no córtex e medula renal através do anticorpo monoclonal f4/80 rato anti-camundongo (Serotec Ltd, Oxford, UK). A análise de miofibroblastos intersticiais foi realizada através do anticorpo monoclonal α -actina músculo liso (α -SMA) (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA). A citocina pró fibrogênica transforming growth factor- β 1 (TGF- β) foi avaliada no tecido renal através de um anticorpo policlonal pan-especifico contra TGF- β (R&D system Inc., Minneapolis, MN, USA). A expressão e localização do receptor P2X₇ caracterizada através do anticorpo policlonal anti-P2X₇ (Alomone, Jerusalém, Israel).

Cortes de parafina de 3 μ m foram preparados e montados em lâminas contendo 0,01% poli-L-lisina (Sigma, St. Louis, EUA) para permitir uma melhor adesão do corte a lâmina. Primeiramente as lâminas foram desparafinizadas e para isso, foram colocadas em estufa por 20 minutos visando o derretimento da parafina. As lâminas foram então, submetidas à três banhos de 15 minutos sucessivos em xilol e em seguida, as mesmas foram hidratadas em três banhos de 5 minutos em concentrações decrescentes de álcool (100% e 70%) e, finalmente, lavadas por três vezes durante 10 minutos em PBS. Após a desparafinização, procedeu-se a

recuperação antigênica com as lâminas sendo incluídas em uma panela a vapor com tampão citrato pH 6.0 à temperatura de 70°C por 30 minutos e resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos. Após serem lavadas rapidamente em água corrente, as lâminas foram embebidas em uma solução contendo peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂) em metanol e mantidas no escuro por 15 minutos a fim de bloquear a peroxidase endógena do tecido. Após lavagem em água destilada e PBS, as lâminas foram incluídas em uma solução de bloqueio contendo albumina de soro bovino 5% em PBS (PBS-BSA5%) e cobertas com parafilme por 1 hora. Anticorpos primários contra os antígenos específicos descritos acima, diluídos em albumina de soro bovino 3% em uma solução 1:50 foram, então, encubados em câmara úmida a 4°C e mantidos durante 12 horas. Controles negativos das reações foram preparados usando albumina de soro bovino 3% sem o anticorpo primário. Após atingir a temperatura ambiente, os cortes foram lavados em PBS-tween 0,25% por 5 minutos sendo então incluídos os anticorpos secundários. Para o anticorpo f4/80, foi usado o anticorpo secundário biotinilado coelho anti-rato (Vector labs, Burlingame, CA, USA) que foi encubado por 45 minutos seguido da encubação com o complexo avidina-peroxidase (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) por 1 hora. Para a detecção da α -SMA o anticorpo monoclonal foi biotinilado usando o kit de peroxidase DAKO ARKtm (DAKO corp., USA, cat. Numero K3954). Para a detecção da citocina TGF- β e do receptor P2X₇ foi usado o kit de detecção mouse on mouse histar 4000 (Serotec, Raleigh, USA). Após a inclusão do anticorpo secundário, os cortes foram novamente lavados com PBS por 5 minutos e a revelação do anticorpo foi realizada com diaminobenzidina (DAB + substrate-chromogen system K3468, Dako Corporation). Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris por 1 a 2 minutos e lavados em água corrente destilada, desidratados em soluções alcoólicas com

concentrações crescentes (70% e 100%) por três vezes durante 5 minutos e clarificados com xilol por 5 minutos para posterior montagem das laminas e lamínulas, que foi feito em Entellan® e examinados a microscopia de luz (Axioplan, Zeiss). A quantificação das células f4/80 positivas foi expressa por número de células por campo. Miofibroblastos e TGF- β tiveram seus resultados expressos em área de superfície onde se dividiu a área marcada pelo anticorpo pelo total de tecido nos campos histológicos.

3.6 Atrofia tubular

Utilizando a coloração de PAS que delimita a membrana basal tubular, o total de túbulos atróficos por campo foi determinado conforme descrito anteriormente (Jepsen *et al.*, 1979). Os túbulos atróficos foram identificados pelo espessamento e as vezes duplicação da membrana basal e em determinadas ocasiões pelo grau de achatamento das células epiteliais tubulares. Os resultados foram apresentados como o número de túbulos atróficos por campo em um aumento de 40x na lente objetiva do microscópio.

3.7 Detecção de apoptose

Apoptose é uma forma de morte celular programada que elimina células comprometidas ou supérfluas do organismo. É controlada por múltiplos sinais e vias que medeiam respostas diversas como crescimento, sobrevivência e morte. O modelo de obstrução ureteral unilateral leva a um aumento do número de células apoptóticas renais o que contribui para a perda da função do rim comprometido ao longo do tempo. Para quantificarmos o número de células apoptóticas nos grupos

estudados, utilizou-se o método de TUNEL usando o kit fluorescente de detecção de apoptose *in situ* ApopTag (Chemicon Int. Inc., Temecula, CA, USA). Após desparafinização das lâminas conforme protocolo descrito no item 3, aplicou-se sobre os tecidos uma enzima de digestão de proteína ou proteinase k (20µg/ml) por 15 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em jarros de vidro com PBS 2 vezes por 5 minutos cada. Após retirada do excesso de líquido ao redor do corte, foi aplicado imediatamente 50 µl de tampão de equilíbrio diretamente sobre os cortes por 10 segundos e posteriormente, 50 µl da enzima TdT a qual permaneceu encubada em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Após alcançarem temperatura ambiente, as lâminas foram colocadas novamente em jarros de vidro contendo tampão STOP/WASH onde foram agitadas por 15 segundos e encubadas por 10 minutos em temperatura ambiente sendo, posteriormente, lavadas em PBS por 3 vezes durante 1 minuto cada e, após retirada do excesso de líquido ao redor do tecido, aplicado 35 µl de anti-digoxigenina conjugada. As lâminas permaneceram em câmara úmida durante 30 minutos em temperatura ambiente sem exposição à luz. Realizou-se então, lavagem das lâminas em PBS por 4 vezes durante 2 minutos cada e aplicou-se 30 µl de dihidroclorato de 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Por fim, as lâminas foram montadas em óleo de imersão para posterior observação em microscópio apropriado. A metodologia foi aplicada seguindo as recomendações do fabricante. O número de células TUNEL positivas foi contado de maneira cega em um total de 60 campos aleatórios de córtex e medula por grupo.

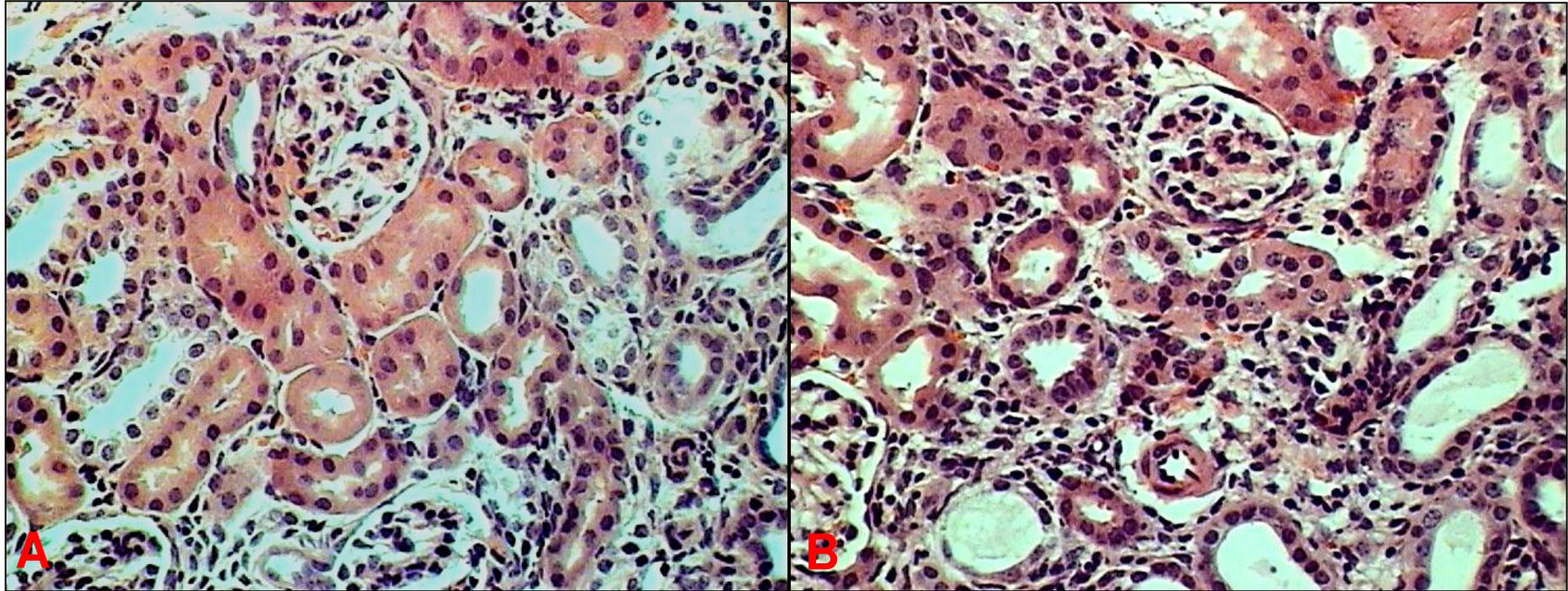
4 ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Comparação entre grupos foram feitas por análise de variância. Usou-se o teste Tukey como pós-teste. As figuras foram representadas por histogramas. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

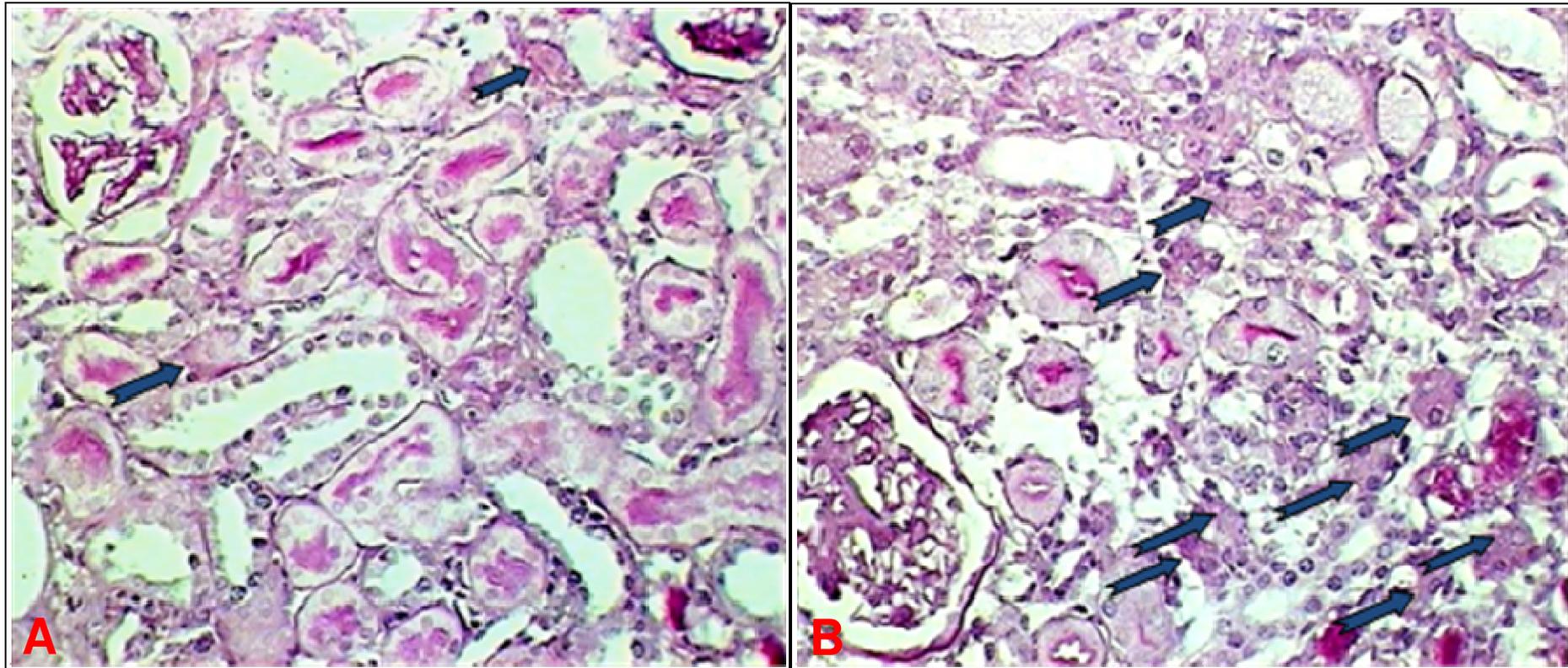
5.1 Descrição da histomorfologia renal

Animais OUU WT e OUU P2X₇ (-/-) exibiram uma atrofia cortical e medular proeminente com dilatação e atrofia tubular severa (principalmente ductos coletores), alguns contendo células epiteliais apoptóticas que foram observadas em todas as regiões. Houve um aumento do espaço intersticial com edema, células inflamatórias e fibrose. Como pode ser observado na figura 7, animais do grupo OUU P2X₇ (-/-) tiveram menos edema e inflamação em interstício renal quando comparados aos animais do grupo OUU WT (Figura 7 A e B) assim como menos lesão e atrofia tubular (Figura 8A e 8B). Células inflamatórias intersticiais foram encontradas em córtex e medula sendo composta principalmente por macrófagos, que estavam em maior número nos rins dos animais do grupo OUU WT quando comparados ao grupo OUU P2X₇ (-/-). Uma moderada quantidade de colágeno foi encontrada principalmente em zonas medulares atroficas e em menor quantidade em áreas corticais.



A figura A representa os animais OUU P2X₇ (-/-) e a figura B representa os animais do grupo OUU WT após 14 dias de OUU

Figura 7 Morfologia renal pela coloração de Hematoxilina eosina

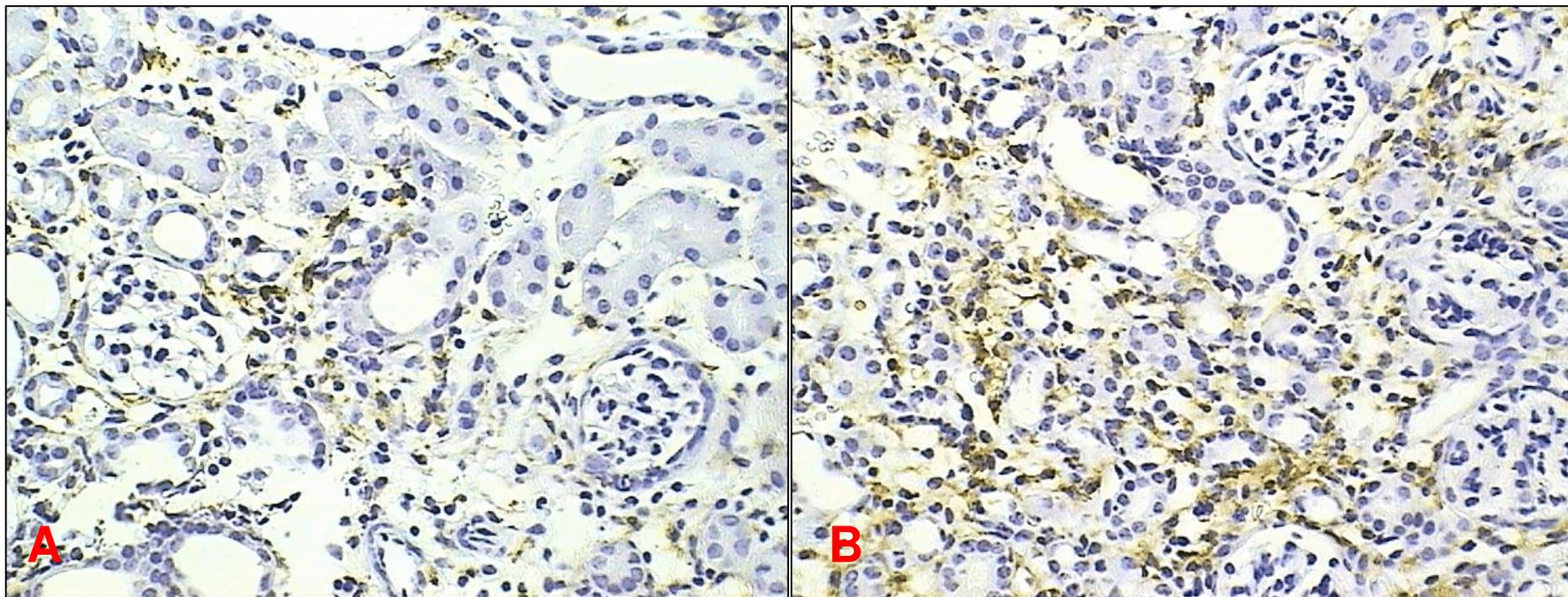


A figura A representa os animais OUU P2X₇ (-/-) e a figura B representa os animais do grupo OUU WT após 14 dias de OUU. As setas azuis indicam túbulos atróficos

Figura 8 Atrofia tubular pela coloração de PAS

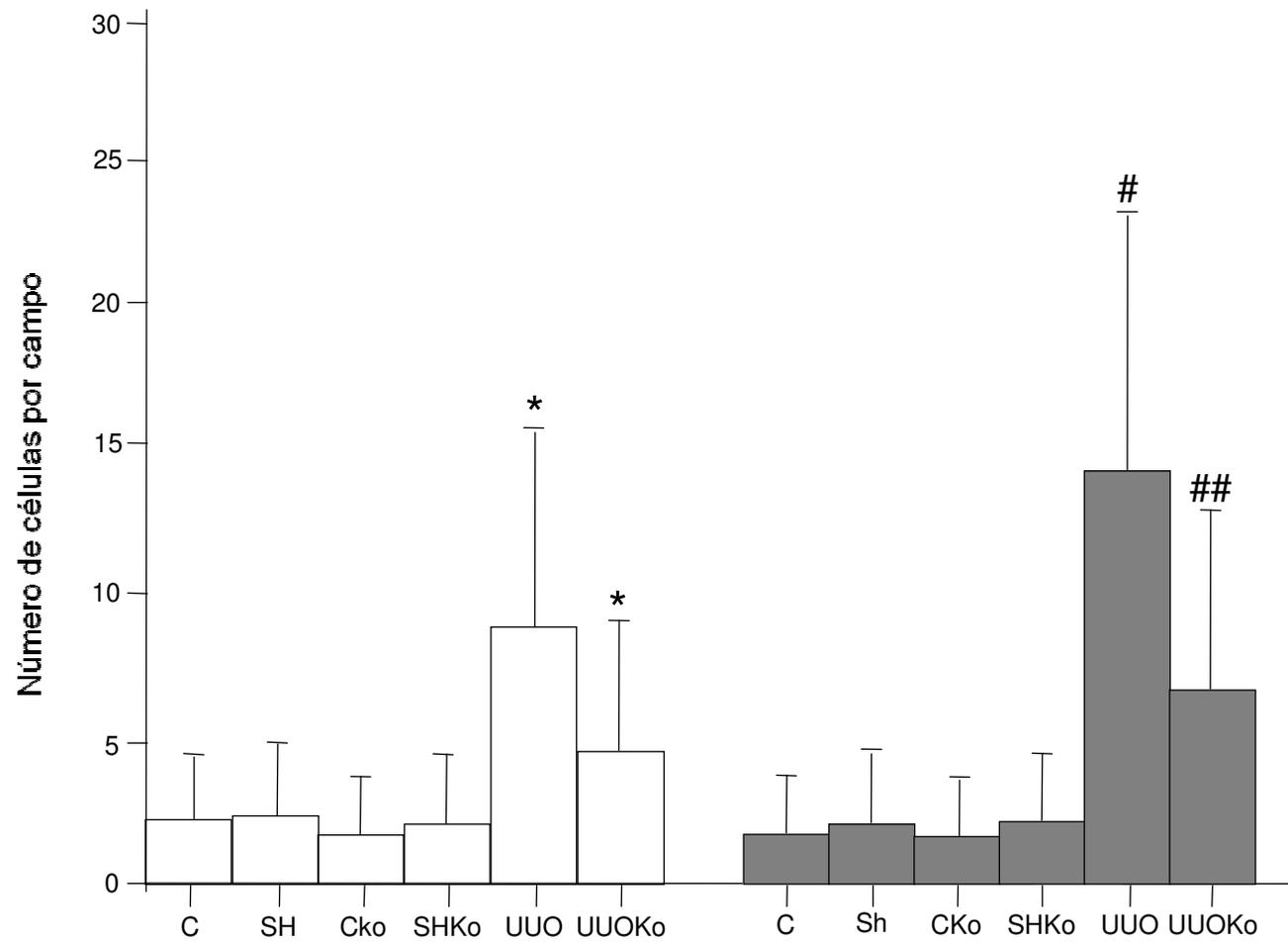
5.2 Inflamação renal

A marcação de macrófagos positivos para f4/80 encontrava-se aumentada após 14 dias em todos os rins de animais submetidos à OUU quando comparado aos grupos controle (Figuras 9A e 9B). Entretanto, em análise comparativa entre os grupos obstruídos mostraram uma redução de 43% na marcação positiva de macrófagos nos animais OUU P2X₇ (-/-) quando comparados aos animais OUU WT ($P < 0,001$). Ao analisarmos os rins após 7 dias de obstrução verificamos também uma diminuição de células inflamatórias no grupo knockout, porém, este resultado não foi estatisticamente significativo. A marcação de células f4/80 positivas foi 26,2% menor no grupo OUU P2X₇ (-/-) quando comparado ao grupo OUU WT ($P > 0,05$). Não houve aumento de macrófagos intersticiais nos rins dos grupos C e S. Os valores são mostrados nas tabelas 1 e 2 e representados na figura 10.



A figura A representa o grupo OUU P2X₇ (-/-) e a figura B representa o grupo OUU WT após 14 dias de OUU

Figura 9 Marcação de macrófagos através de imunohistoquímica para f4/80

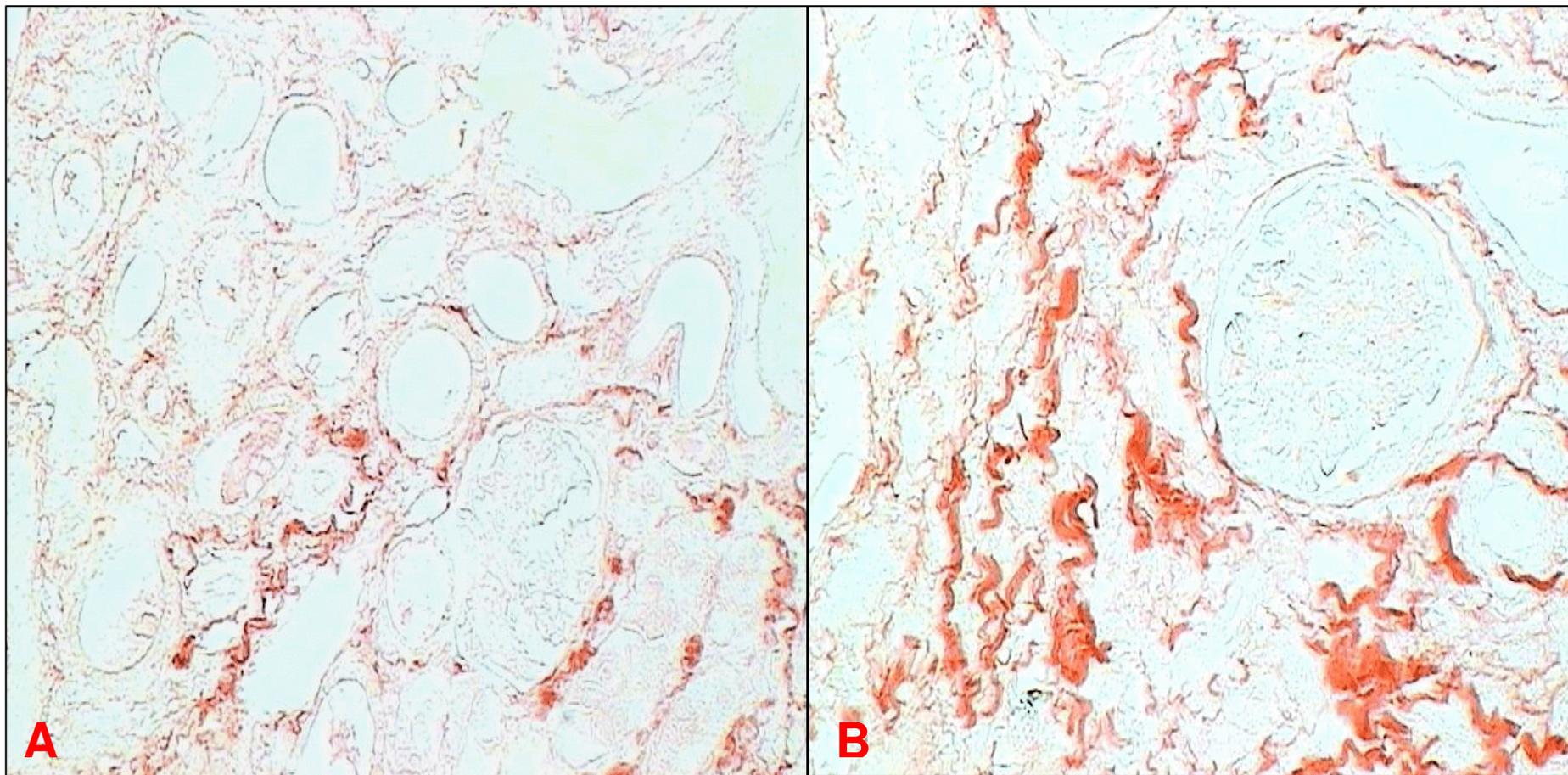


Representação da quantidade de macrófagos em interstício renal de camundongos após 7 dias (□) e 14 dias (■) de UUO. *P<0,001 vs demais grupos; #P<0,001 vs UUOKo e ##P<0,001 vs demais grupos

Figura 10 Quantificação do número de células f4/80 positivas

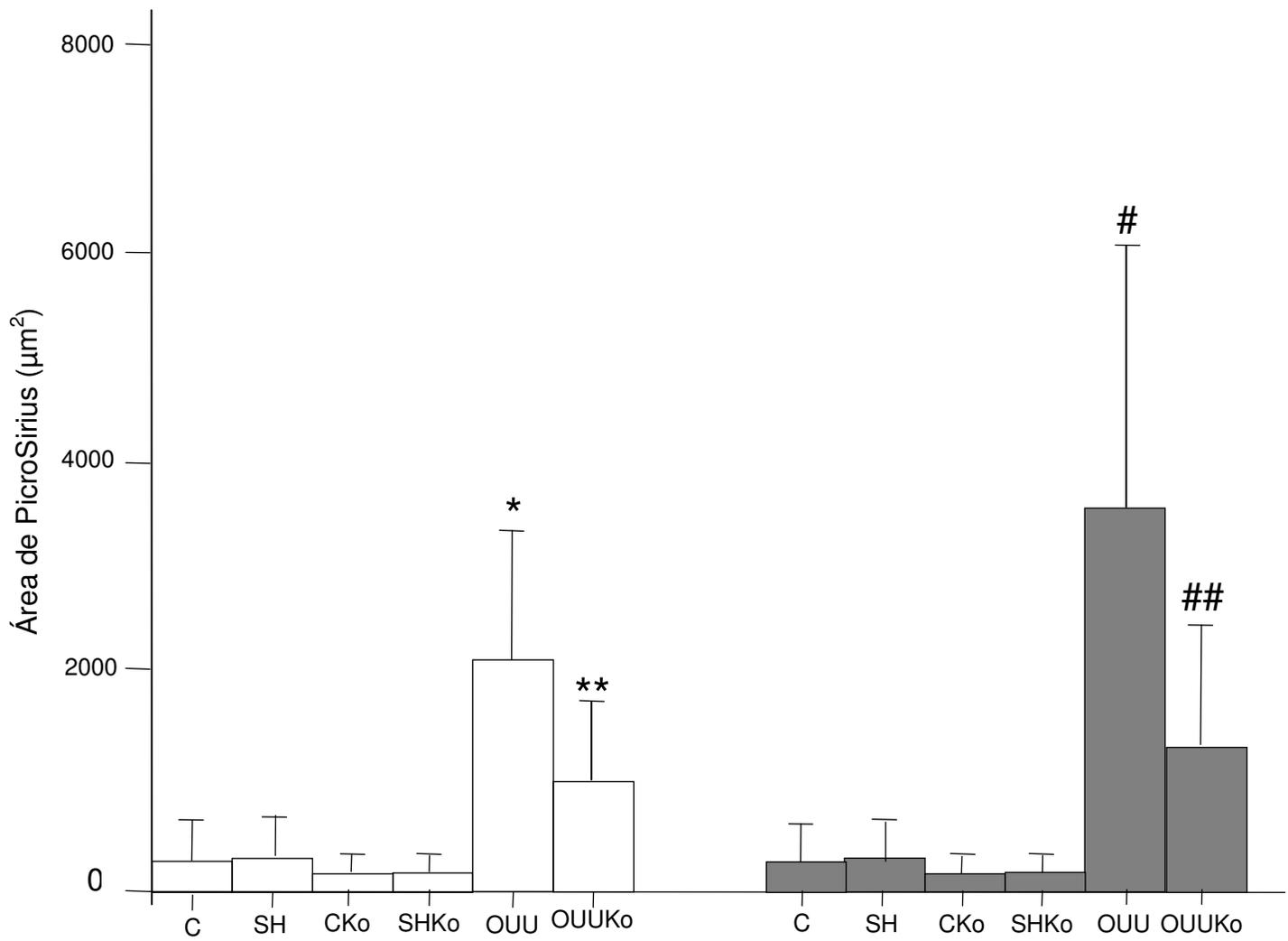
5.3 Colágeno e fibrose renal

A coloração pelo PicroSirius é específica para a marcação de fibras de colágeno. Em interstício renal é possível identificá-las através da microscopia ótica pela coloração avermelhada que as fibras de colágeno assumem quando positivas. A análise do PicroSirius mostrou um aumento difuso de colágeno no interstício dos rins obstruídos após 7 e 14 dias. Os animais do grupo OUU P2X₇ (-/-) tiveram uma diminuição significativa na densidade de colágeno positivo com uma redução de 47,8% após 7 dias de OUU e de 64% após 14 dias de OUU quando comparados aos animais do grupo OUU WT (Figuras 11 A e B). Apesar dessa importante diminuição, quando comparamos aos animais controle (grupos C e S) a quantidade de colágeno é significativamente aumentada no grupo OUU P2X₇ (-/-), conforme exposto na figura 12. Os valores das áreas de PicroSirius positivo após 7 e 14 dias de OUU são mostrados nas tabelas 3 e 4.



A figura A representa o grupo OUU P2X₇ (-/-) e a figura B representa o grupo OUU WT após 14 dias de OUU

Figura 11 Marcação de colágeno através da coloração de Picro Sirius



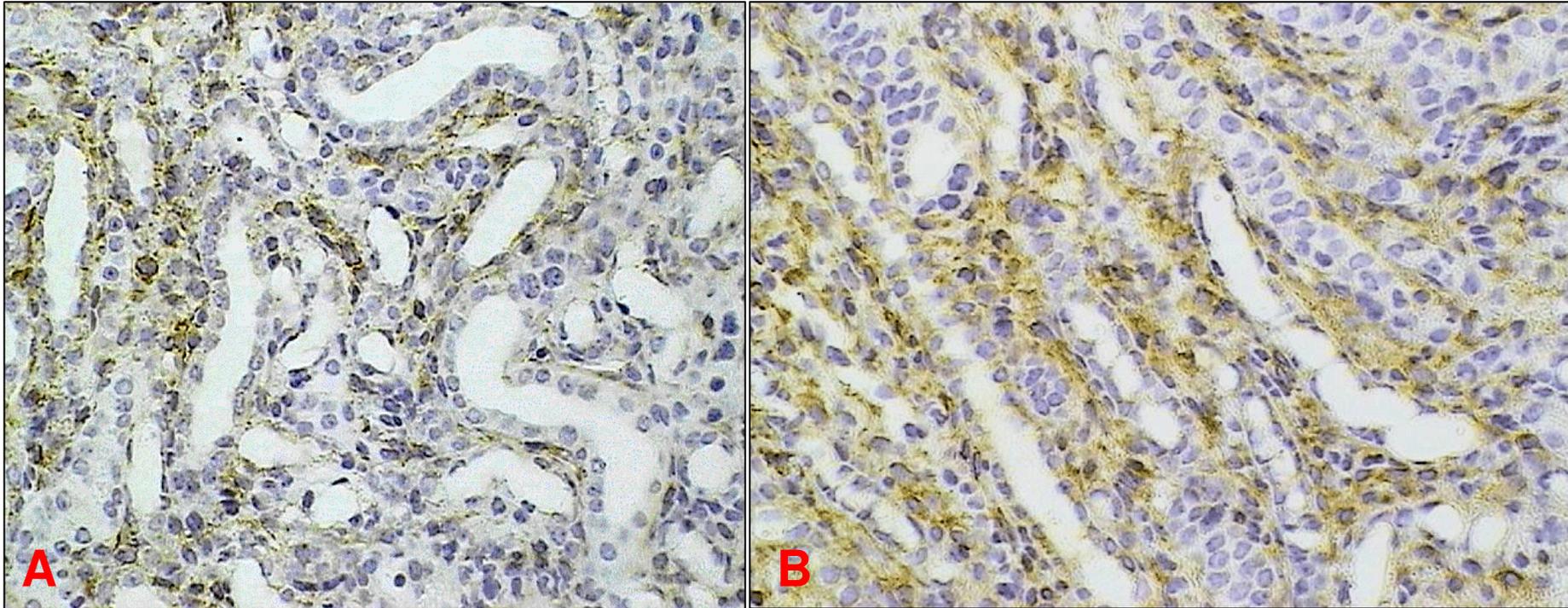
Representação da quantidade de colágeno em interstício renal de camundongos após 7 dias (□) e 14 dias (■) de UUO. *P<0,001 vs OUUKo; **P<0,001 vs demais grupos; #P<0,001 vs OUUKo e ##P<0,001 vs demais grupos

Figura 12 Quantificação de área de colágeno positiva através do Picrosirius

Os miofibroblastos exercem um papel central na produção de colágeno intersticial e no desenvolvimento da fibrose. Sua localização e quantificação é um dos mais importantes eventos que denotam a intensidade do estímulo fibrogênico após a OUU. Sua identificação é possível através da marcação imunohistoquímica do anticorpo α -actina de músculo liso (α -SMA).

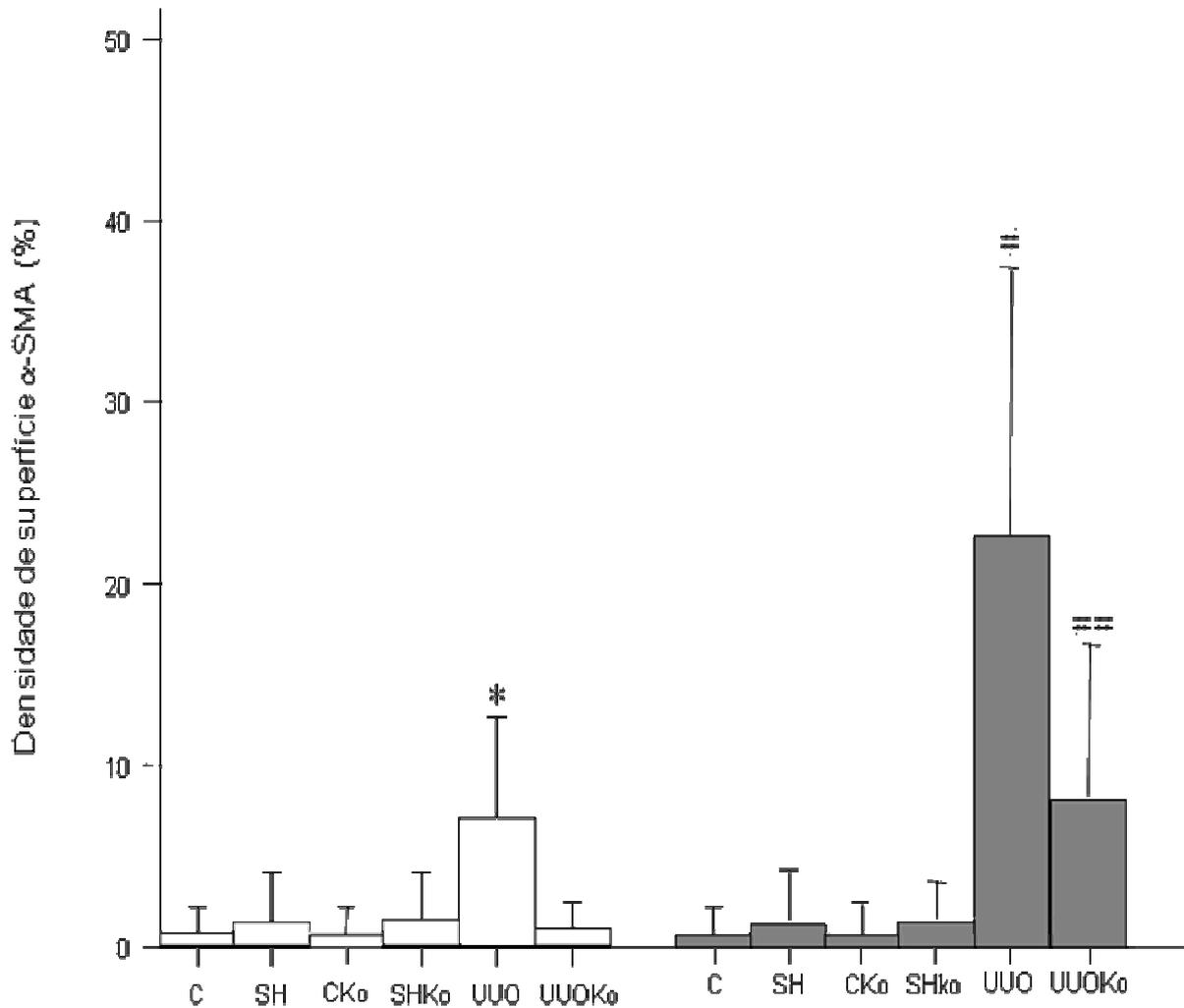
No presente estudo, os rins obstruídos tiveram um aumento substancial de marcação de α -SMA no interstício, predominantemente em áreas atróficas da medula renal. Nessa região, marcaram-se redes de fibrilas positivas para α -SMA no interstício e em algumas células peritubulares. No córtex, a marcação foi predominantemente encontrada em células alongadas e isoladas peritubulares conforme exposto nas figuras 13 A e B. Os vasos sanguíneos tiveram sempre marcações positivas para α -SMA em todas as reações.

Os animais do grupo OUU P2X₇ (-/-) tiveram uma redução significativamente estatística de 62% na marcação de α -SMA quando comparado aos animais do grupo OUU WT após 14 dias de OUU e de 85,7% após 7 dias de OUU. Não houve diferença estatística na marcação de α -SMA após 7 dias de OUU quando comparamos o grupo OUU P2X₇ (-/-) aos animais controle, conforme mostrado na figura 14. Nos animais controle, a marcação de α -SMA se limitou aos vasos sanguíneos com nenhum miofibroblasto aparente em interstício renal. Todos os valores são mostrados nas tabelas 1 e 2.



A figura A representa o grupo OUU P2X₇ (-/-) e a figura B o grupo OUU WT após 14 dias de OUU

Figura 13 Marcação de colágeno através da coloração de α-SMA

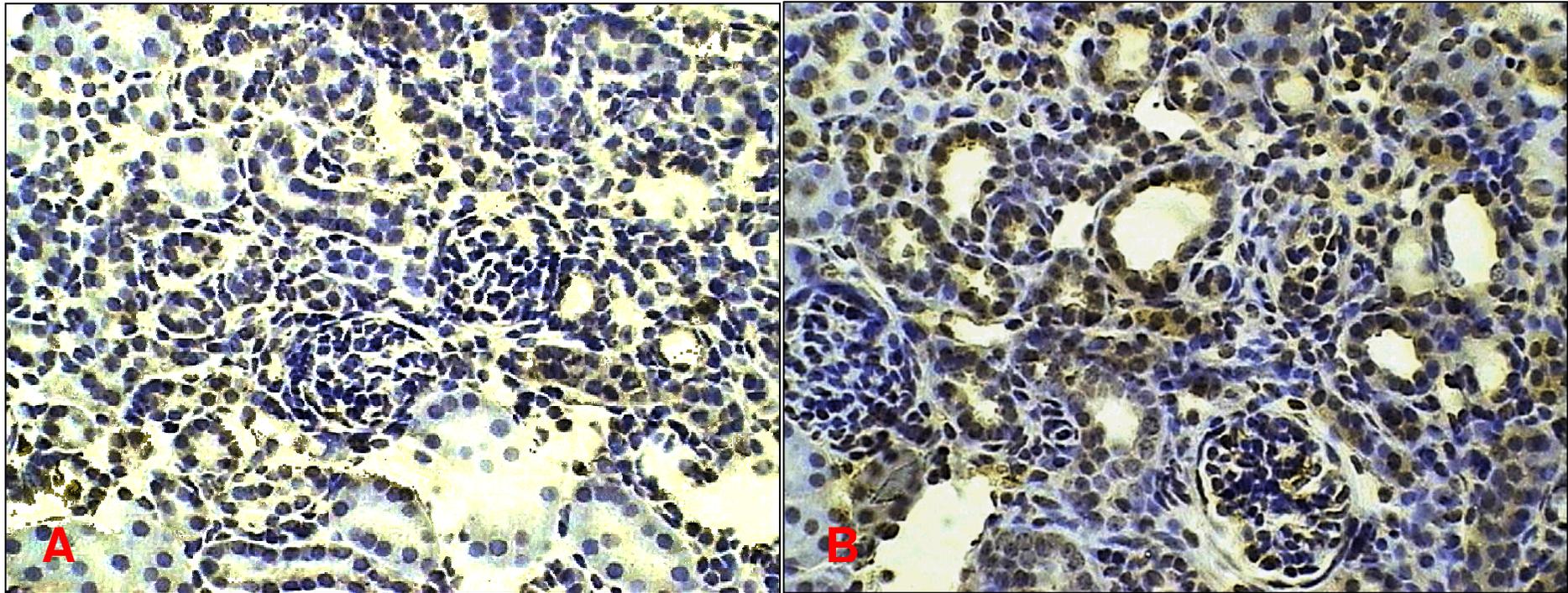


Representação da quantidade de miofibroblastos em interstício renal de camundongos após 7 dias (□) e 14 dias (■) de OUU. *P<0,001 vs demais grupos; #P<0,001 vs UUOKo e ##P<0,001 vs demais grupos

Figura 14 Quantificação de miofibroblastos

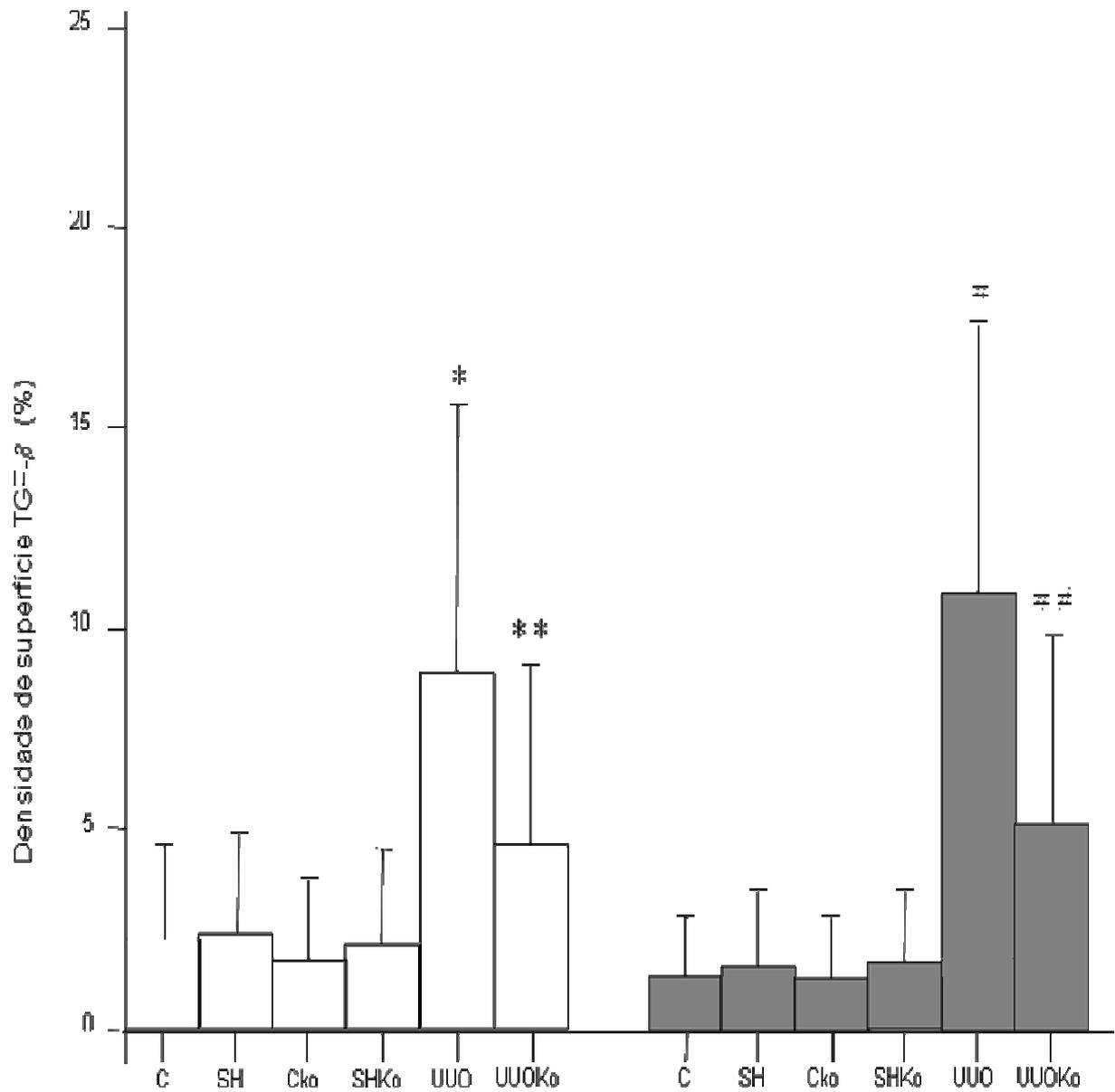
A citocina TGF- β constitui-se uma das principais estimuladoras para produção de colágeno e tem um papel significativo na progressão da fibrose em modelos clínicos e experimentais de doença renal. Analisados os grupos C e S, observou-se uma marcação homoganeamente uniforme em células epiteliais nos túbulos proximais e distais e em ducto coletor cortical. Os túbulos em região medular apresentaram uma pequena marcação esparsa para TGF- β . Não houve marcação em glomérulo, interstício e parede vascular. Após a OUU, a expressão de TGF- β aumentou significativamente com uma distribuição uniforme em túbulos corticais e medulares em todos os grupos de animais obstruídos. Entretanto, a marcação em

medula não foi tão proeminente quanto à marcação em túbulos corticais. Mesmo após a OUU, não houve marcação em glomérulos e vasos sanguíneos. Alguns macrófagos intersticiais apresentaram forte marcação para TGF- β . A distribuição do TGF- β foi similar nos grupos OUU P2X₇ (-/-) e OUU WT, porém, o primeiro apresentou uma redução significativa na quantificação de TGF- β após 7 dias (52%) e 14 dias (48%) de OUU quando comparado ao segundo (Figuras 15 A e B). Todos os valores são mostrados nas tabelas 1 e 2 e representados na figura 16.



A figura A representa o grupo OUU P2X₇ (-/-) e a figura B representa o grupo OUU WT após 14 dias de OUU.

Figura 15 Imunohistoquímica para TGF- β



Representação da densidade de TGF- β em interstício renal de camundongos após 7 dias (□) e 14 dias (■) de OUU. *P<0,001 vs OUUKo e **P<0,001 demais grupos; #P<0,001 vs OUUKo e ##P<0,001 vs demais grupos

Figura 16 Quantificação de TGF- β

Tabela 1 Resultado de imunohistoquímica para F4/80, α -SMA e TGF- β após 7 dias de OUU

	C	S	CKO	SKO	UUOWT	UUOKO
F4/80	1.15 \pm 1.27	1.45 \pm 1.28	1.17 \pm 1.17	1.37 \pm 1.23	10.35 \pm 3.35 ^a	7.60 \pm 2.97 ^b
α -SMA	0.78 \pm 1.39	1.39 \pm 2.69	0.78 \pm 1.39	1.53 \pm 2.62	7.08 \pm 5.61 ^a	1.01 \pm 1.46 ^b
TGF- β 1	2.28 \pm 2.12	2.41 \pm 2.44	1.75 \pm 2.00	2.14 \pm 2.37	8.91 \pm 6.68 ^a	4.63 \pm 4.49 ^b

O número de células F4/80 positivas, a densidade de superfície de α -SMA (%) e a densidade de superfície de TGF- β foram determinadas em um total de 100 campos, sendo 50 de córtex e 50 de medula. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. ^aP<0,01 vs Outros grupos; ^bP<0,01 vs C e S

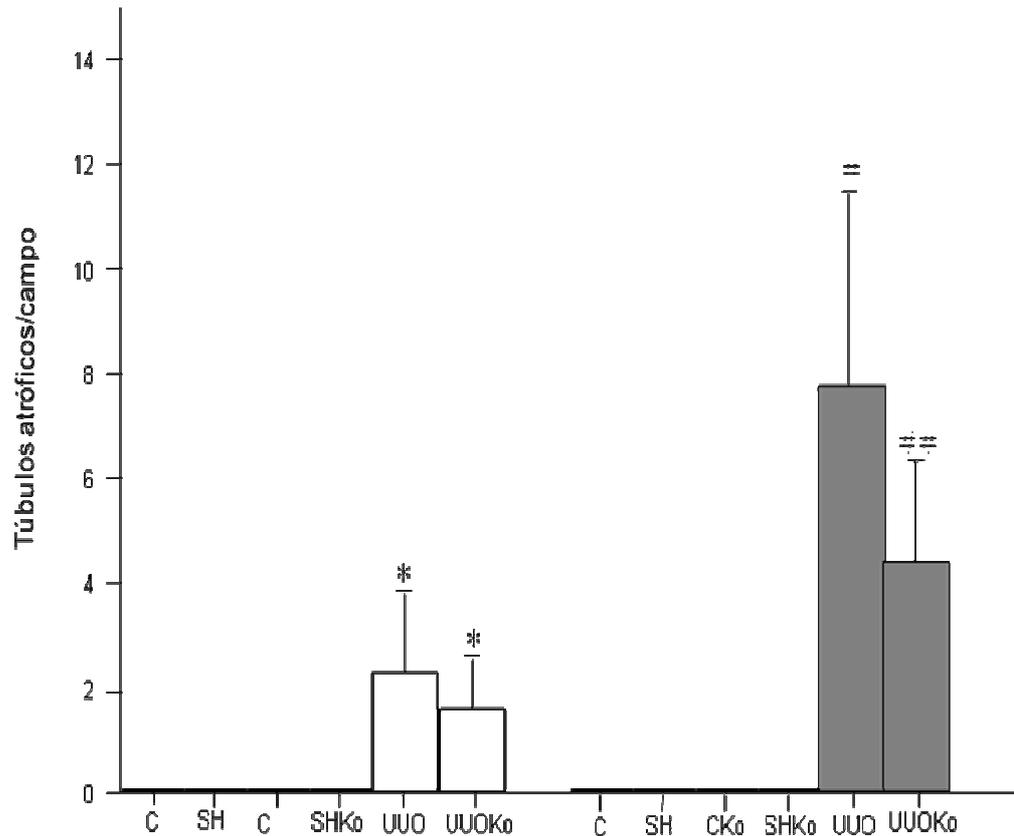
Tabela 2 Resultado de imunohistoquímica para F4/80, α -SMA e TGF- β após 14 dias de OUU

	C	S	CKO	SKO	UUOWT	UUOKO
F4/80	1.15 \pm 1.27	1.28 \pm 0.20	1.70 \pm 1.90	2.23 \pm 2.27	68.02 \pm 20.7 ^a	38.70 \pm 19.2 ^b
α -SMA	0.76 \pm 1.46	1.37 \pm 2.49	0.80 \pm 1.41	1.53 \pm 2.04	22.41 \pm 13.3 ^a	8.32 \pm 8.34 ^b
TGF- β 1	2.04 \pm 2.44	2.14 \pm 2.34	1.70 \pm 1.90	2.23 \pm 2.27	14.67 \pm 8.90 ^a	7.07 \pm 5.78 ^b

O número de células F4/80 positivas, a densidade de superfície de α -SMA (%) e a densidade de superfície de TGF- β foram determinadas em um total de 100 campos, sendo 50 de córtex e 50 de medula. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. ^aP<0,01 vs Outros grupos; ^bP<0,01 vs C e S

5.4 Atrofia tubular

A atrofia tubular é o resultado final de muitas doenças renais. No modelo de OUU, ela é geralmente observada junto com a dilatação tubular e a deposição de colágeno intersticial. Após 14 dias de OUU observou-se um aumento no número de túbulos atróficos em todos os animais, porém, os animais do grupo OUU P2X₇ (-/-) apresentaram uma redução significativa de 44% de túbulos atróficos em relação aos animais do grupo OUU WT. Entretanto, após 7 dias de OUU a redução de números atróficos no grupo OUU P2X₇ (-/-) foi de 31% em relação ao grupo OUU WT, o que não foi estatisticamente significativo. Os animais dos grupos C e S não apresentaram atrofia tubular em nenhum campo analisado. Todos os resultados são mostrados nas tabelas 3 e 4 e representados na figura 17.

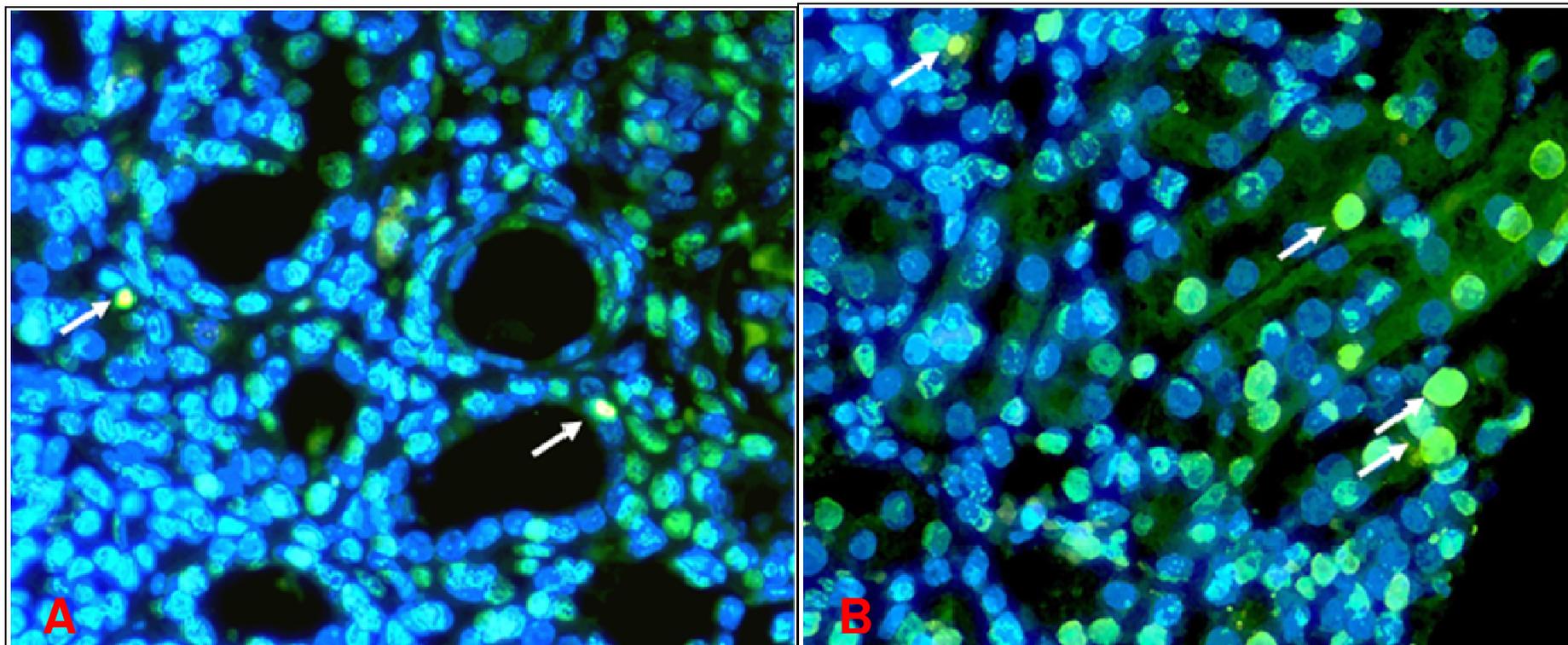


Representação do número de túbulos atróficos por campo em rim de camundongos após 7 dias (□) e 14 dias (■) de OUU. *P<0,001 vs OUUKo e **P<0,001 demais grupos; #P<0,001 vs OUUKo e ##P<0,001 vs demais grupos

Figura 17 Quantificação de túbulos atróficos

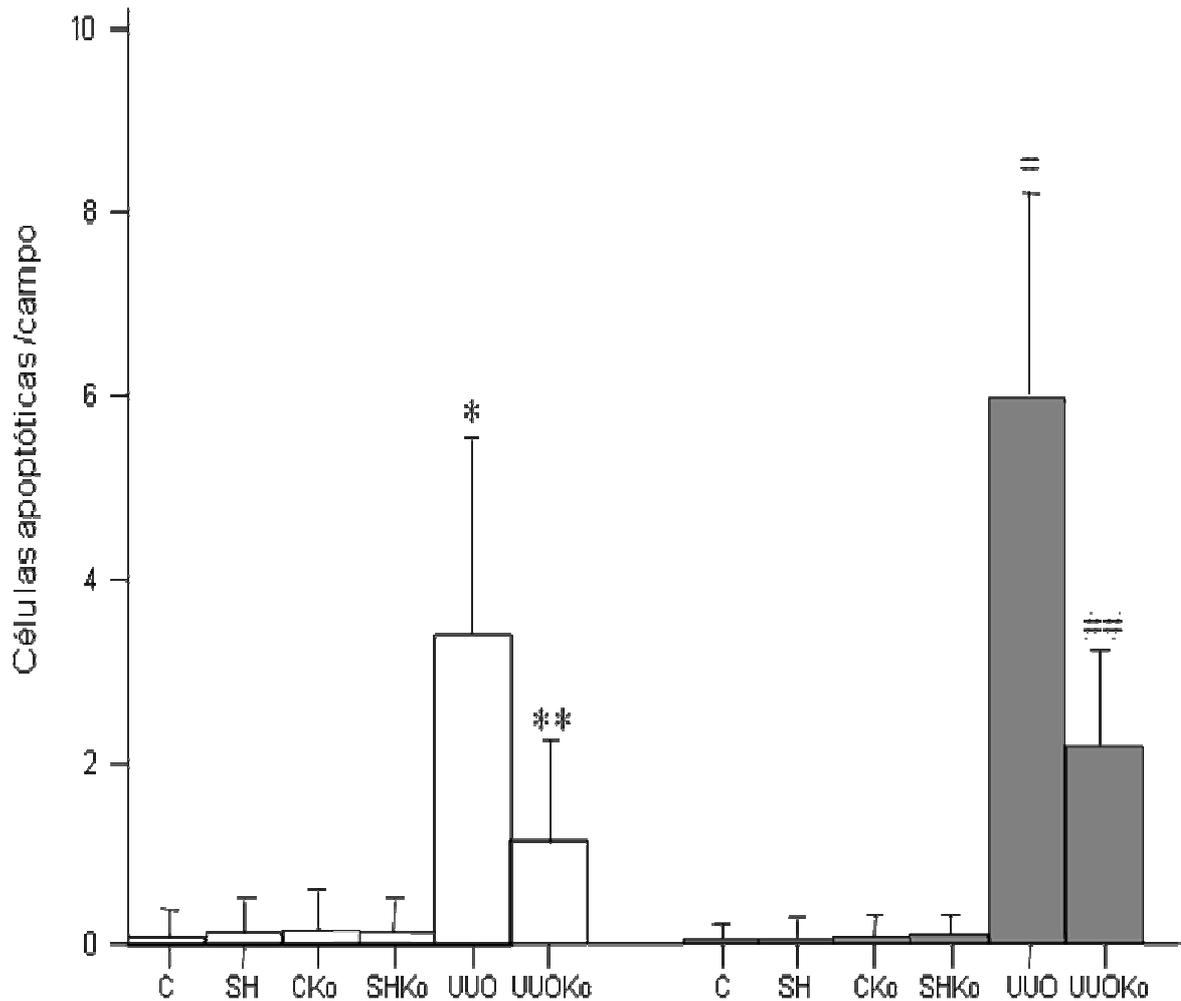
5.5 Apoptose tubular

A apoptose tubular, detectada através do método de TUNEL descrito anteriormente, foi significativamente maior em todos os grupos de animais obstruídos quando comparados aos grupos controle (C e S) em 7 e 14 dias após OUU. Os animais do grupo OUU P2X₇ (-/-) apresentaram uma diminuição de 66,7% de células apoptóticas após 7 dias de OUU e 63,7% após 14 dias de OUU quando comparados aos animais do grupo OUU WT (Figuras 18 A e B). Ambos os resultados foram significativos estatisticamente. Os dados são mostrados nas tabelas 3 e 4 e representados na figura 19.



A figura A representa o grupo OUU P2X₇ (-/-) e a figura B representa o grupo OUU WT após 14 dias de OUU. As setas brancas indicam as células apoptóticas

Figura 18 TUNEL para detecção de células apoptóticas

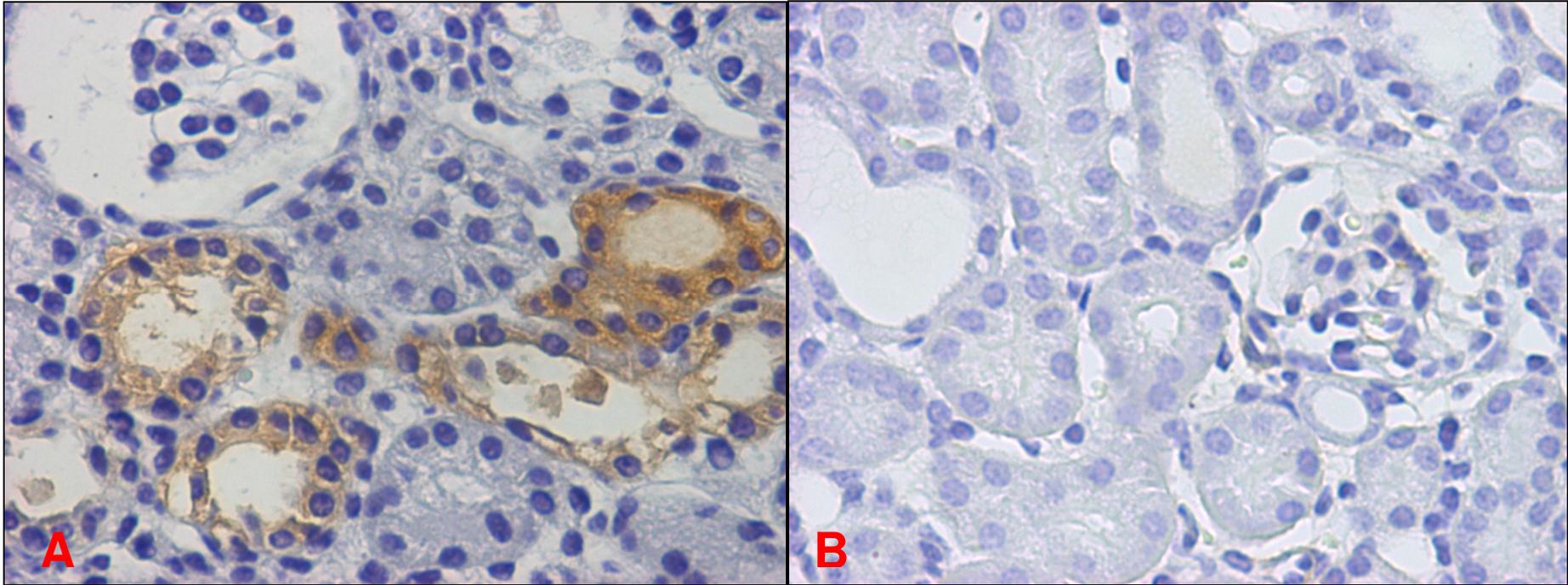


Representação do número de células apoptóticas por campo em rim de camundongos após 7 dias (□) e 14 dias (■) de OUU. *P<0,001 vs OUUKo e **P<0,001 demais grupos; #P<0,001 vs OUUKo e ##P<0,001 vs demais grupos

Figura 19 Quantificação de células apoptóticas

5.6 Imunohistoquímica para P2X₇

A localização do receptor P2X₇ no tecido renal em situações normais e de injúria são de fundamental importância para o entendimento de sua fisiopatologia. Neste estudo, observou-se que após 7 dias de OUU, os animais do grupo OUU WT apresentaram marcação para P2X₇ em células epiteliais em córtex apenas, enquanto que os animais do grupo OUU P2X₇ (-/-) não apresentaram marcação. Após 14 dias de OUU, os grupos OUU P2X₇ (-/-) e OUU WT não apresentaram marcação para o receptor P2X₇. As lâminas controle (soro não-imune e peptídeo de bloqueio) foram sempre negativas (Figuras 20 A e B).



A figura A representa o grupo OUU WT após 7 dias de OUU e a figura B representa o grupo OUU WT após 14 dias de OUU.

Figura 20 Imunohistoquímica para o receptor P2X₇

Tabela 3 Resultado de PicroSirius, atrofia tubular e apoptose após 7 dias de OUU

	C	S	CKO	SKO	UUOWT	UUOKO
Sirius-red	319.42 ± 384.13	349.03 ± 340.07	199.20 ± 161.02	213.87 ± 194.70	2254.83 ± 1235.78 ^a	1079.29 ± 854.29 ^b
Tubular atrophy	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.30 ± 1.48 ^a	1.59 ± 0.93 ^b
TUNEL	0.10 ± 0.30	0.0 ± 0.0	0.18 ± 0.39	0.15 ± 0.36	3.40 ± 2.12 ^a	1.13 ± 1.11 ^b

Área de PicroSirius positivo (μm^2), número de túbulos atróficos por campo e número de células apoptóticas por campo foram determinadas em um total de 100 campos, sendo 50 de córtex e 50 de medula. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. ^aP<0,01 vs Outros grupos; ^bP<0,01 vs C e S.

Tabela 4 Resultado de PicroSirius, atrofia tubular e apoptose após 14 dias de OUU

	C	S	CKO	SKO	UUOWT	UUOKO
Sirius-red	319.4 ± 384.1	349.0 ± 340.0	313.36 ± 371.12	344.25 ± 331.83	3717.1 ± 2416.8 ^a	1416.8 ± 1155.6 ^b
Tubular atrophy	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.81 ± 3.66 ^a	4.43 ± 1.93 ^b
TUNEL	0.10 ± 0.30	0.13 ± 0.34	0.18 ± 0.39	0.18 ± 0.39	9.96 ± 3.62 ^a	3.6 ± 1.78 ^b

Área de PicroSirius positivo (μm^2), número de túbulos atróficos por campo e número de células apoptóticas por campo foram determinadas em um total de 100 campos, sendo 50 de córtex e 50 de medula. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. ^aP<0,01 vs Outros grupos; ^bP<0,01 vs C e S.

6 DISCUSSÃO

Vários estudos como os de Burnstock (1978) e Burnstock e Knight (2004) caracterizaram o funcionamento de agonistas purinérgicos extracelulares como o ATP, ADP e adenosina em diferentes tipos de células. Estudos de Di Virgilio (2005) e Baraldi e colaboradores (2004) em uma revisão de Burnstock (2004) enfatizaram a necessidade de futuros trabalhos usando antagonistas de receptores P2 como agentes anti-inflamatórios, ressaltando a importância desses receptores como mediadores de resposta inflamatória. Em particular, a síntese de citocinas por macrófagos, proliferação celular vascular e apoptose está especificamente relacionada à ativação dos receptores P2X₇.

Já está bem estabelecido que a ativação destes receptores estimula a função fagocítica dos macrófagos. Perregaux e Gabel, 1994 documentaram a ativação da maturação do IL-1 β e sua liberação após estímulo por ATP em macrófagos de camundongo. Outros estudos foram direcionados para explicar o mecanismo de ativação dos receptores P2, especialmente o P2X₇, nos processos de resposta imunológica e inflamatória em leucócitos e monócitos/macrófagos (Ferrari *et al.*, 1997). Foi proposto que estes receptores atuam como reguladores da inflamação, baseado na sua função de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (Sanz e Di Virgilio, 2000). Adicionalmente, a ativação dos receptores P2X₇ aumentam a expressão de RNA_m de TGF- β ₁ em astrócitos tipo 2 em cérebros de ratos, o que demonstra a possibilidade de atuação deste receptor na produção desta citocina pró-fibrótica (Wang *et al.*, 2003).

No rim, já foi demonstrado que os receptores P2X₇ são expressos em

pequena quantidade em células glomerulares mesangiais (Harada *et al.*, 2000). De fato, os estudos de Vonend e colaboradores (2004) e Solini e colaboradores (2005) determinaram o mecanismo como a ativação do receptor P2X₇ atua nos macrófagos e na formação e expansão de matriz nos modelos de doença glomerular. No estudo de Vonend e colaboradores (2004) o receptor P2X₇ não é consideravelmente expresso em condições normais. Entretanto, após uma injúria glomerular ele tem sua regulação significativamente aumentada, principalmente em podócitos, e em células epiteliais e mesangiais em animais com diabetes melitus induzido por estreptozotocina ou hipertensão em ratos transgênicos para o gene Ren-2 de renina. Graciano *et al.*, 2008 demonstraram que a ativação vascular e glomerular de receptores P2 contribuem para a transformação de células mesangiais, inflamação renal e hipertrofia vascular em modelo de hipertensão dependente de angiotensina II.

Em recente estudo de Taylor *et al* (2009), em modelo murino de injúria renal por glomerulonefrite experimental, os animais knockout para o receptor P2X₇ tiveram um efeito renoprotetor significativo em relação aos animais selvagens evidenciados por uma melhora da função renal, diminuição de proteinúria e diminuição histológica de injúria glomerular o que demonstra um provável efeito pró-inflamatório deste receptor em doenças com injúria renal autoimune e o potencial alvo terapêutico de sua antagonização no tratamento da glomerulonefrite. Esta é mais uma evidência da importância deste receptor em doenças inflamatórias renais e a necessidade de ampliar estas investigações para doenças túbulo-intersticiais como a desenvolvida neste trabalho.

No presente estudo, usando o modelo de OUU em camundongos, foi avaliado o papel do receptor P2X₇ no processo de inflamação e fibrose intersticial,

atrofia tubular e apoptose celular em rim de camundongos. Os resultados mostraram que camundongos knockout para o receptor P2X₇ não exibiram as alterações evidenciadas nos camundongos selvagens submetidos à OUU. Na ausência do receptor P2X₇, ocorreu uma diminuição de macrófagos no interstício e uma menor população de miofibroblastos. Diminuição na deposição de colágeno, assim como, diminuição da expressão de TGF- β e diminuição de células apoptóticas em rins de camundongos submetidos à OUU. Chama a atenção nos resultados, a drástica redução de miofibroblastos nos rins dos camundongos knockout. Estes achados sugerem que ambos, fibroblastos intersticiais ou miofibroblastos oriundos da transição epitélio mesenquimal são de alguma forma estimulados pela ativação do receptor P2X₇. Estudos prévios de Versey e colaboradores (2002) demonstraram que a citocina IL-1 β promove proliferação de fibroblastos e produção de colágeno. É possível que estes receptores purinérgicos em macrófagos e células epiteliais estejam envolvidos na proliferação fibroblástica e formação de matriz em resposta à injúria celular, via ativação de IL-1 β .

Os resultados da análise da técnica de TUNEL vão de encontro com o resultado de diversos estudos em que temos em paralelo a morte de células epiteliais tubulares por apoptose e a atrofia tubular nesse modelo fisiopatológico (Gobe e Axelsen, 1987; Truong *et al.*, 1996). O presente estudo demonstrou que na ausência do receptor P2X₇, as células epiteliais tiveram menos apoptose, sugerindo que a ativação deste receptor pode estar envolvida neste processo. De fato, o mecanismo em que o receptor P2X₇ atua como indutor de apoptose em diversos tipos celulares já foi matéria de extensas investigações, como documentado em células hematopoiéticas (Coutinho-Silva *et al.*, 1999; Bulanova *et al.*, 2005) e células mesangiais em rins de ratos (Harada *et al.*, 2000)

Outra grande importância do papel deste receptor no processo de apoptose celular encontra-se em modelos de doenças neurodegenerativas como demonstrado por Song-Yi Lee et al (2006) onde a ativação do receptor P2X₇ por estímulos constantes de ATP levaram apoptose de células HEK 293 que possuem alta expressão deste receptor e seu bloqueio promoveu a diminuição de morte celular.

A diminuição de células apoptóticas nos animais knockout apresentam uma relação direta com a diminuição de células inflamatórias nestes animais. Este estudo levanta a hipótese de que o aumento de IL-1 possa interferir diretamente no estímulo para a célula promover uma morte programada por apoptose, incluindo nesse caso principalmente macrófagos.

O achado imunohistoquímico da presença do receptor P2X₇ em rins de camundongos selvagens submetidos à OUU após 7 dias, claramente demonstra que estes receptores podem ser expressos em células tubulares em condições de injúria tubulointersticial. Este achado é a primeira documentação da expressão deste receptor em células epiteliais tubulares de rins obstruídos, assim como foi descrito para células mesangiais em modelos de nefropatia diabética e hipertensão (Vonend *et al.*, 2004; Solini *et al.*, 2005). Surpreendentemente, nós não encontramos expressão deste receptor nos rins de camundongos após 14 dias de OUU, em que a coloração imunohistoquímica para este receptor não foi positiva. A explicação para a não detecção do P2X₇ neste tempo de estudo ainda não está clara. Uma possibilidade seria que o aumento da apoptose de células epiteliais neste tempo de observação diminuiria a chance de expressão destes receptores. Além disso, nós não observamos células positivas no interstício renal e nem em macrófagos em ambos os tempos de 7 e 14 dias de OUU. O fato do receptor ter sido expresso em células epiteliais e não em macrófagos como esperávamos pode ser explicado pelo

tempo de obstrução em que ocorreu a análise. Acreditamos que a expressão do receptor P2X₇ no macrófago ocorra mais precocemente no decorrer do processo inflamatório e por esse motivo não encontramos positividade em nossas análises imunohistoquímicas. Coutinho-Silva *et al.*, 2003 observaram uma diminuição da expressão de P2X₇ em ilhas pancreáticas após 8 semanas de diabetes, induzida por estreptozotocina. O autor sugeriu que a liberação de ATP pode ter ativado a lise de macrófagos, que tem uma alta expressão de P2X₇ o que levaria a diminuição de sua expressão.

Este resultado inédito na literatura demonstra que se faz necessário uma investigação temporal detalhada da expressão deste receptor em rins de camundongos submetidos à OUU o que será alvo de nossos futuros estudos.

As conclusões do trabalho sugerem o efeito da ativação do receptor P2X₇, parcialmente contribuindo para o aumento da inflamação e fibrose em tecidos renais de camundongos submetidos à OUU, embora, a expressão destes receptores estejam presentes somente nas fases iniciais de injúria renal neste modelo.

Os resultados deste estudo abrem a possibilidade do uso terapêutico de antagonistas de receptor P2X₇ em modelos de doença renal inflamatória e até modelos de rejeição de transplante renal. Vale destacar que a mortalidade dos animais knockout para o receptor P2X₇ não foi maior que a do grupo controle, o que afasta o receio de que esses animais teriam seu sistema imune comprometido. A análise através de biologia molecular da expressão destes receptores em tempos de obstrução mais precoces como 24h e 3 dias nos permitirão avaliações mais detalhadas da cinética de aparecimento destes receptores mediante uma injúria, o que pode ser importante em processos patológicos como a insuficiência renal aguda, em que o desenvolvimento da doença ocorre mais rapidamente e de forma

geralmente mais grave.

No campo de transplante renal, sabe-se que a rejeição aguda do enxerto é um processo basicamente pro-inflamatório e pró-fibrogênico em que o receptor P2X₇ pode ser um elemento chave para o seu desenvolvimento. Em suma, modelos de doença renal in vivo em que ocorra o bloqueio deste receptor devem ser avaliados futuramente com grande promessa de resultados favoráveis.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, a injúria tubulointersticial que ocorre após à OUU é atenuada pela ausência do receptor purinérgico P2X₇ como demonstrado neste estudo usando comundongos Knockout para este receptor. Os animais que não expressaram o receptor apresentaram menos fibrose e inflamação renal após serem submetidos à OUU. Estes resultados constituem a primeira evidência do envolvimento destes receptores no processo de inflamação intersticial e deposição de colágeno em resposta à obstrução ureteral. O efeito da estimulação do receptor P2X₇ em diferentes células como macrófagos e células epiteliais tubulares renais, assim como a sua ação no processo de fibrogênese, necessita de mais investigações. Sendo assim, o potencial anti-inflamatório e anti-fibrogênico do antagonismo deste receptor como um instrumento para novos estudos visando a prevenção da fibrose intersticial renal deve ser considerado em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994; 64(3):445-475.
- Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem.* 2005; 280(30):28142-28151.
- Baraldi PG, Di Virgilio F, Romagnoli R. Agonists and antagonists acting at P2X7 receptor. *Curr Top Med Chem.* 2004; 4(16):1707-1717.
- Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* 2005; 68(3):925-937.
- Bell ET. *Renal Diseases.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1950.
- Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* 2001; 26(8-9):959-969.
- Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol.* 1985; 249(3 Pt 2):F324-337.
- Buell G, Collo G, Rassendren F. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci.* 1996; 8(10):2221-2228.
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, et al. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J Immunol.* 2005; 174(7):3880-3890.
- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Straub RW, Bolis L, editors. *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach.* New York: Raven Press; 1978. p. 107-119.
- Burnstock G. A comparison of receptors for adenosine and adenine nucleotides. In: Berne RM, Rall TW, Rubio R, editors. *Regulatory Function of Adenosine.*

- Boston: Nijhoff; 1983. p. 49-62.
- Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem*. 2004; 4(8):793-803.
- Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*. 2006; 147 Suppl 1:S172-181.
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*. 1985; 16(5):433-440.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*. 2004; 240:31-304.
- Campbell MF. Urinary obstruction. In: Campbell MF, Harrison JH, editors. *Urology*. Philadelphia: WB Saunders; 1970. p. 1772-1793.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 1997; 36(9):1277-1283.
- Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Lincoln J, Burnstock G. P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 204(1-2):141-154.
- Coutinho-Silva R, Persechini PM, Bisaggio RD, Perfettini JL, Neto AC, Kanellopoulos JM, et al. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol*. 1999; 276(5 Pt 1):C1139-1147.
- da Cruz CM, Ventura AL, Schachter J, Costa-Junior HM, da Silva Souza HA, Gomes FR, et al. Activation of ERK1/2 by extracellular nucleotides in macrophages is mediated by multiple P2 receptors independently of P2X7-associated pore or channel formation. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(3):324-334.
- Dean DM, Downie JW. Contribution of adrenergic and "purinergic" neurotransmission to contraction in rabbit detrusor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1978; 207(2):431-445.
- Dell'Antonio G, Quattrini A, Dal Cin E, Fulgenzi A, Ferrero ME. Antinociceptive effect of a new P(2Z)/P2X7 antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats. *Neurosci Lett*. 2002; 327(2):87-90.
- Di Virgilio F. Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol*. 2003; 140(3):441-443.

- Di Virgilio F, Baricordi OR, Romagnoli R, Baraldi PG. Leukocyte P2 receptors: a novel target for anti-inflammatory and anti-tumor therapy. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005; 5(1):85-99.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 2001; 97(3):587-600.
- Diamond JR, Kees-Folts D, Ding G, Frye JE, Restrepo NC. Macrophages, monocyte chemoattractant peptide-1, and TGF-beta 1 in experimental hydronephrosis. *Am J Physiol*. 1994; 266(6 Pt 2):F926-933.
- Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2002; 20(5 Suppl 27):S1-13.
- Dolber PC, Spach MS. Picrosirius red staining of cardiac muscle following phosphomolybdic acid treatment. *Stain Technol*. 1987; 62(1):23-26.
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*. 1929; 68(3):213-237.
- Egan TM, Cox JA, Voigt MM. Molecular structure of P2X receptors. *Curr Top Med Chem*. 2004; 4(8):821-829.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch*. 2006; 452(5):552-562.
- Faria RX, Defarias FP, Alves LA. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 288(2):C260-271.
- Felsen D, Schulsinger D, Gross SS, Kim FY, Marion D, Vaughan ED, Jr. Renal hemodynamic and ureteral pressure changes in response to ureteral obstruction: the role of nitric oxide. *J Urol*. 2003; 169(1):373-376.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*. 1997; 159(3):1451-1458.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*. 2006;

176(7):3877-3883.

Fischer KG, Saueressig U, Jacobshagen C, Wichelmann A, Pavenstadt H.
Extracellular nucleotides regulate cellular functions of podocytes in culture.
Am J Physiol Renal Physiol. 2001; 281(6):F1075-1081.

Fitz JG. Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007;
118:199-208.

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of
Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors.
Pharmacol Rev. 2001; 53(4):527-552.

Fukuda K, Yoshitomi K, Yanagida T, Tokumoto M, Hirakata H. Quantification of TGF-
beta1 mRNA along rat nephron in obstructive nephropathy. *Am J Physiol
Renal Physiol.* 2001; 281(3):F513-521.

Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, et al.
Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X
and P2Y receptors. *Glia.* 2003; 43(3):218-203.

Gobe GC, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental
hydronephrosis in the rat. Role of apoptosis. *Lab Invest.* 1987; 56(3):273-281.

Goncalves RG, Biato MA, Colosimo RD, Martinusso CA, Pecly ID, Farias EK, et al.
Effects of mycophenolate mofetil and lisinopril on collagen deposition in
unilateral ureteral obstruction in rats. *Am J Nephrol.* 2004; 24(5):527-536.

Graciano ML, Nishiyama A, Jackson K, Seth DM, Ortiz RM, Prieto-Carrasquero MC,
Kobori H, Navar LG. Purinergic receptors contribute to early mesangial cell
transformation and renal vessel hypertrophy during angiotensin II-induced
hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F161–F169, 2008

Griffin KA, Picken MM, Churchill M, Churchill P, Bidani AK. Functional and structural
correlates of glomerulosclerosis after renal mass reduction in the rat. *J Am
Soc Nephrol.* 2000; 11(3):497-506.

Harada H, Chan CM, Loesch A, Unwin R, Burnstock G. Induction of proliferation and
apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular
mesangial cells. *Kidney Int.* 2000; 57(3):949-958.

- Hillman KA, Johnson TM, Winyard PJ, Burnstock G, Unwin RJ, Woolf AS. P2X(7) receptors are expressed during mouse nephrogenesis and in collecting duct cysts of the cpk/cpk mouse. *Exp Nephrol.* 2002; 10(1):34-42.
- Hillman KA, Woolf AS, Johnson TM, Wade A, Unwin RJ, Winyard PJ. The P2X7 ATP receptor modulates renal cyst development in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322(2):434-439.
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell.* 1993; 4(6):637-645.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002; 110(3):341-350.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11(4):447-455.
- Kaneto H, Ohtani H, Fukuzaki A, Ishidoya S, Takeda A, Ogata Y, et al. Increased expression of TGF-beta1 but not of its receptors contributes to human obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 1999; 56(6):2137-2146.
- Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283(5):F861-875.
- la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol.* 2003; 73(3):339-343.
- Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol.* 2003; 64(4):785-795.
- Lee HY, Bardini M, Burnstock G. Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol.* 2000; 163(6):2002-2007.
- Leite Jr. M, Suki WN, Lederer ED, Schilling WP. AVP and ATP interactions in rabbit cortical collecting tubules (RCCT): Evidence for purinergic receptors in principal cells. *Kidney Int.* 1990; 37:584-584. (Abstract).

- Linden J, Hollen CE, Patel A. The mechanism by which adenosine and cholinergic agents reduce contractility in rat myocardium. Correlation with cyclic adenosine monophosphate and receptor densities. *Circ Res.* 1985; 56(5):728-735.
- Lister MF, Sharkey J, Sawatzky DA, Hodgkiss JP, Davidson DJ, Rossi AG, et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J Inflamm (Lond).* 2007; 4:5.
- Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(1):1-12.
- Mackensen-Haen S, Bader R, Grund KE, Bohle A. Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clin Nephrol.* 1981; 15(4):167-171.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006; 440(7081):228-232.
- Michel AD, Kaur R, Chessell IP, Humphrey PP. Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br J Pharmacol.* 2000; 130(3):513-520.
- Miyajima A, Chen J, Poppas DP, Vaughan ED, Jr., Felsen D. Role of nitric oxide in renal tubular apoptosis of unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2001; 59(4):1290-1303.
- Nagle RB, Bulger RE. Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. II. Late morphologic changes. *Lab Invest.* 1978; 38(3):270-278.
- Nagle RB, Bulger RE, Cutler RE, Jervis HR, Benditt EP. Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes. *Lab Invest.* 1973; 28(4):456-467.
- Nagle RB, Johnson ME, Jervis HR. Proliferation of renal interstitial cells following injury induced by ureteral obstruction. *Lab Invest.* 1976; 35(1):18-22.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002; 82(4):1013-1067.

- North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40:563-580.
- Okegawa T, Jonas PE, DeSchryver K, Kawasaki A, Needleman P. Metabolic and cellular alterations underlying the exaggerated renal prostaglandin and thromboxane synthesis in ureter obstruction in rabbits. Inflammatory response involving fibroblasts and mononuclear cells. *J Clin Invest.* 1983; 71(1):81-90.
- Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, Hughes J, Pichler R, Brown P, et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int.* 1999; 56(2):571-580.
- Oswald H. Adenosine and renal function. In: Berne RM, Rall TW, Rubio R, editors. *Regulatory Function of Adenosine.* Boston: Nijhoff; 1983. p. 399-415.
- Pecly IM, Goncalves RG, Rangel EP, Takiya CM, Taboada FS, Martinusso CA, et al. Effects of low molecular weight heparin in obstructed kidneys: decrease of collagen, fibronectin and TGF-beta, and increase of chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans and macrophage infiltration. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(5):1212-1222.
- Perregaux D, Barberia J, Lanzetti AJ, Geoghegan KF, Carty TJ, Gabel CA. IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. *J Immunol.* 1992; 149(4):1294-1303.
- Perregaux D, Gabel CA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem.* 1994; 269(21):15195-15203.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276(5309):71-74.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50(3):413-492.
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, et al. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 2006; 452(5):486-500.
- Rouse D, Leite M, Suki WN. ATP inhibits the hydrosmotic effect of AVP in rabbit CCT: evidence for a nucleotide P2u receptor. *Am J Physiol.* 1994; 267(2 Pt 2):F289-295.

- Sanz JM, Di Virgilio F. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol.* 2000; 164(9):4893-4898.
- Schreiner GF, Harris KP, Purkerson ML, Klahr S. Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney Int.* 1988; 34(4):487-493.
- Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brune B, et al. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol.* 1998; 275(6 Pt 2):F962-971.
- Snyder SH. Adenosine as a neuromodulator. *Annu Rev Neurosci.* 1985; 8:103-124.
- Solini A, Iacobini C, Ricci C, Chiozzi P, Amadio L, Pricci F, et al. Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: role in diabetic and other glomerular diseases. *Kidney Int.* 2005; 67(3):875-885.
- Song-Yi Lee, Sooyeon Jo, Ga Eun Lee, Lak Shin Jeong, Yong-Chul Kim, and Chul-Seung Park. Establishment of an Assay for P2X7 Receptor-Mediated Cell Death. *Mol. Cells* 2006 Oct;31;22(2):198-202
- Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2006; 78(6):327-346.
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* 1995; 130(2):393-405.
- Tanner GA, Evan AP. Glomerular and proximal tubular morphology after single nephron obstruction. *Kidney Int.* 1989; 36(6):1050-1060.
- Taylor SR, Turner CM, Elliott JI, McDaid J, Hewitt R, Smith J, Pickering MC, Whitehouse DL, Cook HT, Burnstock G, Pusey CD, Unwin RJ, Tam FW. P2X7 deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jun;20(6):1275-81. Epub 2009 Apr 23r
- Truong LD, Petrussevska G, Yang G, Gurpinar T, Shappell S, Lechago J, et al. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int.* 1996; 50(1):200-207.
- Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobe G, Johnson DW. Interleukin-1beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin

expression and fibronectin production. *Kidney Int.* 2002; 62(1):31-40.

Vonend O, Turner CM, Chan CM, Loesch A, Dell'Anna GC, Srai KS, *et al.*
Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int.* 2004; 66(1):157-166.

Wang CM, Chang YY, Sun SH. Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal.* 2003; 15(12):1129-1137.

Williams M. Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1987; 27:315-345.

Woda CB, Leite M, Jr., Rohatgi R, Satlin LM. Effects of luminal flow and nucleotides on $[Ca^{2+}]_i$ in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283(3):F437-446.

Yamate J, Okado A, Kuwamura M, Tsukamoto Y, Ohashi F, Kiso Y, *et al.*
Immunohistochemical analysis of macrophages, myofibroblasts, and transforming growth factor-beta localization during rat renal interstitial fibrosis following long-term unilateral ureteral obstruction. *Toxicol Pathol.* 1998; 26(6):793-801.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res.* 2001; 52:44-56.

ANEXOS

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](#)