

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	3
I.1 Os rins e sua fisiologia.....	6
I.4 Estresse do retículo endoplasmático (RE) e a doença renal.....	20
I.4.1 Enovelamento de proteínas e a ativação do estresse do RE.....	20
I.4.2 Ativação do estresse do RE na doença renal.....	25
I.5 Lipídios como sinalizadores intracelulares e extracelulares	27
I.5.1 Os lisofosfolipídios (LPLs): ácido lisofosfatídico (LPA)	27
I.6 O papel do LPA na isquemia/reperfusão (I/R).....	33
II. OBJETIVOS	35
II.1 Objetivos Específicos	35
III. MATERIAIS E MÉTODOS	36
III.1 Material	36
III.2 Animais e grupos experimentais	36
III.3 Cirurgia de isquemia-reperfusão (I/R)	37
III.4 Obtenção do homogeneizado purificado de córtex renal	40
III.5 Análise histológica	40
III.6 Análise dos parâmetros fisiológicos renais	41
III.6.1 Fórmulas utilizadas para a obtenção dos parâmetros fisiológicos renais:	41
III.7 Atividades ATPásicas	42
III.7.1 Atividade NKA	42
III.7.2 Atividade NaA.....	42
III.8 Atividade da proteína cinase C sensível ao DAG (PKC).....	43
III.9 Eletroforese e imunodeteção	43
III.10 Análise estatística.....	43

IV. RESULTADOS	44
IV.1 O tratamento com LPA protege a redução da filtração glomerular na I/R: avaliação dos parâmetros morfo-funcionais renais.....	44
IV.2 Efeito da I/R e do tratamento com LPA sobre os transportadores renais de Na ⁺ presentes no córtex renal.....	55
IV.3 Identificação da via de sinalização ativada pelo LPA durante a I/R.....	58
IV.4 Efeito da I/R na expressão das proteínas envolvidas com o estresse do RE e sua modulação pelo tratamento com LPA	62
V. DISCUSSÃO	65
VI. CONCLUSÃO	72
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS	73
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
Anexo 1: Artigo Científico	83
Anexo 2: Carta do CEUA para uso de animais experimentais.....	85

ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclase

ADP: adenosina difosfato

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

ASK1: *signal regulating kinase-1*

ATF4: fator de ativação transcricional 4

ATF6: fator de ativação transcricional 6

ATP: adenosina trifosfato

ATX: autotaxina

BAX-BAK: oligômero membro da família de gene Bcl-2

BUN: nitrogênio de ureia no sangue

C1P: ceramida-1-fosfato

Ceramida-1P: ceramida 1 fosfato

CHOP: *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*

C-terminal: carboxi terminal

DAG: diacilglicerol

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

eIF2 α : fator euraciótico - 2 de iniciação da translocação

ERAD: degradação associada ao retículo endoplasmático

FEC: fluido extracelular

GRP78: proteína regulada por glicose de 78 kDa

GRP94: proteína regulada por glicose de 94 kDa

IP₃: inositol trifosfato

IRA: insuficiência renal aguda

IRE1: *inositol-requiring enzyme 1*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

LPA: ácido lisofosfatídico

LPA: ácido lisofosfatídico

LPA₁: receptor do tipo 1 para o LPA

LPA₂: receptor do tipo 2 para o LPA

LPA₃: receptor do tipo 3 para o LPA

LPA₄: receptor do tipo 4 para o LPA

LPA₅: receptor do tipo 5 para o LPA

LPA₆: receptor do tipo 6 para o LPA

LPE: lisofosfatidiletanolamina

LPLs: lisofosfolipídios

LPPs: lipídios- fosfatases

MAPK: proteína quinase ativadora de mitógeno

MBL: membrana basolateral

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1

ML: membrana luminal

NaA: Na⁺-ATPase

NKA: (Na⁺ + K⁺)ATPase

NTA: necrose tubular aguda

N-terminal: amino-terminal

PA: ácido fosfatídico

PAS: ácido Periódico-Schiff

PE: fosfatidiletanolamina

PERK: *double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER protein kinase*

Pi: fosfato inorgânico

PI3K: cinase de fosfatidilinositol-3

PKC: proteína cinase C

PKG: proteína cinase G

PLC: fosfolipase C

PLD: fosfolipase D

PMA: acetato de forbol miristato

PMSF: fluoreto de fenil-sulfonil-metano

PPAR γ : receptor gama de peroxissomo ativador de proliferação

PS: fosfatidilserina

Rac: proteína de ligação à guanina

Ras: proteína de ligação à guanina

RE: retículo endoplasmático

Rho: GTPase homóloga a Ras

ROCK: Rho-cinase

SBN: sociedade brasileira de nefrologia

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida usando sódio dodecil sulfato

Sph: esfingosina

SRF: fator de resposta ao soro

TCA: ácido tricloroacético

TRAF2: tumor necrosis factor receptor-associated factor-2

UPR: unfloding protein respnose

XBP1: *X-box binding protein*

I. INTRODUÇÃO

I.1 Os rins e sua fisiologia

O organismo humano é composto por dois rins, que estão envolvidos por uma fina membrana, denominada cápsula renal. Ao redor deles existe a gordura peri-renal e, acima, estão localizadas as glândulas supra-renais. Através do hilo, o rim é irrigado pela artéria renal e vasos linfáticos, recebe toda a inervação e por onde saem a veia renal e o ureter. Morfológicamente, um rim é composto por 800 mil a 1 milhão de néfrons, as unidades funcionais renais. Os néfrons são formados pelo corpúsculo renal, responsável pelo processo de ultrafiltração do plasma (180 L de plasma/dia), e uma estrutura tubular, onde ocorrem os processos de secreção e reabsorção (FIGURA 1). O corpúsculo renal é constituído pelo glomérulo capilar (tufo de capilares) que é envolto pela cápsula de Bowman (KRIZ & KAISLING, 1985).

A arquitetura do túbulo renal é formada por cinco porções sequenciais denominadas: 1) túbulo proximal: permeável a água com alta taxa de reabsorção ativa de solutos; 2) ramo descendente fino da alça de Henle: segmento bastante permeável à água, apresenta apenas transporte passivo; 3) ramo ascendente fino e grosso da alça de Henle: considerado o segmento diluidor, é impermeável à água e possui alta taxa de reabsorção de solutos; 4) túbulo distal: possui baixa condutância iônica, desfavorecendo o transporte passivo de íons, e 5) ducto coletor: o segmento regulador fino da formação final da urina possui permeabilidade à água e taxa de transporte de solutos controlada pelos níveis de hormônio antidiurético, vasopressina e aldosterona (GOTTSCHALAK, 1963; MELLO-AIRES, 2008c) (FIGURA 2). Cada segmento tubular apresenta características histológicas e funcionais distintas e, portanto, é regulado por hormônios e autacóides de maneira específica. Tema central desta dissertação destaca-se o túbulo proximal que é o primeiro segmento após o glomérulo, formado por epitélio cúbico simples. A membrana luminal é do tipo borda em escova, o que lhe confere grande superfície de reabsorção. Além disso, possui inúmeras mitocôndrias adjacentes à membrana basolateral o que é coerente com a sua alta capacidade de transporte ativo.

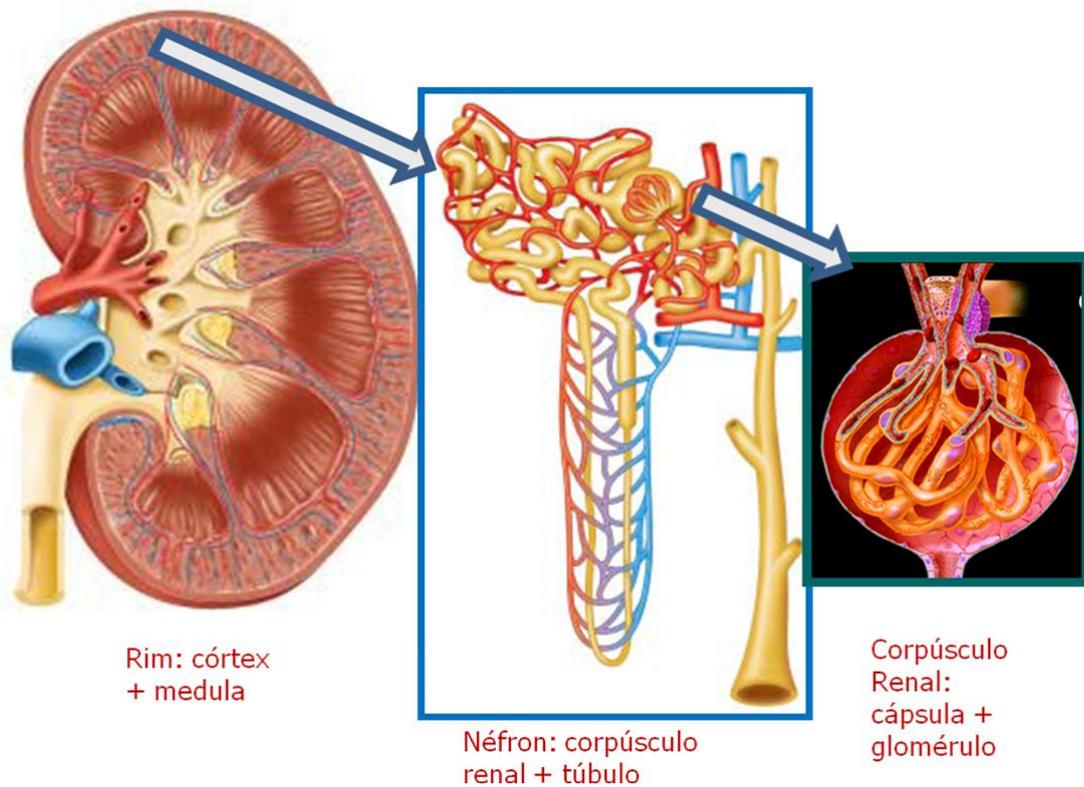


Figura 1: O rim e suas estruturas funcionais. É mostrado em detalhes o néfron (unidade funcional do rim) que é composto do corpúsculo renal e túbulos renais. No glomérulo ocorre a primeira etapa de formação da urina, o processo de filtração do plasma. Os segmentos tubulares são envolvidos pelos capilares peritubulares. (Collage of sciences, State University, San Diego <[HTTP://www.sci.sdsu.edu/Faculty/Paul.Poalini/ppp/lecture23/sld009.htm](http://www.sci.sdsu.edu/Faculty/Paul.Poalini/ppp/lecture23/sld009.htm)>, Acesso em: 24.07.13.

Nos segmentos tubulares, solutos e água podem ser reabsorvidos e secretados pelas vias transcelular ou paracelular de acordo com a característica da célula epitelial de cada segmento. As células epiteliais renais são unidas lateralmente por junções aderentes (*tight junctions*). Essas junções evitam a difusão lateral de constituintes da membrana (GONZALEZ-MARISCAL *et al*, 2003), garantindo a separação de diferentes compartimentos do organismo e separando a membrana plasmática em duas porções distintas: membrana apical ou luminal (ML), voltada para o lúmen do túbulo renal; e membrana basolateral (MBL), em contato com o interstício. Tal segregação permite a manutenção de diferenças estruturais (presença de vilosidades ou não) e funcionais (composição de transportadores, receptores e redes regulatórias) entre as duas membranas e torna possível o transporte vetorial transepitelial (FÉRRAILLE & DOUCET, 2001). Desta forma, em estados euvolêmicos cerca de 70% do fluido ultrafiltrado são reabsorvidos no túbulo proximal, aproximadamente 25% na alça de Henle, 4% no túbulo distal e 2-3% no ducto coletor, como resultado apenas 1% do volume ultrafiltrado é eliminado pela urina (LAYTON, 2012; MELLO-AIRES, 2008a).

Os rins possuem funções endócrinas e homeostáticas essenciais para o funcionamento do organismo, além de terem um papel fundamental na excreção de produtos do metabolismo e substâncias estranhas. A manutenção do meio interno do organismo se dá por uma série de processos específicos, entre eles podemos citar: eliminação de substâncias tóxicas e metabólitos do sangue por um sistema de filtração, conservação de nutrientes pelo processo de reabsorção, regulação do pH, do volume e da osmolaridade do fluido extracelular (FEC) e produção de hormônios (WRIGHT, 1952; MELLO-AIRES, 2008a,b).

O fluido que ocupa o compartimento extracelular (FEC) é uma solução que contém vários solutos, sendo o cátion predominante o Na^+ (140 mM) e os ânions Cl^- (100 mM) e bicarbonato (25 mM). Devido à baixa permeabilidade ao Na^+ , em função da grande camada de solvatação, a bicamada lipídica da membrana plasmática torna-se praticamente impermeável para a sua difusão simples. Associado a esta condição tem-se a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$ (NKA) presente na membrana celular, que transfere três íons Na^+ do meio intracelular para o meio extracelular, em troca de dois íons K^+ e às custas da hidrólise de ATP (FÉRRAILLE & DOUCET, 2001). Assim, a abundância de Na^+ no meio extracelular faz deste íon o principal componente osmótico dos líquidos extracelulares e, portanto, determinante do seu volume. Dessa forma, também são mantidas baixas concentrações intracelulares de Na^+ , evitando o rompimento das células.

A regulação do volume do FEC está relacionada com o equilíbrio entre a ingestão e a excreção de Na^+ , sendo este último dependente da função renal. Assim, quando a ingestão de Na^+ é maior que a sua excreção, ocorre o chamado balanço positivo de Na^+ e, conseqüentemente o aumento do volume do FEC. Ao contrário, uma dieta com baixo teor de Na^+ acarreta no balanço negativo de Na^+ e queda de volume do FEC (LAYTON, 2012). Diferentes sistemas hormonais são acionados em resposta às variações de volume e deflagram vias de sinalização que culminam na modulação da reabsorção renal de Na^+ e, conseqüentemente água, mantendo a homeostasia do FEC (ABASSI *et al.*, 2004). Desta forma, o rim pode variar o volume final de urina a ser excretado de 0 a 6% do volume do ultrafiltrado. A determinação desta rede regulatória e os possíveis pontos de intervenção farmacológica são importantes uma vez que esta regulação evita a perda ou a retenção excessiva de solutos e água pelos rins.

A reabsorção transcelular de solutos e água é acoplada à reabsorção de Na^+ . A FIGURA 2 ilustra como ocorre o processo de reabsorção de Na^+ no epitélio tubular renal. Este processo é dependente do gradiente eletroquímico de Na^+ formado entre a luz tubular e o meio intracelular gerado pelos transportadores ativos primários de Na^+ : NKA e a segunda bomba de Na^+ : a Na^+ -ATPase (NaA) presentes na membrana basolateral. Este gradiente fornece a energia necessária para que transportadores ativos secundários presentes na membrana luminal (cotransportadores de Na^+ /aminoácidos, Na^+ /glicose, trocadores Na^+/H^+) transportem solutos acoplados à reabsorção de Na^+ . A passagem desses solutos através da membrana basolateral ocorre por difusão passiva a favor de seu gradiente de concentração (LAYTON, 2012; MELLO-AIRES, 2008b). Nas células epiteliais do ducto coletor também se observa a presença de canais de Na^+ na membrana luminal.

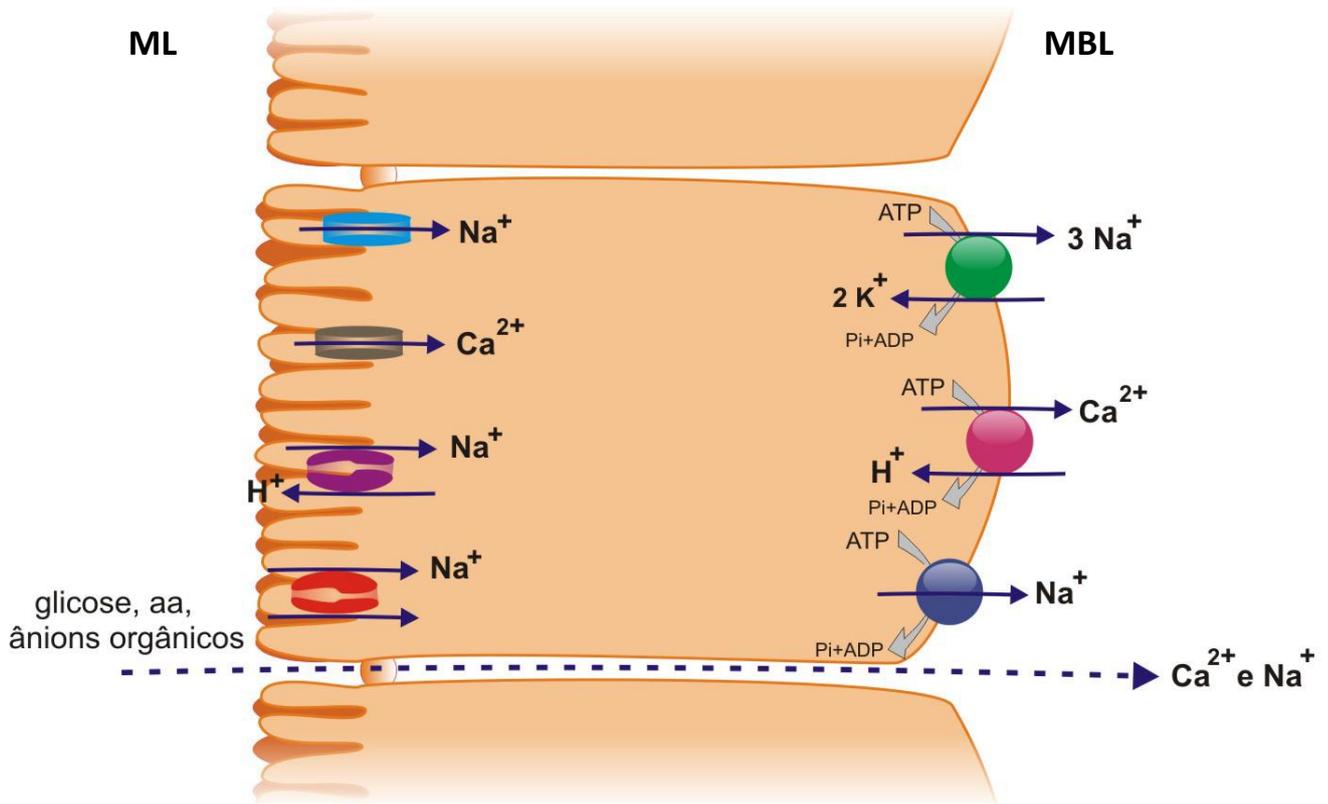


Figura 2: Esquema representativo da célula epitelial tubular renal. Neste desenho simplificado da célula renal são evidenciados os diferentes mecanismos de transporte, em destaque para os transportadores ativos primários presentes na membrana basolateral (MBL, voltada para o interstício), que utilizam energia proveniente da hidrólise de ATP para fazer o transporte de íons contra o seu gradiente eletroquímico. Já a membrana luminal (ML, voltada para a luz tubular) apresenta transportadores ativos secundários que utilizam, majoritariamente, a energia do gradiente de Na^+ para co-transportar íons. A ilustração mostra ainda o transporte paracelular de solutos como glicose aminoácidos e ânions orgânicos (CABRAL 2006, Dissertação de Mestrado do IBCCF/UFRJ).

I.2 Transportadores renais primários de Na^+ presentes na membrana basolateral renal

Na membrana basolateral das células epiteliais renais existem dois transportadores primários ativos responsáveis pela reabsorção do íon Na^+ : (1) a NKA, sensível à ouabaína, e (2) a NaA, insensível à ouabaína e sensível à furosemida (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970; PROVERBIO *et al*, 1991; MORETTI *et al*, 1991; ARENSTEIN *et al*, 1995). Essas são enzimas do tipo-P, pois utilizam a energia química da ligação fosfoanidrido γ -terminal do ATP, formando um intermediário fosforilado, para fazer o transporte de Na^+ para fora da célula, contra seu gradiente eletroquímico (FÉRRAILLE & DOUCET, 2001).

A NKA foi a primeira bomba de íon descoberta (SKOU, 1957). Esta enzima transporta 3 íons Na^+ para fora da célula e 2 íons K^+ para dentro, às custas da hidrólise do ATP. Esta diferença estequiométrica entre o Na^+ e o K^+ transportado através da membrana plasmática garante a característica eletrogênica da bomba, que em tecidos excitáveis contribui para manutenção do potencial da membrana.

A FIGURA 3 mostra o ciclo catalítico da NKA e a formação dos dois estados conformacionais da enzima: o estado E1 e o E2. Estes estados são caracterizados pelas diferenças de afinidade por Na^+ , K^+ e ATP (MOLLER *et al*, 1996). A conformação E1 apresenta alta afinidade para Na^+ e ATP e baixa para K^+ ; ambos os sítios de ligação de cátions estão voltados para o lado intracelular. A conformação E2 apresenta baixa afinidade para Na^+ e ATP e alta para K^+ ; ambos os sítios de ligação de cátions estão voltados para o lado extracelular (MOLLER *et al*, 1996).

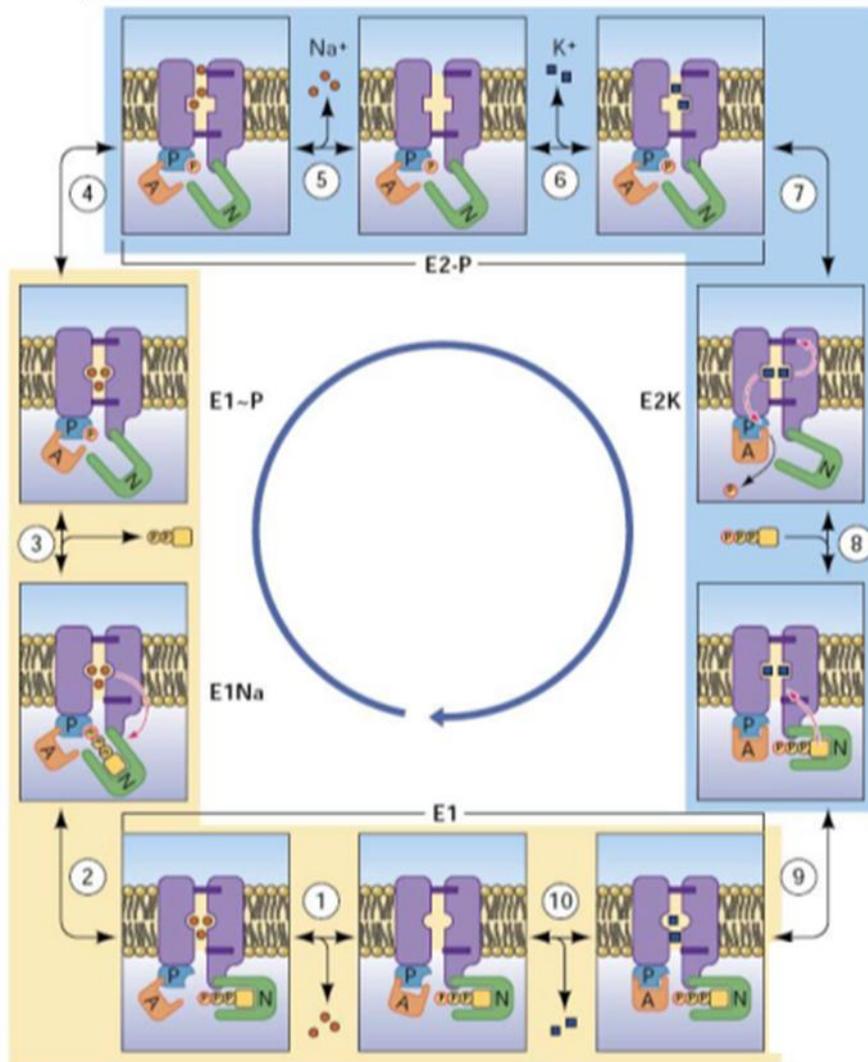


Figura 3: Ciclo catalítico da NKA. (1) A ligação do nucleotídeo no domínio N e ligação de três Na^+ (E1) (2) faz com que haja a fosforilação do domínio P (E1Na), (3) e hidrólise do ATP pelo domínio A, liberando ADP e formando um intermediário de alta energia (E1~P) (4). (5) Há a transferência dos três Na^+ para o exterior, (6) e a ligação de dois K^+ na superfície extracelular. (7) Ocorre a defosforilação do intermediário fosforilado (E2K) pelo domínio A, (8) podendo haver a ligação do nucleotídeo no domínio N (9). (10) Em seguida, ocorre a transferência dos dois K^+ através da membrana para o citosol (modificado de HORISBERGER, 2004).

A purificação e a clonagem da NKA mostraram que essa enzima é um heterodímero integral de membrana composto de duas cadeias polipeptídicas principais (α e β), associadas na razão de 1:1 e outra acessória (γ) (BLANCO & MERCER, 1998). A subunidade α (110 kDa) é a subunidade catalítica, possui 10 domínios transmembrana com suas regiões terminais (NH_2 e COOH^-) voltada para o citoplasma. Esta subunidade é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima, contendo sítios de ligação para cátions, ATP, ouabaína (BLANCO & MERCER, 1998) e sítios de fosforilação para proteínas cinases (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994; FÉRRAILLE & DOUCET, 2001) (FIGURA 4).

A subunidade β é menor e possui cerca de 300 aminoácidos (37 kDa), possui apenas um domínio transmembrana com a porção extracelular glicosilada. Essa subunidade é necessária para o correto enovelamento e inserção correta da enzima recentemente sintetizada na membrana plasmática e para a estabilização da subunidade α (GEERING, 2001). Há evidências que a subunidade β afeta a ligação intrínseca e transporte de íons (GEERING, 2001). A subunidade γ é a menor de todas, com 9 kDa e uma cadeia de 53 aminoácidos, possui um único domínio transmembrana com um NH_2 terminal voltado para o meio extracelular. Essa subunidade não é requerida para a atividade da enzima e foi identificada como um membro da família dos transportadores regulatórios chamado de sequência de aminoácidos invariantes. No entanto, no tecido renal essa subunidade é bastante expressa e atua como regulador fino da atividade da ATPase (RIVARD *et al.*, 2005).

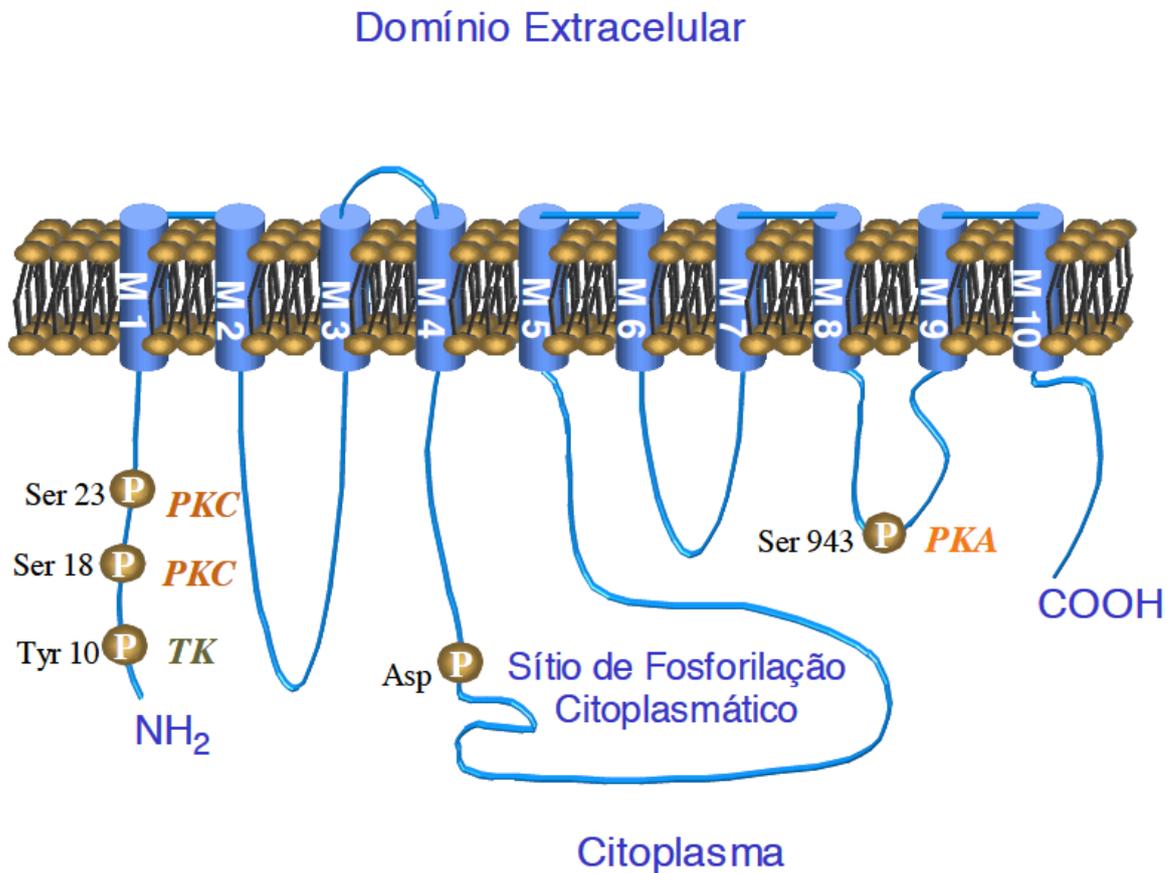


Figura 4: Estrutura da subunidade α da NKA e localização de alguns aminoácidos fosforilados por diferentes cinases. A porção N-terminal citosólica possui sítio de fosforilação para enzimas como PKC e tirosina cinase. Na grande alça citoplasmática, o sítio de fosforilação forma ligação acilfosfato. A porção C-terminal é voltada para o meio intracelular. PKA: proteína cinase A; PKC: proteína cinase C; TK: tirosina cinase. (Adaptado de FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Na membrana plasmática a NKA pode ser constituída a partir de diferentes isoformas das subunidades α e β . Foram encontradas 4 isoformas para subunidade α e 3 para a subunidade β que são codificadas por genes distintos, além de duas variantes para a subunidade γ geradas a partir de um único gene (SHULL *et al*, 1986; SHAMRAJ & LINGREL, 1994; FÉRRAILLE & DOUCET, 2001). A NKA é uma proteína constituinte de todas as células eucarióticas, nas diferentes espécies animais. Baseando-se na sensibilidade diferenciada à ouabaína, foram caracterizadas farmacologicamente as três diferentes isoformas da NKA (SWEADENER, 1989). SHULL em 1986 clonou a sub-unidade α e β das três isoformas ($\alpha_{1,2,3}$ e $\beta_{1,2,3}$) descritas até então. SHAMRAJ em 1994, clonou a mais nova isoforma α_4 . As isoformas variam com a sua distribuição tecidual, suas afinidades pelo Na^+ e suas sensibilidades à ouabaína. Cineticamente, α_2 e α_3 possuem uma maior afinidade para o Na^+ do que α_1 , embora α_1 , α_2 e α_3 apresentam a mesma afinidade para o K^+ . Combinações diferentes entre estas isoformas foram expressas e ensaiadas, obtendo-se diferentes níveis de atividade da enzima. Noventa por cento da enzima encontrada no tecido renal é formado pelo heterodímero $\alpha_1\beta_1$ (PIERRE *et al.*, 2011).

Um importante mecanismo regulatório da NKA nos rins é a fosforilação por proteínas cinases A (PKA) e C (PKC). A fosforilação da subunidade α da enzima já foi descrita tanto no tecido homogeneizado, como em células intactas. Diversos estudos sugerem que a fosforilação da PKA tem efeito estimulatório sobre a enzima em células renais nativas de rato. Já em resposta a fosforilação por PKC, a enzima pode ter sua atividade estimulada, inibida ou invariável. Essas discrepâncias observadas em células renais intactas podem ocorrer devido a dois fatores, a internalização da subunidade ativa da enzima e/ou aumento da afinidade da enzima pelo Na^+ . Essa enzima ainda pode ser regulada por lipídios como colesterol (componente da membrana plasmática) e a fosfatidilcolina que interagem com segmentos transmembranares da NKA (CORNELIUS, 2001; 2008; CORNELIUS *et al*, 2003). As ativações de vias de sinalização que culminem com a alteração no perfil de fosforilação da NKA podem estar associadas à modificação na excreção renal de Na^+ e no desenvolvimento de patologias como a hipertensão (COSTA-SILVA *et al*, 2008; QUEIROZ-MADEIRA *et al*, 2010).

Vale a pena ressaltar que a NKA, além de uma ATPase é considerado um receptor de glicosídeos tais como os digitálicos cardíacos, utilizados para tratar doenças como a insuficiência cardíaca congestiva capazes de ativar uma via de sinalização intracelular própria (XIE & CAI, 2003).

Uma segunda atividade ATPásica dependente de Na^+ foi demonstrada inicialmente em fatias de córtex renal, por meio de medida da extrusão de Na^+ e água na ausência de K^+ e na presença de 2 mM de ouabaína, inibidor da NKA (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970). Pesquisadores propuseram o envolvimento de uma enzima diferente da NKA na reabsorção de Na^+ em córtex de rim de rato. A proposta baseava-se, inicialmente, na insensibilidade da enzima à ouabaína e na sensibilidade ao ácido etacrínico e furosemida, dois conhecidos diuréticos de alça (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970). Posteriormente, foi demonstrada que a atividade NaA estava localizada na membrana basolateral de túbulos proximais renais (PROVERBIO & DEL CASTILLO, 1981). No entanto, já em 1969, MALNIC e COLABORADORES observaram que a furosemida inibe a reabsorção de Na^+ no túbulo proximal, resultando num aumento da excreção renal deste íon. Foi o primeiro relato na literatura sobre a relação entre a NaA e a excreção renal de Na^+ .

Apesar da extensiva caracterização bioquímica, funcional e farmacológica da NaA que indicava a sua existência e a sua relevância fisiológica, por quase 40 anos, nenhuma proteína ou gene relacionado a esta atividade ATPásica havia sido identificado. Apenas, recentemente, a NaA foi isolada e clonada por ROCAFULL e COLABORADORES em 2011, utilizando preparações enriquecidas em membrana basolateral de enterócitos de cobaia. Os genes da NaA e da NKA estão presentes no mesmo locus (*atp1a1*) porém apresentam regiões promotoras diferentes e diferentes exons (ROCAFULL *et al*, 2011). A proteína codificada possui 811 aminoácidos, apresentando 64% de identidade e 72% de homologia com a subunidade α da NKA de rim de porco. A purificação dessa enzima por eletroforese em SDS-PAGE mostrou que é constituída por duas subunidades α (90 kDa) e β (50 kDa). As marcantes diferenças bioquímicas entre as bombas de Na^+ apropriadamente diferenciam estas duas ATPases e, claramente define a NaA como uma entidade molecular única. A identificação de uma atividade ATPásica estimulada por Na^+ e insensível a ouabaína em diferentes espécies de animais e tecidos, demonstra a ubiquidade da enzima (PROVERBIO *et al*, 1991). Ao longo do néfron, a distribuição da NaA e da NKA não é paralela: ambas

enzimas são expressas no córtex externo, mas a expressão de NaA é menor nas regiões internas do rim e ausente na medula.

A NaA, por sua dependência ao Mg^{2+} , sensibilidade ao vanadato e capacidade de formar um intermediário fosforilado durante o seu ciclo catalítico, se classifica também como uma ATPase do tipo P, e alvo da inibição por furosemida (ROCAFULL *et al*, 2012). O ciclo reacional mínimo proposto para a NaA compreende: (1) na fosforilação da isoforma E1 a partir do ATP, na presença de Mg^{2+} e Na^+ , resultando na isoforma E1.P.Na, sensível ao ADP e (2) na alteração conformacional da isoforma em E2.P.Na, insensível ao ADP que é susceptível a defosforilação. Esta alteração conformacional favorece o transporte de Na^+ pela membrana. Utilizando a enzima purificada, foi demonstrado que a furosemida estabiliza o intermediário fosforilado na conformação E1.P.Na (DE SOUZA *et al*, 2007). Além disso, a análise do sequenciamento de aminoácidos demonstrou que a presença de todos os motivos que caracterizam enzimas da família P-ATPase: o domínio DKTGT(L/I)T (sítio de fosforilação do aspartato; formando o intermediário fosfo-aspartato), o domínio GDFVND (domínio dehalogenase; que possui um papel na catálise de fosforilação/defosforilação no centro ativo onde se encontra o invariante aspartato), o domínio TGE (domínio sensível a fosfatase) e os resíduos necessários para a ligação dos nucleotídeos (ROCAFULL *et al*, 2011).

A análise estrutural da NaA identificou sítios de fosforilação por proteínas cinases e fosfatases (ROCAFULL *et al*, 2011). Nosso grupo demonstrou que a NaA é regulada por lipídios bioativos, hormônios e autacóides cujas vias de sinalização tem como mecanismo molecular chave a ativação de proteínas cinases (CARUSO-NEVES *et al*, 2000a; 2003; RANGEL *et al*, 2005; WENGERT *et al*, 2007; CABRAL *et al*, 2008 LARA *et al*, 2008). Quando ativadas isoladamente, PKA e PKC promovem o aumento da atividade Na^+ -ATPásica, uma vez que: (1) a toxina da cólera estimula a atividade Na^+ -ATPásica de maneira dose dependente, efeito semelhante ao observado com AMPc; (2) forskolina, um ativador de adenilato ciclase, aumenta a atividade da enzima; (3) o inibidor de PKA reverte o efeito de AMPc e de PKA; (4) ésteres de forbol estimulam a atividade Na^+ -ATPásica, sendo este efeito revertido por inibidor de PKC; (5) a sub-unidade catalítica da PKC promove o estímulo da atividade da enzima (CARUSO-NEVES *et al*, 2000b; RANGEL *et al*, 2001; 2002; LOPES *et al*, 2004). Por outro lado, a ativação de PKA reverte o aumento da atividade da NaA promovido por PKC e vice-versa. A ativação de vias de sinalização que culminam com o

estímulo de proteína cinase G (PKG) inibem a atividade Na^+ -ATPásica (BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002).

A presença de uma atividade Na^+ -ATPásica independente de K^+ com uma função aparentemente similar a da NKA pode permitir a extrusão de Na^+ , Cl^- e água sob circunstâncias onde o transporte transepitelial de Na^+ (ex: transporte transepitelial de Na^+ acoplado a açúcares e aminoácidos) ou a reabsorção de água são altamente estimulados, com pouco efeito relevante sobre a NKA. Desta forma, seria eliminada a necessidade da regulação da concentração celular de K^+ para manter o potencial de membrana. Vale a pena ressaltar que a identificação de sítios específicos de regulação na região promotora indicam a regulação diferencial destas duas enzimas sobre a perspectiva fisiológica (resposta dos sistemas hormonais e autacóides) (CARUSO-NEVES *et al*, 1997; CARUSO-NEVES *et al*, 2004) e fisiopatológica como na hipertensão essencial (QUEIROZ-MADEIRA *et al*, 2010).

I.3 Insuficiência renal aguda (IRA)

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), a IRA é definida como a redução aguda da função renal em horas ou dias. Esta doença refere-se principalmente a diminuição do ritmo de filtração glomerular e/ou do volume urinário acarretando na retenção de nitrogênio de uréia e de creatinina no sangue, diminuição da diurese e desequilíbrio hidroeletrolítico e ácido-base. A IRA é classificada em 3 tipos: (a) IRA pré-renal: tipo mais comum e é o resultado de uma hipoperfusão renal devido à uma diminuição do volume intravascular efetivo provocado pela desidratação, vasodilatação periférica ou por um baixo débito cardíaco; (b) IRA renal (intrínseca ou estrutural): a principal causa é a Necrose Tubular Aguda (NTA). Esta é resultante de uma variedade de lesões aos vasos sanguíneos renais, glomerulares, tubulares ou intersticiais. Estas lesões podem ser causadas por toxicidade, infecções, reações imunológicas, de forma idiopática, ou desenvolvida como parte de uma doença sistêmica ou renal primária; e (c) IRA pós-renal: resulta de uma obstrução do trato urinário alto ou baixo (SBN, 2007).

A IRA pode evoluir rapidamente para um quadro de insuficiência renal crônica (IRC) e ao estágio final da doença renal. Desta forma, apresenta alta taxa de morbidade e mortalidade, esta varia de 20% a 90%, dependendo da população estudada (LIMA *et al*, 2005; SANTOS *et al*, 2006). Muito comum em pacientes hospitalizados, afetando de 25-30% dos

pacientes em unidades de tratamento intensivo, prolongando a internação hospitalar a IRA também é preocupante durante o processo de transplante renal porque pode encurtar a meia-vida do órgão ou aumentar a probabilidade de rejeição (SBN, 2007; BONVENTRE & WEINBERG, 2003). Estima-se que o tratamento de IRA custe um total de mais que \$3 bilhões por ano nos Estados Unidos. No Brasil a prevalência não é muito diferente. A Sociedade Brasileira de Nefrologia estima que há 91.314 de pacientes em tratamento dialítico no ano de 2011, sendo 84,9% beneficiados pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A incidência de novos pacientes cresce cerca de 8% ao ano (variação estimada tomando como base os anos de 2004 – 2007) (SBN, 2007), tendo sido 18.000 pacientes em 2001. O gasto com o programa de diálise e transplante renal no Brasil situa-se ao redor de 1,4 bilhões de reais ao ano, o que representa 10% de toda a verba destinada a saúde. Neste contexto, a identificação dos pacientes de risco (idosos, doentes renais crônicos, diabéticos, obesos, hipertensos) e a instituição de medidas apropriadas de prevenção são cruciais (SNB, 2007).

Na grande maioria desses quadros de IRA, a isquemia do tecido renal, gerando o processo de Necrose Tubular Aguda é a responsável por cerca de $\frac{3}{4}$ dos casos. Destacam-se o transplante renal, reconstrução de artérias, contrastes que induzem nefropatias, choque e parada cardíaca como condições clínicas que promovem alterações na demanda e no consumo de oxigênio no rim causando injúrias renais isquêmicas. A restauração do fluxo sanguíneo ao tecido isquêmico pode resultar na recuperação das células se o dano for reversível. Entretanto, dependendo da intensidade e da duração do insulto isquêmico um grande número de células ativam o processo de apoptose quando o fluxo sanguíneo é reestabelecido (BONVENTRE & WEINBERG, 2003) o processo se complica pelo fato que a reperfusão, embora seja necessária para a sobrevivência do tecido renal isquêmico, agrava o quadro da doença, já que o fluxo sanguíneo renal é reduzido em 50% após o processo (ARENDSHORT *et al*, 1975; BONVENTRE & WEINBERG, 2003; SBN, 2007).

Os tipos de IRA inicialmente citados nessa seção variam entre formas menos severas até mais avançadas onde o principal tratamento é o de alívio dos sintomas, uma vez que fármacos que foram eficazes em reduzir a injúria do tecido renal em modelos animais, falharam em humanos (JO *et al*, 2007; CHATAURENT *et al*, 2011). Dessa forma, o entendimento do funcionamento do rim, bem como dos mecanismos moleculares regulatórios que ocorrem durante o principal causador da IRA, a isquemia renal, se fazem necessário, visando o desenvolvimento de novos fármacos que atuem na prevenção da função renal. Uma

das mais recentes descobertas na literatura é a ativação do estresse do retículo endoplasmático durante o processo isquemia-reperusão renal (DICKHOUT & KREPINSKY, 2009; INAGI, 2010). Esse mecanismo vem se tornando um novo e interessante alvo de estudo no ambiente celular da doença renal.

I.4 Estresse do retículo endoplasmático (RE) e a doença renal

I.4.1 Enovelamento de proteínas e a ativação do estresse do RE

As proteínas possuem uma multiplicidade de tarefas nos sistemas biológicos tais como: catalisadores químicos, transmissores de sinais, transportadores de moléculas, movimentação celular e formação da estrutura de células e tecidos (MITREA & KRIWACKI, 2013). A função da proteína é ditada pela sequência primária de aminoácidos que, por sua vez, determina a organização tridimensional e o comportamento das proteínas (MITREA & KRIWACKI, 2013). De uma maneira geral, as proteínas possuem certa flexibilidade e capacidade de alteração conformacional da cadeia polipeptídica. No entanto, a posição da sequência de aminoácidos e a distribuição das regiões polares e apolares da cadeia peptídica garantem uma conformação específica, que está relacionada com sua funcionalidade, a esse fenômeno dá-se o nome de enovelamento (ALBERTS *et al*, 2007; MITREA & KRIWACKI, 2013). A porção hidrofóbica se volta para o interior da molécula evitando o contato com o ambiente aquoso; enquanto a região hidrofílica é arranjada na porção externa, garantindo a interação com a água e moléculas polares. O enovelamento de proteínas, inicialmente, envolve o estabelecimento da estrutura secundária, particularmente alfa-hélices e folhas-beta pregueadas, posteriormente uma estrutura terciária – que envolve ligações covalentes na forma ligações dissulfeto entre dois resíduos de cisteína e quaternárias (através da montagem de sub-unidades previamente enoveladas) (SCHÖRDER & KAUFMAN, 2007; ALBERTS *et al*, 2007). O processo contrário chama-se desenovelamento (desnaturação), onde uma proteína original é forçada a perder a sua configuração funcional, tornando-se uma cadeia amorfa e não-funcional de aminoácidos (SCHÖRDER & KAUFMAN, 2007; ALBERTS *et al*, 2007).

Proteínas recém-sintetizadas que dão origem a proteínas secretórias e transmembranares são translocadas para o RE onde devem ser adequadamente enoveladas antes de serem transportadas para as organelas-alvo. As proteínas que não são enoveladas adequadamente são transportadas para o citossol através do mecanismo de degradação associado ao RE (do inglês: *endoplasmatic reticulum-associated degradation*; ERAD) por um

sistema de proteasoma (GARDNER *et al*, 2013). Para garantir o enovelamento correto e prevenir a agregação no lúmen do RE, um ambiente com alta concentração de proteínas (~100 mg/mL), uma grande quantidade de chaperonas e enzimas realizam a maturação das proteínas pela clivagem do peptídeo sinal, glicosilação e formação de ligação dissulfeto (ARAKI & NAGATA, 2011). As chaperonas, em particular, estão envolvidas no processo de controle de qualidade do RE e dentre elas se destacam a BiP/GRP78 (proteína ligante de imunoglobulina de cadeia pesada/proteína regulada por glicose de 78 kDa) e a GRP94 (proteína regulada por glicose de 94 kDa). GRP78 é a responsável pela translocação de polipeptídeos nascentes, pelo enovelamento proteico e agregação, pelo direcionamento de proteínas para a maquinaria ERAD e pela homeostasia do Ca^{2+} (GARDNER *et al*, 2013).

O RE é sensível a alterações no ambiente como isquemia, privação de glicose, estresse oxidativo ou mutação genética que podem causar o enovelamento aberrante de proteínas (KAUFMAN, 1999; VEMBAR & BRODSKY, 2008). O acúmulo dessas proteínas aberrantes (não enoveladas ou mal enoveladas), no lúmen do RE, induz uma disfunção, levando a um distúrbio da homeostase do RE. As proteínas recém-fabricadas no RE perdem sua estrutura terciária, e conseqüentemente, sua funcionalidade (SCHÖRDER & KAUFMAN, 2007; DICKNOUT & KREPINAKY, 2009). O aumento de proteínas desenoveladas no RE é denominado “*estresse do RE*” e pode gerar conseqüências deletérias para a célula. Desta forma, o estresse do RE resulta em uma resposta celular altamente conservada ao acúmulo de proteínas desenoveladas no RE, denominada *Unfolding Protein Response* (UPR) (DAVID & PETER, 2007). A UPR coordena o aumento da capacidade de enovelamento do RE, biossíntese de lipídios e da maquinaria ERAD com a diminuição do aporte de proteínas recém-sintetizadas (através do aumento da degradação do RNAm e da repressão traducional) (INAGI, 2010). Por estas ações, a UPR é uma resposta citoprotetora, permitindo que as células se adaptem a nova condição. No entanto, durante um severo e/ou prolongado estresse, a UPR pode se tornar citotóxica através da ativação da apoptose (INAGI, 2010). A apoptose induzida pela UPR é um importante fator patogênico de uma grande variedade de doenças, inclusive a doença renal (INAGI, 2010).

Tem sido demonstrado que a proteína GRP78 é a principal chaperona que determina o destino da célula pelo grau de ativação da UPR, pois está ligada a três proteínas transmembranares encontradas no RE (BERTOLOTTI *et al*, 2000; RON & WALTER, 2006) (FIGURA 6). As proteínas de membrana do RE são: ATF6 (*Activating Transcription Factor*

6), IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*) e PERK (*double-stranded RNA-dependent Protein kinase-like ER protein Kinase*) (RON & WALTER, 2006). A dissociação entre GRP78 e estes três indutores de UPR devido a sua alta afinidade de ligação por proteínas desenoveladas no lúmen do RE leva à ativação do processo (FIGURA 6).

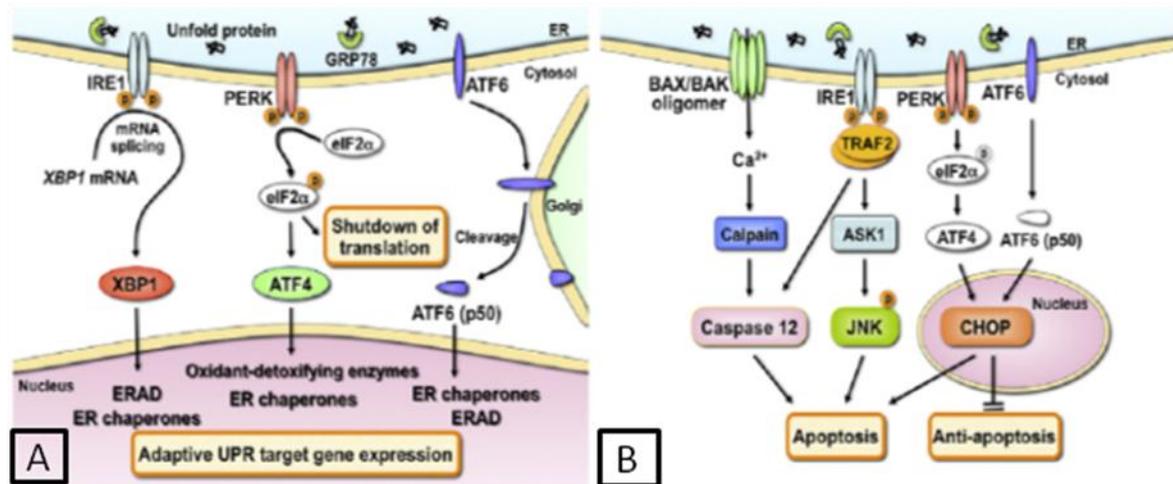


Figura 6. Resposta UPR. Em situação basal GRP78 está ligada a proteínas de membrana do RE (IRE1, ATF6 p90 e PERK), impedindo a ativação da UPR. No entanto, quando esse processo é ativado pode haver recuperação ou morte celular. As proteínas que não são enoveladas adequadamente são transportadas para o citossol através do mecanismo de degradação associado ao RE (ERAD). (A) Para prevenir a morte celular sobre condições do estresse do RE, IRE1, PERK, ou ATF6 induzem a UPR promovendo a expressão de genes que codificam chaperonas, degradação de proteínas no RE (ERAD) e enzimas oxidantes e detoxificantes. (B) No caso de vias de sinalização serem ativadas devido a um severo e prolongado estresse do RE, as células são eliminadas do organismo pela resposta pró-apoptótica da UPR, mediada por CHOP, JNK e caspase 12. GRP78: proteína regulada por glicose de 78 kDa; ATF4: fator de ativação transcricional 4; ATF6: fator de ativação transcricional 6; CHOP: CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; ERAD: degradação associada ao retículo endoplasmático; BAX-BAK: oligômero membro da família de gene Bcl-2; IRE1: inositol-requiring enzyme 1; JNK: c-Jun N-terminal kinase; PERK: double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER protein kinase; XBP1: X-box binding protein; eIF2 α : fator eucariótico - 2 de iniciação da translocação. (Retirado de INAGI, 2009).

O acúmulo de proteínas desenoveladas ou mal-enoveladas aumenta a expressão de GRP78, GRP94 e da proteína isomerase dissulfídica (PDI) que aumenta a capacidade do RE em enovelar proteínas. Esse fenômeno ocorre por três vias:

(1) Via de IRE1: como uma proteína transmembranar tipo 1, IRE1 apresenta uma região amino-terminal voltada para o lúmen e a carboxi-terminal para o citoplasma que contém os domínios cinase e RNase (YAMAMOTO *et al*, 2007). Após se desligar de GRP78, IRE1 sofre dimerização/oligomerização pela região luminal ativando o domínio RNAase. A RNAase cliva o RNAm XBP1 (do inglês: X-box binding protein 1) que inicia uma cascata de *splicing* que viabiliza o aumento da transcrição de genes que codificam chaperonas e proteínas envolvidas na ERAD (YAMAMOTO *et al*, 2007);

(2) Via de PERK: também proteína transmembranar tipo 1, o domínio citosólico apresenta um domínio serina/tirosina cinase que sofre trans-autofosforilação em resposta ao estresse do RE e fosforila o fator de iniciação de tradução eIF2 α . Essa fosforilação resulta na redução geral de síntese de proteínas e diminui o aporte de proteínas para o RE (MALHOTRA & KAUFMAN, 2007);

(3) Via ATF6: é uma proteína transmembranar tipo II. Em resposta ao estresse do RE, ATF6 transita do RE para o Golgi, onde é clivado sequencialmente por duas proteases (S1P e S2P). Dessa clivagem é liberado o fator de transcrição da região amino-terminal que é transportado para o núcleo onde se liga ao elemento responsivo ao estresse do RE (ERSE) ativando a transcrição genes-alvo da UPR (YAMAMOTO *et al*, 2007; DAVID & PETER, 2007; ADACHI *et al*, 2008).

A ativação prolongada da UPR também pode induzir a morte celular por apoptose, mecanismo ativado pelo vazamento de Ca²⁺ do próprio RE (DICKNOUT & KREPINSKY, 2009). A apoptose é mediada por vários fatores pró-apoptóticos, como:

(1) CHOP: um fator de transcrição que geralmente regula fatores anti-apoptóticos, é regulado pela via de sinalização de IRE1-eIF2 α e ATF6. Sua ativação reduz a apoptose e injúrias oxidativas. Contudo, dependendo da duração e intensidade do estresse do RE, CHOP também pode atuar como fator pró-apoptótico;

(2) JNK: IRE1 interage com um fator de necrose tumoral (TRAF2). O complexo IRE1-TRAF2 ativa a via de sinalização de proteína cinase c-Jun N-terminal (JNK), induzindo apoptose;

(3) Caspase-12: Esse fator está associado a membrana do RE e pode ser ativado por 2 vias. Sua ativação cliva caspase-9 e essa por sua vez ativa pró-caspase-3. A ativação de caspase-12 ocorre por duas vias: (i) Via dependente do complexo IRE1-TRF2 α , explicado anteriormente e (ii) Depende do oligômero BAX-BAK presente na membrana do RE. Durante as condições do estresse do RE esse oligômero promove a saída de Ca²⁺ do RE. O aumento desse íon no citossol ativa uma proteína chamada calpaína que, por sua vez, cliva caspase-12 gerando sua forma ativa.

O balanço entre os fatores de sobrevivência e de morte determina o destino da célula, ou seja, se a função do RE for reestabelecida através da resposta adaptativa da UPR, a célula sobrevive e retoma a sua função normal. Por outro lado, se o estresse do RE não for extinto pela ativação da UPR, o estresse prolongado e severo do ER resulta em morte celular (FIGURA 6).

I.4.2 Ativação do estresse do RE na doença renal

O estresse do RE e a ativação da UPR parecem ser fenômenos que ocorrem em qualquer tipo celular. Entretanto, o estresse do RE parece ser fisiologicamente relevante em tipos celulares que apresentam uma alta taxa de síntese protéica ou que a função primária seja a produção de proteínas secretórias ou residentes de membrana (DICKNOUT & KREPINSKY, 2009). No rim a taxa de síntese de proteínas é alta, principalmente pela produção de proteínas residentes de membrana. Através da infusão de radio-traçadores, leucina e fenilalanina marcados com trítio, foi estimado que em humanos a taxa de produção diária de proteínas no rim seja em torno de 42% (em 24 h a cada 100 proteínas, 42 são novas proteínas). Em outros estudos, foi demonstrado que o córtex renal responde por 30% (GOLDSPINK & KELLY, 1984). Para fins de comparação, no baço e músculo esquelético esta produção é de 12 e 1,5%, respectivamente (TESSARI *et al*, 1996). Em um rim normal, a filtração glomerular de 180 L de plasma/dia requer a reabsorção de muitos componentes do ultrafiltrado, havendo necessidade de alta síntese no RE de proteínas transportadoras

residentes de membrana e canais envolvidos na reabsorção de glicose, água, aminoácidos, eletrólitos e outras moléculas pequenas, bem como receptores de hormônios reguladores da homeostase do volume extracelular. A influência da síntese de proteínas e da função renal foi demonstrada em dois modelos experimentais: (1) Ratos Fischer 344 idosos, onde o declínio da síntese de proteínas é inversamente proporcional a proteinúria (RICKETTS *et al*, 1985) e (2) Camundongos GRP78^{+/-} apresentam um progressivo declínio da função renal, caracterizado por esclerose glomerular, atrofia tubular e fibrose intersticial (KIMURA *et al*, 2008).

O estresse do RE emerge como um mecanismo alvo a ser estudado, uma vez que este é ativado na ocorrência de isquemia renal (INAGI, 2010). Estudos recentes mostram a ação de diversas substâncias atuando como fatores de regulação do estresse do RE na I/R. O tratamento antes da I/R com trimetazidina (TZM) e o pós-condicionamento, *in vivo*, mostrou ter alvos diferentes. A TZM inibiu alterações na respiração celular, enquanto o pós-condicionamento previne o aumento da expressão de proteínas envolvidas na UPR como GRP78, ATF4, PERK e também das proteínas pró-apoptóticas como JNK e caspase-12 (MAHFOUDH-BOUSSAID *et al*, 2012). Outro estudo *in vivo*, utilizando pré-tratamento com indutores de UPR como a tapsgargina e tunicamicina, mostraram aumento de GRP78 na região cortico-medular renal, região bastante suscetível devido à baixa vascularização. Esses resultados foram responsáveis pelo efeito protetor contra a injúria renal advinda da I/R (PRACHASILCHAI *et al*, 2008). Com isso, o papel da ativação do fenômeno de UPR *in vivo*, após a injúria de I/R precisa ser melhor esclarecido.

Um grande número de fármacos tem sido utilizado para a prevenção da isquemia renal. Entre eles, estão os inibidores do fator de necrose tumoral (TNF α), inibidores do estresse oxidativo (tempol) e a L-arginina (precursor da síntese de óxido nítrico) (PASCHER & KLUPP, 2005 e OZTÜRK *et al*, 2001). Entretanto, nenhuma abordagem farmacológica utilizada para prevenir o dano renal induzido pela isquemia renal foi introduzida na prática médica, e novas estratégias para tratamento são necessárias. Nesse contexto, o ácido lisofosfatídico (LPA), um fosfolípido biologicamente ativo, surge como potencial agente terapêutico, já que dados na literatura mostram aumento da sua concentração na doença renal e que ele pode prevenir o desenvolvimento de diversas patologias como doenças autoimunes (CHUN & ROSEN, 2006) e injúria na mucosa estomacal induzida por aspirina (TANAKA *et*

al., 2012). Os fosfolipídios de membrana, em especial o LPA e suas ações, serão detalhados adiante.

I.5 Lipídios como sinalizadores intracelulares e extracelulares

Há pelo menos duas décadas, tem sido demonstrado que os lipídios não são somente componentes estruturais da membrana plasmática, mas também moléculas biologicamente ativas, influenciando uma variedade de processos celulares fisiológicos e patológicos (HANNUN & OBEID, 2008). Atualmente, os lipídios possuem três funções gerais. A primeira envolve o seu uso como reserva energética, principalmente, como éster de triacilglicerol. Esse estoque é importante para reservas calóricas e para a biogênese da membrana (HANNUN & OBEID, 2008; ALBERT, 2008). A segunda função é a formação de microdomínios de membrana, responsáveis por concentrar moléculas sinalizadoras (lipídios ou proteínas) ou proteínas transportadoras (HANNUN & OBEID, 2008; ALBERT *et al.*, 2008). A terceira, e foco desta dissertação é a atuação como primeiros e segundos mensageiros na transdução de sinais extracelulares e no reconhecimento de processos celulares (HANNUN & OBEID, 2008).

Os lipídios de membrana compreendem os esteróides (colesterol) e fosfolipídios, os quais podem ser divididos em glicerofosfolipídios (majoritários e foco desta dissertação) e esfingolipídios. Os glicerofosfolipídios são os lipídios de membrana cujo esqueleto hidrofóbico é formado pelo diacilglicerol (DAG) e dois ácidos graxos saturados ou insaturados de cadeia longa ligados ao DAG nos carbonos *sn1* e *sn2* através de uma ligação éster (VAN MEER *et al.*, 2008). De acordo com o grupamento polar ligado na posição *sn3* do DAG, são classificados como: fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, e outros. A distribuição desses lipídios varia de acordo com o tipo celular, organismo e organela em questão. Apesar dos inositol-lipídios corresponderem a apenas 6-8% do total de fosfolipídios da membrana plasmática, eles compõem uma das principais vias de sinalização em diferentes tipos celulares (PRASAD, 1996; VAN MEER *et al.*, 2008). Esses grupos lipídicos citados exercem grande parte de seus efeitos através da ligação a receptores de membrana plasmática acoplados a proteína G (GPCR) (MUTOH *et al.*, 2011).

I.5.1 Os lisofosfolipídios (LPLs): ácido lisofosfatídico (LPA)

Devido à descoberta do envolvimento de seus receptores como marcadores de alterações fisiopatológicas, os LPLs ganharam interesse científico nos anos 90 (FUCHS &

SCHILLER, 2009). Os LPLs são formados a partir dos glicerofosfolipídios, no qual uma cadeia de ácido graxo na posição *sn-2* ou *sn-1* é removida por uma fosfolipase (ZHAO & NATARANSAN, 2009). Dentre eles destaca-se o ácido lisofosfatídico (LPA) (FIGURA 7).

Estruturalmente, o LPA (mono acilglicerol-3-fosfato), é o menor glicerofosfolipídio (430-480 Da), está ligado a um ácido graxo e possui uma esterificação na cadeia de carbonos (CHOI *et al*, 2010). A presença do grupamento hidroxil e fosfato confere caráter hidrofílico em relação aos outros fosfolipídios, podendo ser encontrado no sangue, saliva, entre outros fluídos biológicos. Sua concentração, no plasma, pode variar entre 100 a 1000 nM, enquanto no soro essa faixa pode exceder 10000 nM (BAKER *et al*, 2001). No sangue o LPA circula ligado a proteínas plasmáticas, como albumina, e lipoproteínas. Essas lipoproteínas estabilizam o LPA em um ambiente hidrofílico e, possivelmente, protegem da degradação, já que isoladamente o LPA seria rapidamente degradado em algumas horas (PAGES *et al.*, 2001). É sabido que o LPA no sangue advém das plaquetas (AOKI, 2004).

O LPA é produzido a partir de lipídios da membrana plasmática por duas vias distintas: (a) atividade da fosfolipase D (PLD): onde o ácido fosfatídico, derivado de fosfolipídios de membrana ou do diacilglicerol, através da ação de uma fosfolipase D e diacilglicerol cinase respectivamente, é substrato da PLA₂ dando origem ao LPA e (b) a partir da atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂) e lisofosfolipase A₂ (lisoPLA₂), onde lisofosfolipídios, gerados pela ação da PLA₂, tais como lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE) e lisofosfatidilserina (LPS), seriam convertidos a LPA pela ação de uma lisofosfolipase D (lisoLPD) ou autotaxina (ATX) (FIGURA 9) (CHOI *et al*, 2010).

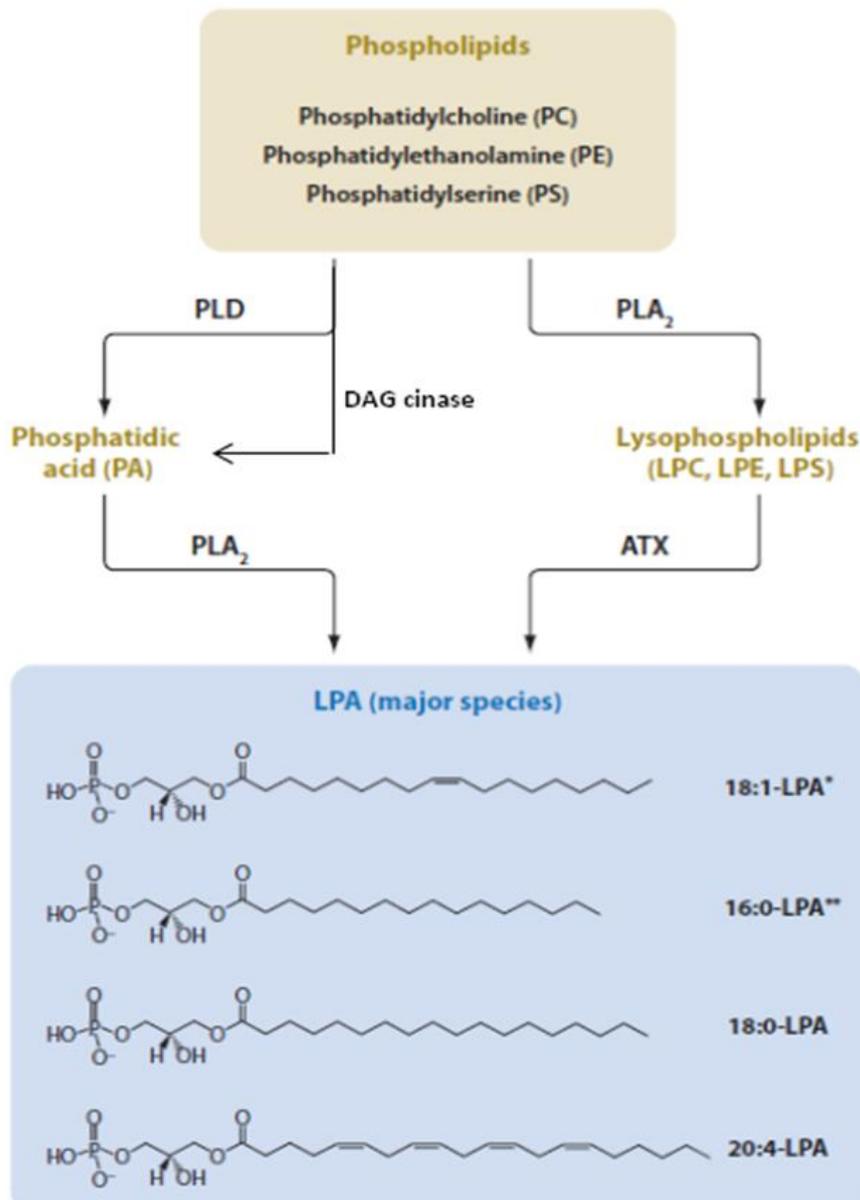


Figura 7. Produção do LPA a partir de fosfolipídios de membrana através de duas vias majoritárias. A figura mostra a diversidade das moléculas químicas de LPA sintetizadas, apresentando diferentes cadeias de carbono e número de saturações *18:1- LPA é o mais utilizado em laboratório como ativador de receptores de LPA e **18:00 é o mais abundante no plasma humano. PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina; PLD: fosfolipase D; PA; ácido fosfatídico; DAG-cinase: diacilglicerol cinase; PLA₂: fosfolipase A₂; ATX: autotoxina; LPA: ácido lisofosfatídico. (Adaptado de CHOI *et al*, 2010).

O LPA pode ser inativado por defosforilação através de enzimas presentes na membrana da superfície celular, as chamadas lipídios-fosfatases (LPPs) que pertencem a uma família de enzimas integrais de membrana que catalisam a defosforilação do LPA e de outros lipídios como S1P e ceramida-1P (LONG *et al*, 2005).

Por muitos anos, o LPA, foi conhecido apenas como produto da via sintética de lipídios, gerado a partir de glicerol 3-fosfato e acil-CoA através da ação do glicerolfosfato acil transferase no retículo endoplasmático e na mitocôndria (HANNUN & OBEID, 2008). Hoje, sabe-se que o LPA estimula uma variedade de respostas celulares, pela sua ação intra e extracelular. Sua ação intracelular inclui o receptor nuclear denominado *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR- γ) (MCINTYRE *et al.*, 2003). O LPA desloca o agonista pleno do receptor (PPAR) γ , a rosiglitazona e estimula a expressão de genes que expressam elementos envolvidos no metabolismo da glicose, ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e processos inflamatórios. E ainda funciona ativando proteínas ligantes de actina, como exemplo: gelsolina, vilina e formina. Já a ação extracelular, ocorre pela ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (PARRIL, 2011). (FIGURA 9). Essas atividades biológicas do LPA estão relacionadas aos efeitos mitogênicos, diferenciação e sobrevivência celular, reorganização do citoesqueleto, processos de retração e migração celular (CHOI *et al*, 2008, ISHII *et al*, 2004 e TOKUMURA *et al*, 1978). Em relação aos processos patológicos estão relacionadas alterações no sistema imune, câncer, reprodução, fibrose e obesidade (CHOI *et al*, 2010).

O metabolismo do LPA é complexo e resulta na produção de inúmeras moléculas químicas distintas. A cadeia de carbonos e número de saturações varia, consideravelmente, dependendo do fosfolípido precursor utilizado (CHOI *et al*, 2010). Essas características juntamente com sua posição (*sn1* ou *sn2*) e o tipo de ligações (éster ou éter) entre o ácido graxo e o glicerol, influenciam na afinidade pelos seus receptores e conseqüentemente na atividade biológica do LPA (BANDOHO *et al*, 2000; TOKUMURA, 2002).

Devido a similaridade estrutural (50-57% dos aminoácidos similares), os receptores tipo LPA_{1,2,3} e de S1P foram, inicialmente, classificados juntos como membros da família Edg (genes de diferenciação endotelial-1). Subsequentemente, esses receptores foram reclassificados como receptores de LPA e de S1P para denotar as especificidades dos ligantes. Atualmente, existem 6 isoformas para receptores de LPA (LPA₁₋₆) (PARRIL, 2011). Em 1996 foi identificado por HETCH e COLABORADORES o primeiro receptor de LPA (LPA₁) em porção cortical do cérebro de camundongos. Essa descoberta foi seguida da identificação de mais duas isoformas adicionais, os receptores LPA₂ e LPA₃ (BANDOH *et al*, 2000). Durante o curso das pesquisas por ligantes naturais de GPCRs, em 2003, NOGUCHI e COLABORADORES descobriram que o LPA é um ligante para GPR23/p2y9. Esse quarto receptor de LPA, hoje com nome de LPA₄, não é um homólogo da família Edg, mas é mais próximo funcionalmente. Em seguida, dois outros GPCRs órfãos com estrutura parecidas com LPA₄ foram descobertos, o GPR92/93 e p2y5, agora conhecidos como LPA₅ (LEE *et al*, 2006 e KOTARSKY *et al*, 2006) e LPA₆ (PASTERNAK *et al*, 2008 e LEE *et al*, 2009), respectivamente. Uma série de outros receptores órfãos vem sendo propostos como tendo ação parecida aos receptores de LPA, incluindo GPR87, p2y10 e GPR35, mas ainda esperam por confirmações futuras na pesquisa (YANAGIDA *et al*, 2013).

Uma vez que a complexidade de acoplamento desses receptores a diferentes proteínas G (FIGURA 8), as respostas celulares são bastante heterogêneas. Os receptores de LPA estão acoplados a proteínas G heterotriméricas que são constituídas por três subunidades: α , β e γ . LPA_{1,2,4,5,6} estão acoplados a proteína G_{12/13}, ativando a via de RhoA, um membro da família de Rho GTPases; LPA₁₋₅ estão acoplados a proteína G_{q/11} mediando a ativação de fosfolipase C (PLC) que hidrólisa fosfatidil inositol-bi-fosfato (PIP₂) e mobiliza Ca²⁺ de estoques internos; LPA_{1-4,6} estão acoplados a proteína Gi mediando a ativação da via fosfoinositídeos-3-quinase (PI3K) / Rac e PKB/Akt, ativação também da via Ras-MAP kinase, inibição da adenilato ciclase (AC) com subsequente queda dos níveis de AMPc e ativação da PLC. LPA₄ também pode estar acoplado a proteína Gs, ativando a AC. (CHOI *et al*, 2010; MUTOH *et al*, 2011).

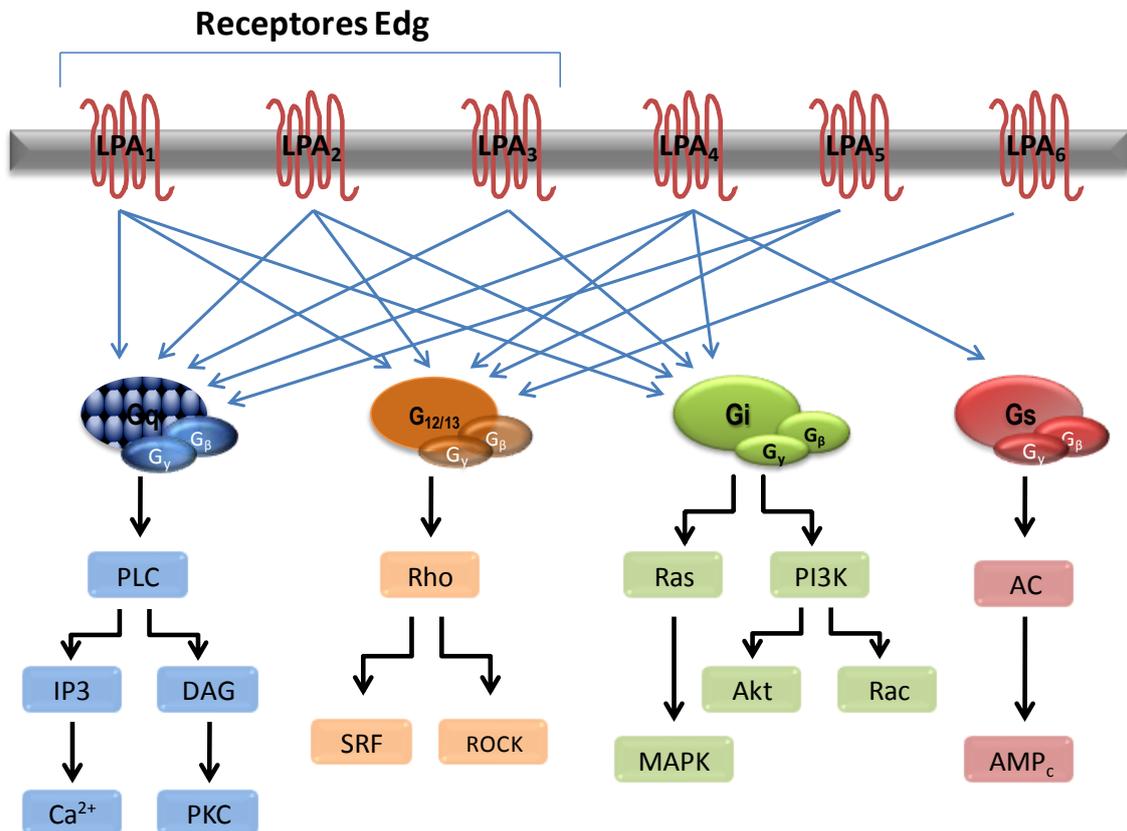


Figura 8: Vias de Sinalização dos principais receptores de LPA. A atividade biológica do LPA é mediada através da ativação de seis diferentes receptores, LPA₁-LPA₆. Todos são receptores com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G. A complexidade nas associações com subtipos de proteína G e diferentes padrões de expressão, permitem ao LPA ativar diferentes vias de sinalização e consequentemente produzirem vários efeitos celulares em diferentes células e organismos. PLC: fosfolipase C; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinase C; AMP_c: Monofosfato cíclico de adenos; AC: adenilato ciclase; LPA_{1,2,3,4,5,6}: receptor de LPA; MAPK: proteína quinase ativadora de mitógeno; PI3K: cinase de fosfatidilinositol-3; Rac: proteína de ligação a guanina; Ras: proteína de ligação a guanina; Rho: GTPase homóloga a Ras; ROCK: Rho-cinase (adaptado de CHOI *et al*, 2008).

A dessensibilização dos receptores de LPA ocorre pela fosforilação dos GPCRs por cinases e/ou um ação de arrestinas, seguido de internalização, reciclagem ou degradação do receptor (MUTOH *et al*, 2011).

A caracterização das diferentes classes de receptores utilizando agonistas e antagonistas dos receptores de LPS permitem a distinção farmacológica e o estudo do papel do LPA na regulação de diferentes processos celulares. No entanto, os componentes existentes são agonistas (OMPT, LPA18:1 entre outros) e antagonistas (VPC12249, Ki6425 entre outros) dos receptores LPA₁₋₃ (PARRIL, 2011).

I.6 O papel do LPA na isquemia/reperfusão (I/R)

Dados na literatura mostram que o aumento da concentração de alguns LPLs, em destaque o LPA, está cada vez mais associado a condições patológicas, como a doença renal (INOUE, 2002; PRADÈRE *et al*, 2008). Dos receptores de LPA descritos anteriormente, LPA₁, LPA₂ e LPA₃ são expressos no rim e estão presentes no córtex, medula interna e externa, com a seguinte ordem de predominância: LPA₃ = LPA₂ > LPA₁ (OKUSA *et al*, 2003). Devido às diversas possibilidades de ativação de proteínas G, o LPA apresenta respostas celulares heterogêneas. *In vitro*, tem sido demonstrado que o LPA funciona como um fator de crescimento e sobrevivência para as células do túbulo proximal, inibindo apoptose e prevenindo a indução de citocinas (LEVINE *et al*, 1997). A administração intraperitoneal de LPA, durante a isquemia, logo antes da reperfusão preveniu a falência do rim em consequência do insulto isquêmico protegendo as células do processo de apoptose (DE VRIES *et al*, 2003). Além disso, foi demonstrado que o tratamento intraperitoneal com 4 doses de LPA a cada 2 horas antes do procedimento de isquemia, apresenta um efeito bifásico: doses entre 0,01 – 0,1 mg/Kg protegem o rim da I/R, enquanto na dose de 1 mg/Kg o efeito é revertido (OKUSA *et al*, 2003). Neste caso, foi proposto que a proteção ocorre quando o receptor de maior afinidade para o LPA, LPA₂, é ativado. O aumento da concentração de LPA ativa o receptor LPA₃, pois ao utilizar um inibidor específico não houve perda do efeito protetor. Neste caso, ao LPA₃, atribuiu-se o papel de causador do dano ao tecido renal (OKUSA *et al*, 2003). Além disso, foi demonstrada que a ativação de LPA₁ leva ao desenvolvimento e progressão de fibrose intersticial (PRADÈRE *et al*, 2007), principal característica da doença renal crônica. Um estudo recente mostrou que o LPA atua como adjuvante a ação da lovastatina reduzindo o nível de MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1), creatinina, BUN, e danos de morfológicos renais, no entanto o mecanismo de

ação molecular ainda não foi esclarecido. Essa proteína, MCP-1, tem seu nível aumentado na I/R, indicando lesão renal. O LPA e lovastatina protegem a função renal contra a I/R por downregulation de MCP-1(GAO *et al*, 2011). O conhecimento apurado do mecanismo de ação do LPA na I/R permitirá delinear uma possível estratégia farmacológica de prevenção para isquemia e reperfusão renal.

II. OBJETIVOS

O objetivo central desta dissertação foi caracterizar o efeito do tratamento com LPA no modelo de I/R renal com ênfase ao transporte renal de Na^+ e a proteção contra o estresse do RE, utilizando córtex renal.

II.1 Objetivos Específicos

1. Determinar se o tratamento com LPA promove melhora dos parâmetros morfo-funcionais renais observados no grupo I/R.
2. Determinar o efeito na atividade e expressão da I/R e do tratamento com LPA sobre os transportadores ativos primários de Na^+ presentes no córtex renal;
3. Identificar a via de sinalização de reparo ativada pelo LPA durante o processo de I/R;
4. Avaliar o efeito da I/R na expressão das proteínas (GRP78 e PERK) envolvidas com o estresse do RE e sua modulação pelo tratamento com LPA.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo os animais estão de acordo com as recomendações sobre uso de animais em experimentação conforme *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (DHHS publicação nº 85-23 / NIH revista em 1996, *Office of Science and Health Reports*, Bethesda MD). Os protocolos, assim como o projeto no qual esta dissertação encontra-se inserida, foram aprovados pela Comissão de Avaliação da Utilização de Animais em Pesquisa (CEUA) sob o número IBCCF 087 do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ.

III.1 Material

ATPNa₂, ouabaína, Hepes, Tris, PMSF, furosemida, glicina, acrilamida, bis-acrilamida, inibidor de tripsina (tipo II-S), EDTA, ácido lisofosfatídico (oleoyl-L- α lysophosphatidic acid), albumina, histona, U73122, calfofina, PMA (do inglês phorbol 12-myristate 13-acetate) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

NaCl, MgCl₂, KCl, folin, DMSO, acrilamida, BIS-acrilamida, glicose, EDTA, fosfato de sódio hepta-hidratado, xilol, éter, álcool etílico foram obtidos de VETEC química, Xerém, Duque de Caxias, RJ.

Todos os outros reagentes foram do mais alto grau de pureza. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q pelo sistema (PURELAB Option-Q). O [³²Pi] foi obtido do Instituto Brasileiro de Energia e Pesquisas Nucleares (IPEN, São Paulo, Brasil).

Os kits colorimétricos utilizados para quantificação de: ureia, creatinina e proteinúria, todos obtidos da Gold Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil).

O anticorpo contra receptor de LPA tipo 1 (anti-EDG₂ anti-rabbit) foi obtido da Abcam (EUA), já contra os receptores tipo 2 (anti-EDG₄ anti-rabbit), tipo 3 (anti-EDG₇ anti-rabbit) e contra NKA (anti-mouse) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (California), assim como os anticorpos contra GRP78 (anti-H-128, anti-rabbit) e PERK (anti-H-300, anti-rabbit). A Membrana de nitrocelulose (Hybond) foi comprada da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, RU). Os anticorpos secundários conjugados a fluorescência anti-mouse e anti-rabbit foram obtidos da LI-COR Biosciences (NE, USA).

III.2 Animais e grupos experimentais

Para composição dos grupos experimentais foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos adultos, pesando de 180 - 250 g. Durante todo o período (pré e pós-operatório) os ratos foram mantidos em gaiolas apropriadas sob temperatura constante (23 ± 2 °C), no ciclo

padrão claro/escuro (12/12 h), com acesso irrestrito à água e ração. Os ratos foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

Controle ou falso operado: ratos submetidos ao estresse da cirurgia, porém não sofreram a I/R (n=11);

I/R: Os animais sofreram a cirurgia de isquemia-reperfusão, porém não foram tratados. As artérias renais foram obstruídas, conforme descrito a seguir nesta sessão (n=11);

I/R+LPA (grupo isquêmico tratado): os ratos sofreram a cirurgia de I/R e no momento da obstrução foi administrado LPA (ÁCIDO L-A-LISOFOSFATÍDICO); Sigma, St Louis, MO, USA) por via intracapsular na concentração de 1 mg/kg de peso corporal. Sabe-se que esta dose, nesta mesma condição experimental atenua os efeitos da isquemia (DE VRIES *et al*, 2003) (n=11).

Após a cirurgia os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas, nas quais são feitas separação da urina e fezes, e também é possível mensurar a quantidade de água ingerida durante as 24 horas referentes ao processo de reperfusão. Após este tempo os ratos foram eutanasiados por decapitação consciente para retirada dos rins e coleta de sangue.

III.3 Cirurgia de isquemia-reperfusão (I/R)

A cirurgia inicia-se com a sedação dos animais por inalação de éter etílico, logo após foi realizada anestesia geral através de injeção intraperitoneal de solução apropriada (3:1 de cloridrato de Ketamina 5% e cloridrato de Xilazina 2 g). O volume dessa solução varia com o valor do peso corporal do rato, em microlitros. O rato foi considerado anestesiado quando não reagia ao se realizar prensão de uma de suas patas traseiras. O rato foi fixado em uma prancha cirúrgica forrada com papel alumínio e preso com fita adesiva pelos membros inferiores e superiores. Foi realizada assepsia da região abdominal com detergente e gaze, e tricotomia com uma lâmina. A cavidade abdominal foi exposta (laparotomia) através de uma incisão abdominal de aproximadamente 6 cm. Após identificação das veias e artérias renais a isquemia foi induzida pela aplicação de um grampo vascular não traumático nas duas artérias renais por 30 min, tempo necessário para a observação da perda da coloração avermelhada do rim. Após 30 min, o grampo foi removido para que a reperfusão ocorresse, foi realizada uma leve massagem nos rins com cotonetes embebidos em soro fisiológico para auxiliar o processo de reperfusão que dura 24h. A incisão foi fechada com sutura feita com pontos

simples separados, afrontando as bordas (pele e músculo) em plano único, com linha de nylon 3-0 (BEIRAL *et al*, 2012) (FIGURA 9). No grupo tratado foi administrado LPA por via intracapsular na concentração de 1 mg/kg de peso corporal, logo após a aplicação dos grampos.

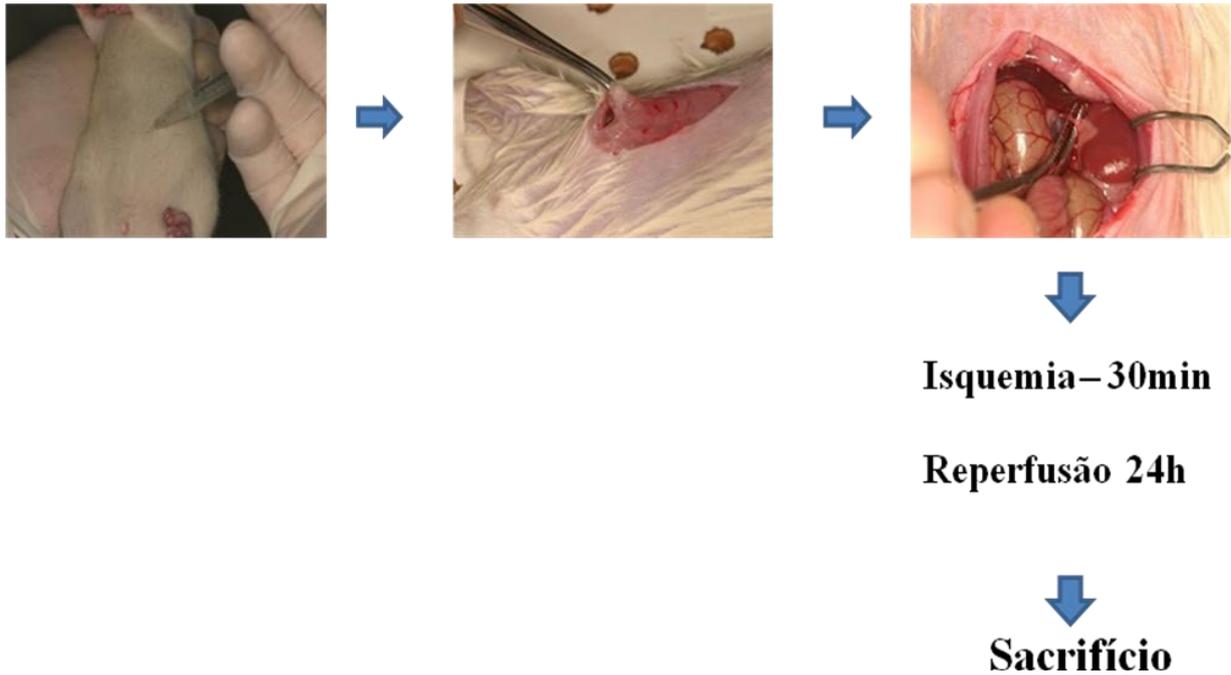


Figura 9: Esquema representativo da cirurgia de isquemia-reperusão renal. A cirurgia é iniciada com a anestesia via peritoneal, em seguida é feita a incisão abdominal. A introdução dos grampos vasculares não traumáticos nas artérias renais por 30 min é referente ao processo de isquemia. Após esse tempo, os grampos são retirados, e inicia-se o processo de reperusão com duração de 24h, sendo encerrado com a eutanásia do animal.

III.4 Obtenção do homogeneizado purificado de córtex renal

Para preparação do homogeneizado purificado de córtex renal, imediatamente após a retirada, os rins foram imersos em solução isotônica tamponada gelada contendo: sacarose 250 mM, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, inibidor de tripsina 0,15 mg/ml e fluoreto de fenilmetanesulfonil (PMSF) 1 mM. A região cortical externa (segmento de aproximadamente 5 mm de espessura), porção composta predominantemente por células de túbulos proximais, foi dissecada. Foi separada também a porção do córtex interno e medula renal, sendo os polos renais armazenados em formaldeído 10% para análise histológica. Ao restante do córtex externo foram adicionados 3 mL de solução descrita acima e essa suspensão foi tratada em homogeneizador de tecido tipo Potter com pistilo de teflon. Este homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 2000 g, a 4 °C, em uma centrífuga Sorvall RC-5B, utilizando um rotor SS-34. Nesta centrifugação, as células não rompidas durante a homogeneização, núcleos e citoesqueleto sedimentam e foram descartados após a retirada do sobrenadante. Este sobrenadante constitui o homogeneizado purificado de córtex renal externo, o qual foi aliquoteado em tubos *Eppendorf* e armazenado a -20 °C (VERDOORN *et al.*, 2010). A concentração de proteínas de cada preparação foi determinada através de método colorimétrico modificado de Lowry *et al.* (1951), utilizando o reagente Folin-Fenol, SDS 2,5% e a albumina bovina como padrão.

III.5 Análise histológica

A fixação dos polos renais foi feita em formaldeído a 10% em solução de tampão fosfato, por um período de 3 dias. Após este tempo o tecido foi desidratado em soluções aquosas de álcool etílico (50, 70, 80, 90 e 95%) até a substituição por álcool etílico puro (100%) por 30 min em cada uma. Em seguida, foi realizada a etapa de clareamento, isto é, a substituição do agente desidratante pelo líquido intermediário, o xileno, o qual possibilitará a inclusão da parafina (xileno-parafina 1:1, xileno-parafina 1:2 e parafina pura). Esta etapa foi realizada à temperatura de 60 °C mantida constantemente em estufa. Finalmente, foi realizada a fabricação do bloco sólido utilizando moldes metálicos nos quais são colocadas as amostras embebidas com parafina líquida para resfriamento rápido e conseqüentemente solidificação. O bloco de parafina contendo em seu interior tecido foi seccionado em micrótomo (modelo MRP-03, Lupe Indústria e Comércio Ltda, Brasil), gerando cortes histológicos de 30 µm de espessura. Estes cortes foram fixados em lâminas histológicas onde foi realizada as seguintes colorações: Hematoxilina-Eosina e Ácido Periódico-Schiff (PAS). O primeiro foi usado para

avaliar a arquitetura renal. A hematoxilina (corante básico) tem afinidade por substâncias ácidas, como o núcleo, corando-o em roxo. A eosina, sendo basófila, cora predominantemente o citoplasma. O segundo, PAS, foi utilizado para avaliar possível expansão das células mesangiais nos glomérulos renais. Este corante cora compostos glicídicos, estruturas ricas em açúcares. No rim, ele cora de magenta (violeta/avermelhado) a luz dos túbulos proximais e a lâmina basal dos capilares da cápsula de Bowman. A análise histológica foi realizada através do microscópio Eclipse 400, Nikon acoplado a câmera (Evolution, Media Cybernetics Inc.; Bethesda, MD.). A quantificação dos glomérulos foi realizada manualmente, por contagem em fotos com aumento de 100X. A medida do espaço de bowman foi realizada através do programa Image J 1.47t (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) fazendo a subtração entre espaço da circunferência maior e menor do glomérulo, utilizando fotos com aumento de 200X.

III.6 Análise dos parâmetros fisiológicos renais

Uma semana antes do procedimento cirúrgico os ratos foram treinados e adaptados em gaiolas metabólicas. As gaiolas foram colocadas em uma sala com a temperatura e ciclo claro-escuro controlados (25 °C; 12-12 h) e com livre acesso a água e ração. Após a cirurgia, os animais foram colocados nas gaiolas pelas 24h que antecedem o sacrifício, o sangue foi centrifugado a 2000 g por 10 min para obtenção do plasma e as amostras de urina foram coletadas e centrifugadas a 3000 g por 5 min. Os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C até o dia da análise bioquímica.

A medida da concentração de Na⁺ no plasma e na urina foram realizadas através de espectrometria de chama (Analyser 910 MS). As medidas de creatinina, ureia (no plasma e na urina) e de proteinúria foram feitas utilizando kits enzimáticos (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG) que se baseiam na formação de complexos coloridos cuja absorbância é captada pelo espectrofotômetro UV/VIS nas seguintes faixas, 510nm e 600nm, respectivamente (BEIRAL *et al.*, 2012).

III.6.1 Fórmulas utilizadas para a obtenção dos parâmetros fisiológicos renais:

a) Depuração (clearance) de creatinina: $Cl_{Cr} = U_{Cr} \times V/P_{Cr}$; onde U_{Cr} e P_{Cr} : concentração urinária e plasmática de creatinina ($\mu\text{mol/mL}$) e V : volume da urina ($\text{mL}/24 \text{ h}$).

b) Excreção urinária de Na^+ : $U_{\text{Na}} = U_{\text{Na}} \times V$; onde U_{Na} : concentração urinária de Na^+ .

c) Carga filtrada de Na^+ : $FL_{\text{Na}} = \text{GFR} \times P_{\text{Na}}$; onde GFR: ritmo de filtração glomerular dado pela depuração de creatinina ($\mu\text{L}/\text{min}$) e P_{Na} : concentração plasmática de Na^+ ($\mu\text{mol}/\text{mL}$).

d) Fração de excreção urinária de Na^+ : $FE_{\text{Na}} = [(U_{\text{Na}}/P_{\text{Na}}) \times (U_{\text{Cr}}/P_{\text{Cr}})] \times 100$

Os valores obtidos foram normalizados por 100 g de peso corporal.

III.7 Atividades ATPásicas

III.7.1 Atividade NKA

A atividade da NKA foi determinada através da quantificação da diferença de fosfato inorgânico (Pi), liberado pela hidrólise de ATP, na presença e ausência de ouabaína (inibidor específico). O homogenato purificado (0,2 mg/ml) foi pré-incubado com e sem ouabaína (1 mM) para assegurar completa inativação da enzima. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição das proteínas no meio de reação contendo: HEPES-Tris 20 mM (pH 7,4), MgCl_2 10 mM, NaCl 120 mM, KCl 30 mM e ATPNa_2 5 mM na presença de traços $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Após 20 minutos à 37°C a reação foi parada pela adição de carvão ativado em HCl 0,1 N (2 vezes o volume de reação). O Pi^{32} liberado foi quantificado por cintilação líquida (Packard/Tri-carb 2100TR). A atividade dessa enzima também foi quantificada na presença de U73122, inibidor da fosfolipase C (PLC) sob as mesmas condições experimentais.

III.7.2 Atividade NaA

A atividade da NaA foi determinada conforme descrito por CARUSO-NEVES e colaboradores (2000), através da quantificação da diferença de Pi liberado pela hidrólise do $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na presença e ausência de furosemida (inibidor da enzima). O homogeneizado purificado (0,2 mg/ml) foi pré-incubado com e sem furosemida (2 mM) em meio de reação contendo: HEPES-Tris 20 mM (pH 7,0), ouabaína 1 mM, MgCl_2 2 mM, NaCl 120 mM na presença de traços de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e parada, após a reação de 10 minutos à 37°C , pela adição de carvão ativado em HCl a 0,1 N (2 vezes do volume de reação). O Pi liberado no meio foi quantificado empregando um contador de cintilação líquida Packard Tri-carb 2100TR. A atividade dessa enzima também foi quantificada na presença de U73122, inibidor da PLC sob as mesmas condições experimentais.

III.8 Atividade da proteína cinase C sensível ao DAG (PKC)

A atividade da PKC foi determinada pela incorporação de ^{32}P i, a partir de [γ $^{32}\text{-P}$]ATP ($7\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) à histona (substrato da enzima cinase). A composição do meio padrão foi: MgCl_2 4 mM, HEPES-tris 20 mM (pH 7,0), histona 1.5 mg/mL e proteína (MBL) 0.7 mg/mL. A reação ocorreu a 37 °C e parada pela adição de ácido tricloro acético (TCA) 40%. Após os tempos indicados, as amostras foram colocadas imediatamente no gelo, em seguida foram filtradas à vácuo em membranas de Millipore 0.45 μm , lavadas com TCA 20% e tampão fosfato 2 mM (pH 7,0). A radioatividade incorporada foi quantificada por cintilação líquida (Packard tri-carb 2100TR). A atividade da PKC foi calculada pela diferença entre os valores obtidos na ausência e na presença do inibidor da PKC, no sítio de ligação do DAG, calfofostina C (10^{-8} M) e do estimulador da PKC, PMA (10^{-7} M).

III.9 Eletroforese e imunodeteção

As proteínas presentes no homogeneizado foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 10%), transferidas para membranas de nitrocelulose. Após o bloqueio com leite (3%), as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos (diluídos em TBS) durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução tampão TBS-T [Tris 10 mM (pH 7,4), Tween 0,1%], re-incubadas por 1 hora, com anticorpo secundário conjugado a fluorescência (diluídos em tampão de bloqueio LI-COR Odyssey) e novamente lavadas com TBS-T. A imunomarcagem foi detectada pela fluorescência emitida pelo anticorpo secundário no sistema (LI-COR Odyssey). Todas as membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau* para controle da efetividade no processo de transferência das proteínas. Para cada grupo experimental foi realizada incubação com anticorpo anti-actina para o controle de carregamento.

III.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados através do programa GraphPad Prisma 5.0. A análise estatística foi feita através do teste One-way ANOVA e pós-teste Tukey. Nesse trabalho foi estabelecido um $P < 0,05$ como nível de significância sendo indicada por letras diferentes. Os resultados são indicados como média \pm erro padrão da média.

IV. RESULTADOS

IV.1 O tratamento com LPA protege a redução da filtração glomerular na I/R: avaliação dos parâmetros morfo-funcionais renais

Inicialmente, foi observado que tanto o processo de I/R quanto o tratamento com LPA não promove alterações significativas sobre o peso e a ingestão de água dos ratos (Figura 10). Com o objetivo de avaliar se o tratamento com LPA previne as alterações dos parâmetros funcionais renais promovidos pela I/R foram determinados: acúmulo plasmático de nitrogênio ureico (BUN, do inglês: Blood Urea Nitrogen), ritmo de filtração glomerular (RFG), carga filtrada de Na^+ , volume urinário, proteinúria e fração de excreção urinária de Na^+ .

O acúmulo de nitrogênio ureico no sangue (BUN, Figura 11) que era de $81,0 \pm 13,5$ mg/dL no grupo I/R caiu para $56,6 \pm 4,6$ mg/dL no grupo LPA ($p < 0,05$), sendo este valor semelhante ao controle. Este dado indica que o tratamento intracapsular com LPA recupera a função renal. Por outro lado, o tratamento com LPA não previniu a proteinúria (em mg/24 h, Sham: $4,10 \pm 0,65$; I/R: $8,87 \pm 0,68$; LPA: $11,19 \pm 1,98$, $p < 0,05$) e a diurese (em mL/100 g, Sham: $3,60 \pm 0,47$; I/R: $5,51 \pm 0,92$; LPA: $6,22 \pm 0,68$, $p < 0,05$) causadas pela I/R (Figura 12).

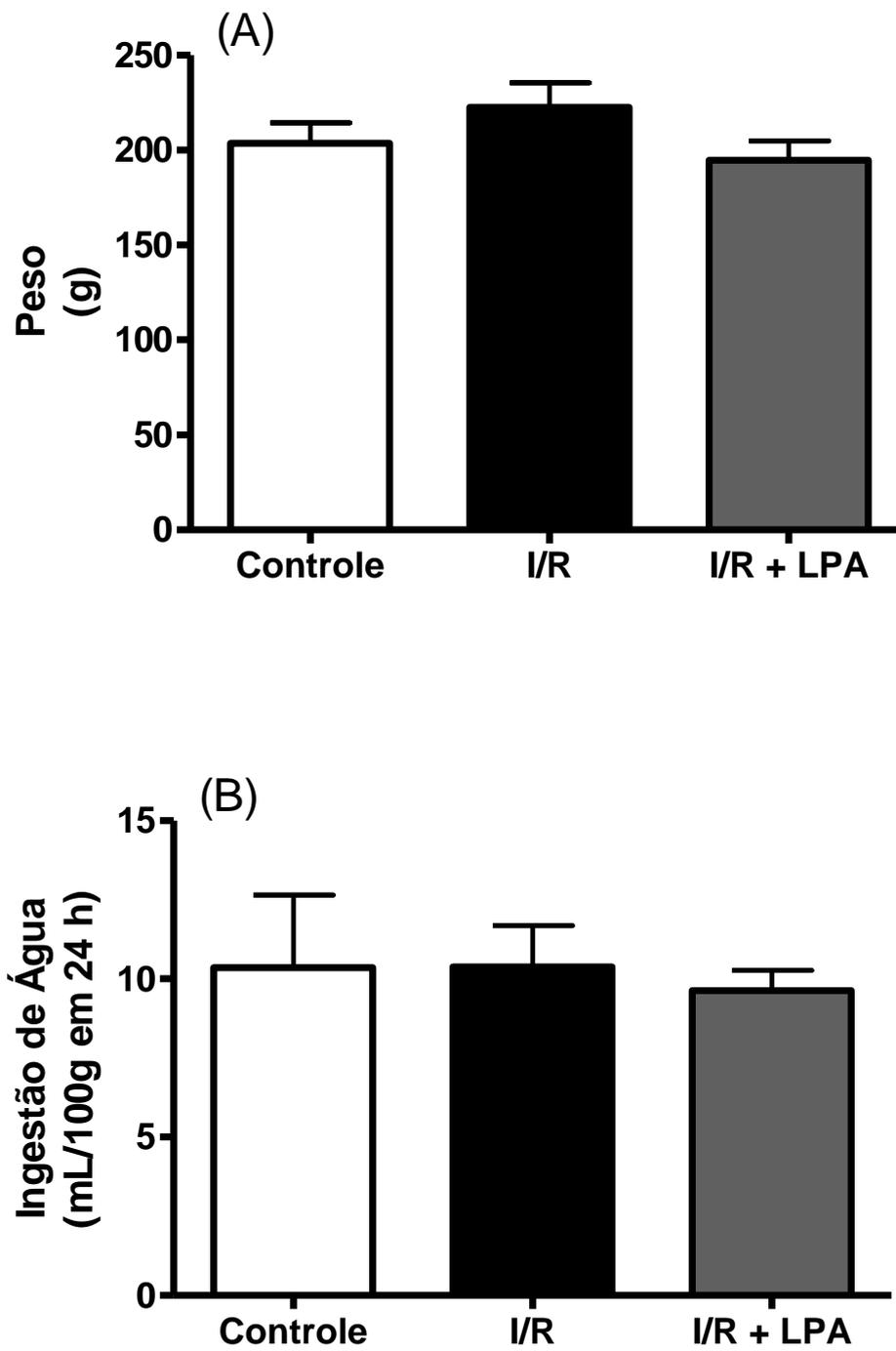


Figura 10. (A) Medida de massa corporal (g) e (B) Ingestão de água (mL/100 g em 24 h), nos três grupos experimentais. Os resultados representam a média \pm EPM (n=11).

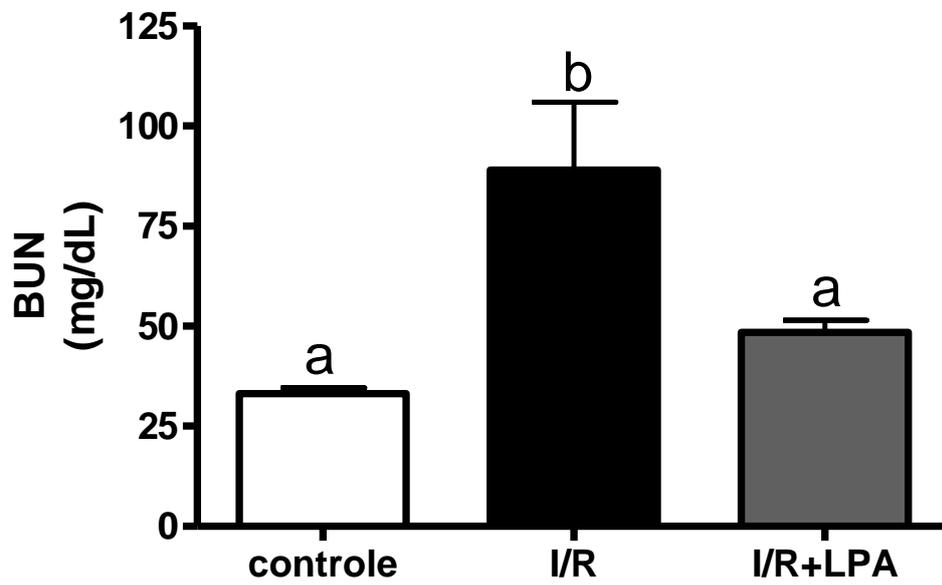


Figura 11. Medida de nitrogênio ureico plasmático (BUN) em mg/dL nos grupos controle, I/R e tratados. Esta medida é um importante marcador de função renal. Os resultados representam a média \pm EPM (n=11;p<0,05; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

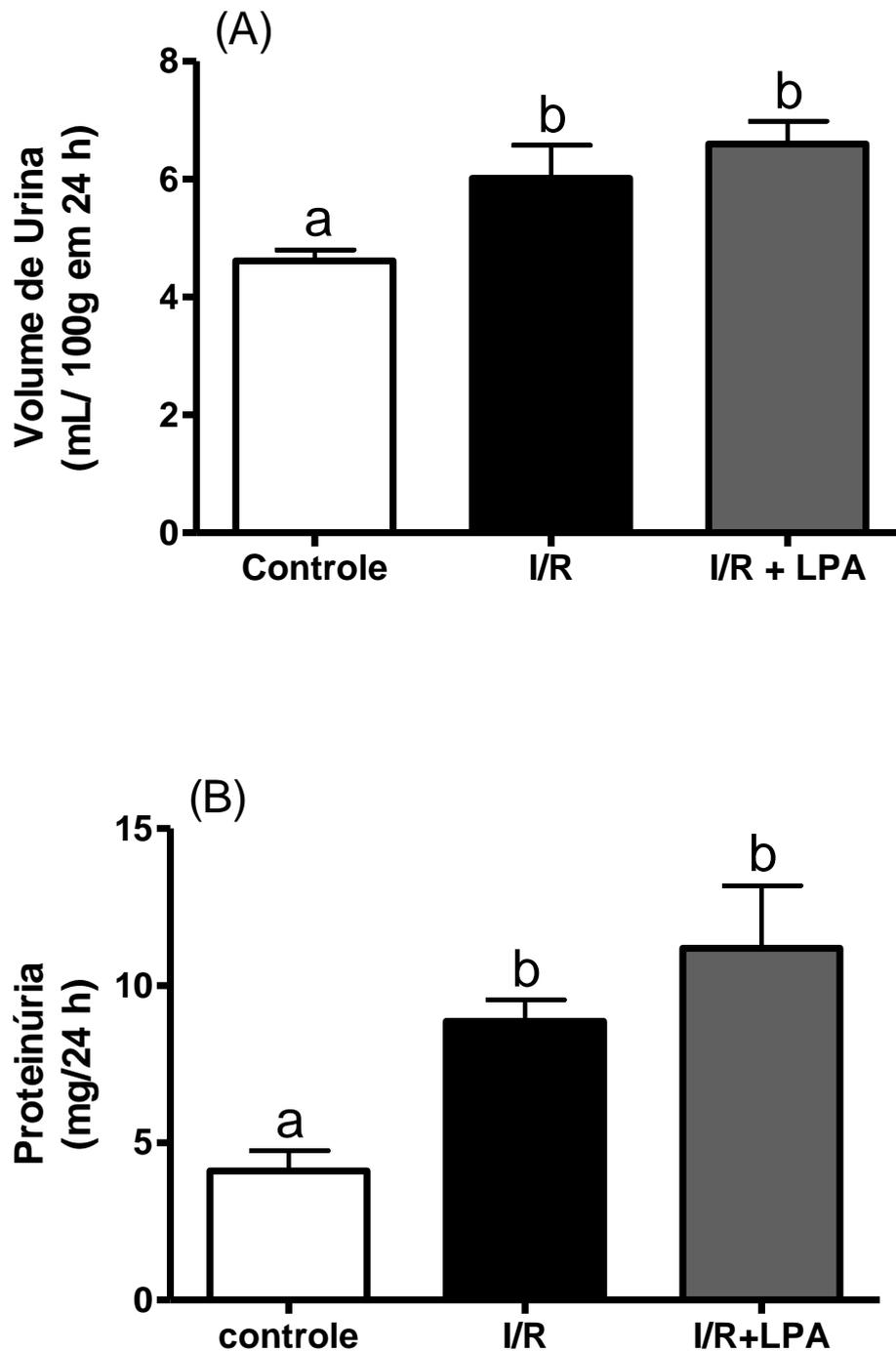


Figura 12. Volume de urina (ml) excretada em 24h/100g referente ao processo de reperfusão, nos três grupos experimentais (A). Medida de proteinúria (mg/24h) nos três grupos experimentais (B). Ambos os resultados representam a média \pm EPM (n=11;p<0,05; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

O RFG foi avaliado através da taxa de depuração da creatinina. Foi observada que na I/R apenas $209,8 \pm 36,0$ μL de plasma foi depurado de creatinina por minuto, enquanto que no rato tratado foram depurados $430,8 \pm 75,0$ $\mu\text{L}/\text{min}$ ($p < 0,05$ e semelhante ao controle: $354,5 \pm 70,0$ $\mu\text{L}/\text{min}$) (Figura 13). Uma vez que a concentração sérica de Na^+ não foi modificada em nenhuma condição, o perfil observado da carga de Na^+ filtrada foi semelhante ao RFG (em $\mu\text{mol}/\text{min}$, controle: $0,52 \pm 0,17$; I/R: $0,26 \pm 0,04$; LPA: $0,65 \pm 0,12$; $p < 0,05$) (Figura 14).

A função tubular foi avaliada através da determinação da fração de excreção urinária de Na^+ , que expressa a porcentagem de Na^+ filtrado que foi reabsorvida nos segmentos tubulares renais. Este parâmetro é dependente da carga de Na^+ filtrada (descrita acima) e da excreção urinária de Na^+ . Apesar da diminuição da carga de Na^+ filtrada ter ser completamente prevenida pelo tratamento com LPA, o mesmo não ocorreu com a excreção urinária de Na^+ (em $\text{mEq}/24$ h, controle: $0,35 \pm 0,17$; I/R: $0,04 \pm 0,01$; LPA: $0,11 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Desta forma, o tratamento com LPA não modificou a diminuição da fração de excreção de Na^+ detectada na I/R (em %, controle: $0,90 \pm 0,17$; I/R: $0,2 \pm 0,11$; LPA: $0,2 \pm 0,07$; $p < 0,05$). Este dado indica que a I/R aumentou a reabsorção tubular de Na^+ e que o LPA não influenciou este parâmetro funcional (Figura 15).

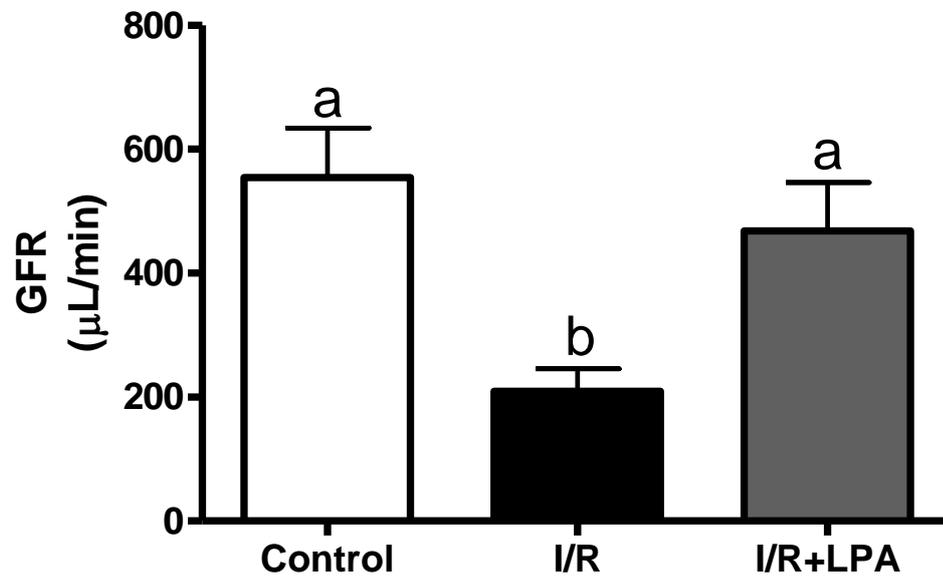


Figura 13: Medida do ritmo de filtração glomerular filtração ($\mu\text{L}/\text{min}$). Esta medida é um importante marcador da função renal, pois é determinada pelo clearance de creatinina nos grupos controle, I/R e tratado. Os resultados representam a média \pm EPM ($n=11$; $p<0,05$; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

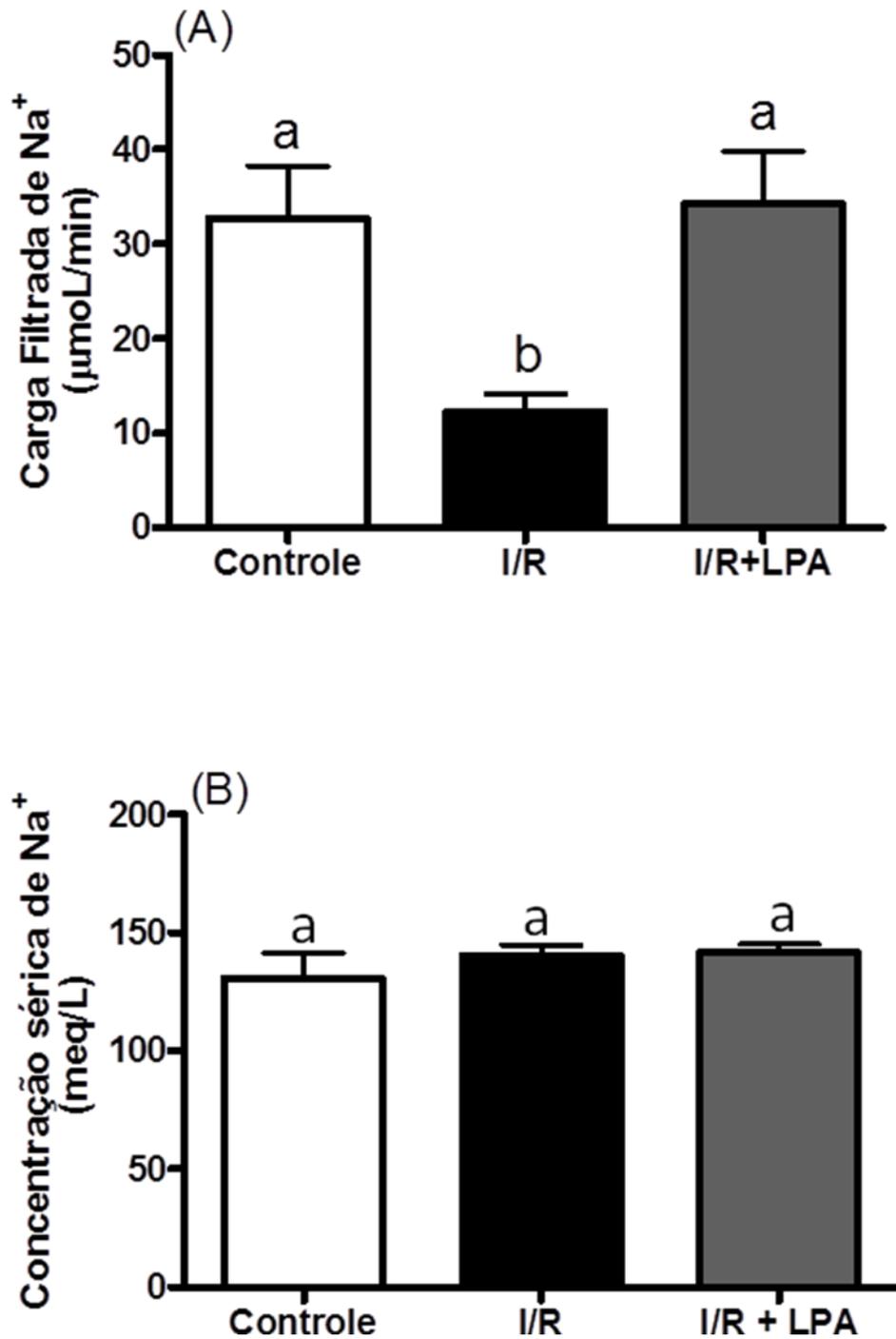


Figura 14: Medida da carga filtrada de Na⁺ ($\mu\text{l}/\text{min}$) (A). Concentração plasmática de Na⁺ (B). Os resultados representam a média \pm EPM (n=11; p<0,05; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

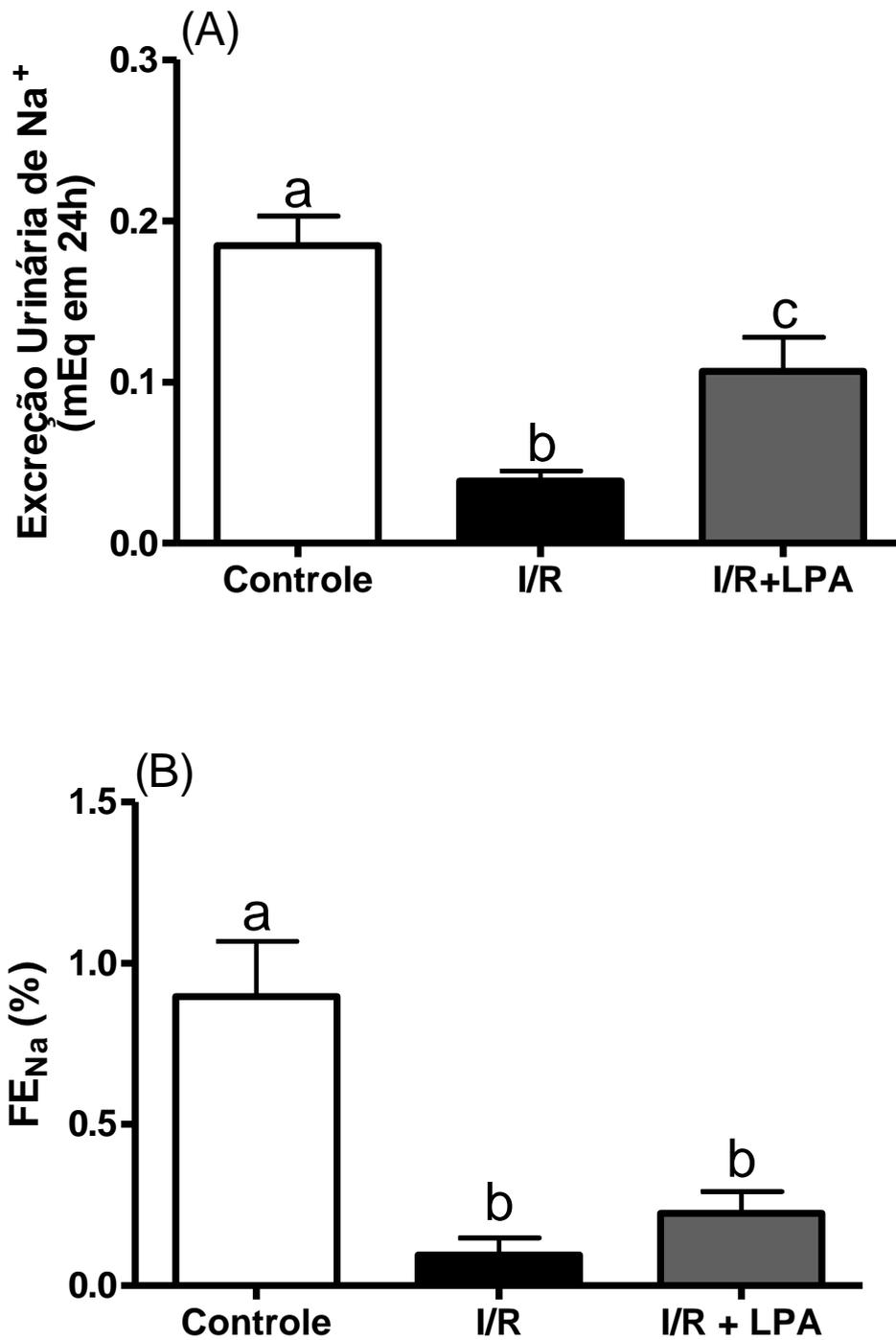


Figura 15. Medida da excreção urinária de Na⁺ (meq em 24h) nos grupos controle, I/R e tratado com LPA 1mg/Kg (A). Medida da fração da excreção urinária de Na⁺ (FENa %) nos três grupos experimentais (B). Os resultados representam a média ± EPM (n=11; p<0,05; Tukey's test) a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

Uma vez que o tratamento com LPA recuperou o processo de filtração glomerular, a morfologia do glomérulo foi avaliada. Não foi observada alteração no número de glomérulos nos grupos experimentais (FIGURA 16A). Entretanto, foi detectado um aumento do espaço de Bowman através da coloração com Eosina-Hematoxilina (H&E) (FIGURA16B). Na quantificação do aumento do espaço de Bownan, observou-se que o controle que era 33387,8 (ua) passou para 41582,7 (ua) na I/R e, no grupo tratado foi semelhante ao controle (Figura 16C). A análise qualitativa da coloração com PAS revelou que nos ratos que sofreram I/R ocorreu a expansão de células mesangiais sendo este evento prevenido pelo LPA (FIGURA 17).

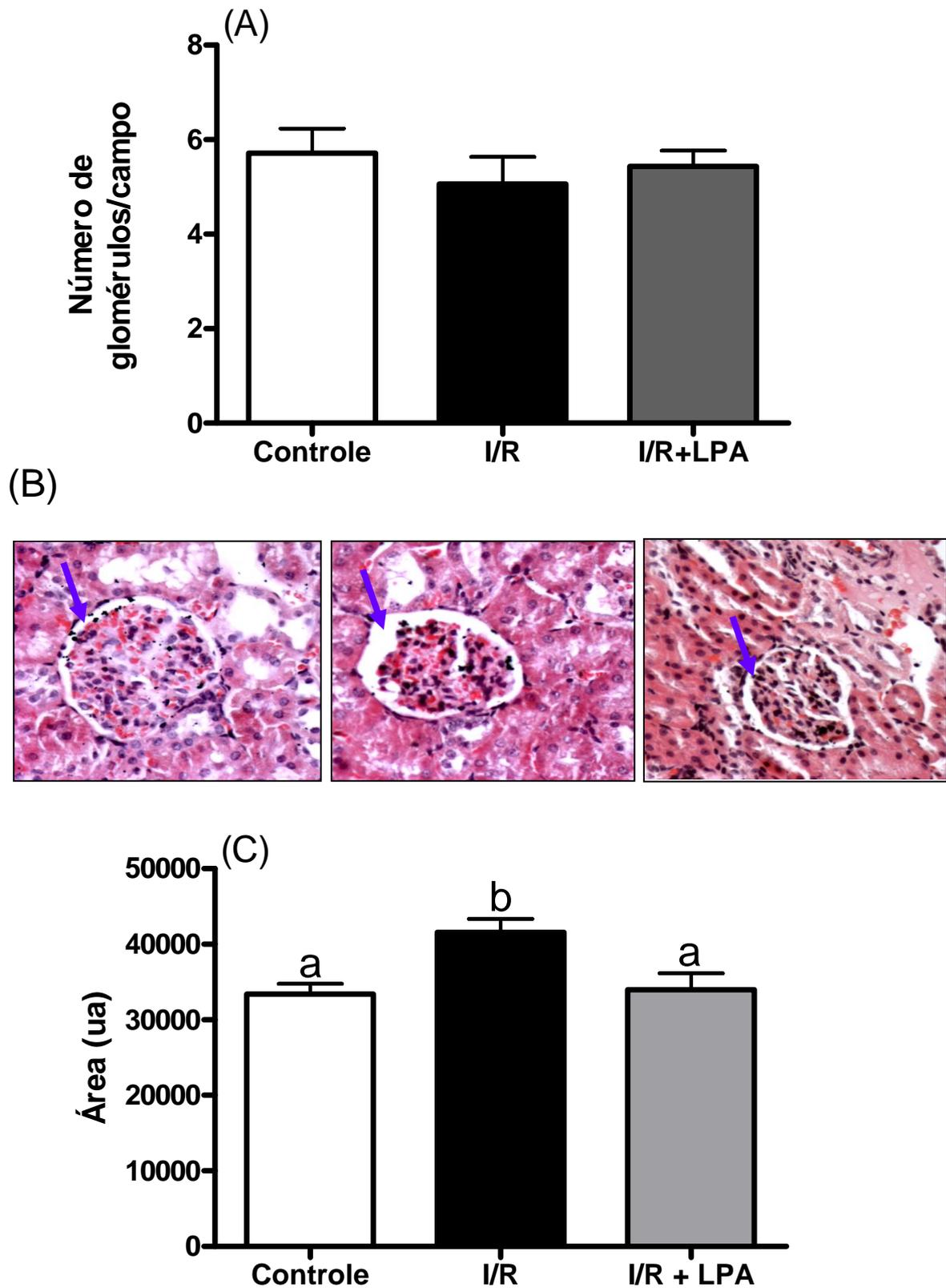


Figura 16. Número de glomérulos (A). Fotomicrografias em H&E (B). Os painéis da esquerda para direita representam os glomérulos renais dos animais do grupo controle, I/R e I/R+ LPA, respectivamente (Aumento de 200X). **Quantificação do espaço de Bowman.** O espaço é representado pelas setas indicativas (C). (n=3; $p < 0,05$; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

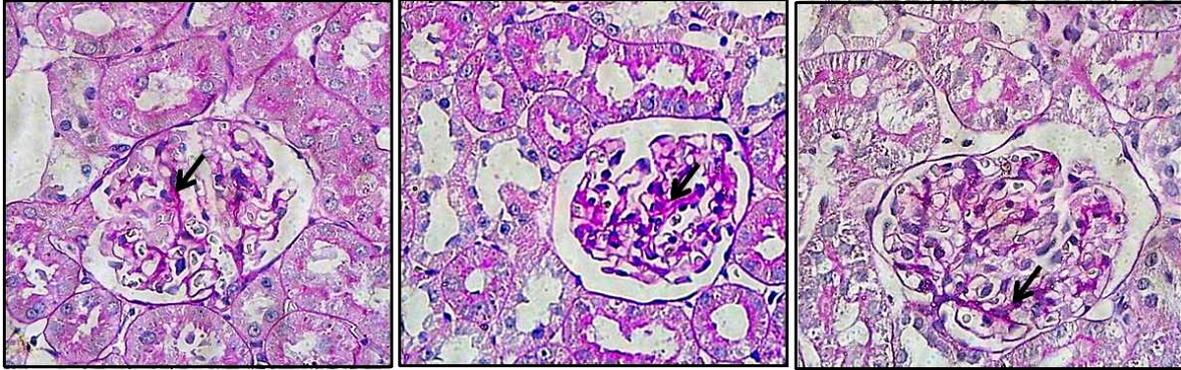


FIGURA 17. Fotomicrografias dos glomérulos renais, com coloração PAS. As fotos, da esquerda para direita, representam os grupos controle, I/R e I/R + LPA, respectivamente. Esta coloração cora em violeta/avermelhada a lâmina basal dos capilares glomerulares. A célula mesangial está indicada pelas setas. Aumento 200X.

IV.2 Efeito da I/R e do tratamento com LPA sobre os transportadores renais de Na^+ presentes no córtex renal

Sabendo que o tratamento com LPA não modificou a diminuição da fração de excreção de Na^+ observada na I/R e que o túbulo proximal (principal segmento do córtex renal) reabsorve cerca de 70% do íon Na^+ , foram investigadas as atividades dos transportadores de Na^+ .

A FIGURA 18 mostra que a I/R promoveu o aumento da atividade (de $46,2 \pm 5,3$ nmol $\text{Pi}/\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, no controle para $123,1 \pm 22,7$ nmol $\text{Pi}/\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ no I/R, ($p < 0,005$) e da expressão de NKA (50%, $p < 0,005$). No grupo tratado com PLA, a atividade e expressão da NKA foram similares ao controle.

A determinação da atividade da NaA demonstrou que na I/R a atividade da enzima foi inibida (de $114,7 \pm 7,2$ nmol $\text{Pi}/\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ no Sham para $62,3 \pm 8,3$ nmol $\text{Pi}/\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ no I/R, $p < 0,005$) e que esta foi insensível ao tratamento com LPA (Figura 19).

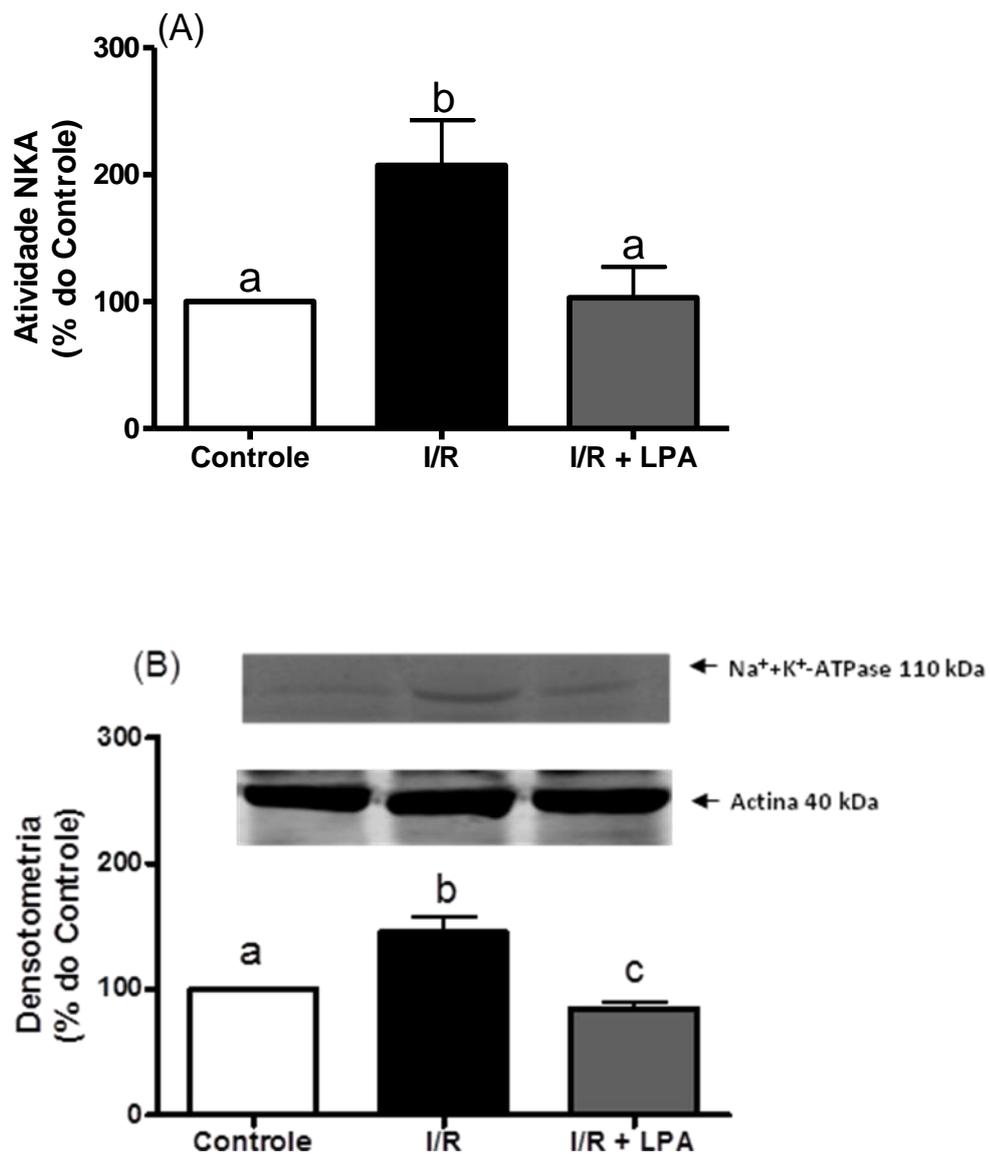


Figura 18. Efeito do processo de isquemia-reperfusão sobre a atividade e expressão da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ nos grupos controle, I/R e tratados. Os valores da atividade são expressos em $\text{nmolPi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Os resultados representam a média \pm EPM ($n=10$; $p<0,05$; Tukey's test) (A). Os valores da expressão foram obtidos pela densitometria das bandas visualizadas no scanner odssey, nas preparações homogenato nos três grupos experimentais. Os resultados representam a média da densitometria \pm EPM ($n=6$; $P<0,05$; Tukey's test) (B). a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

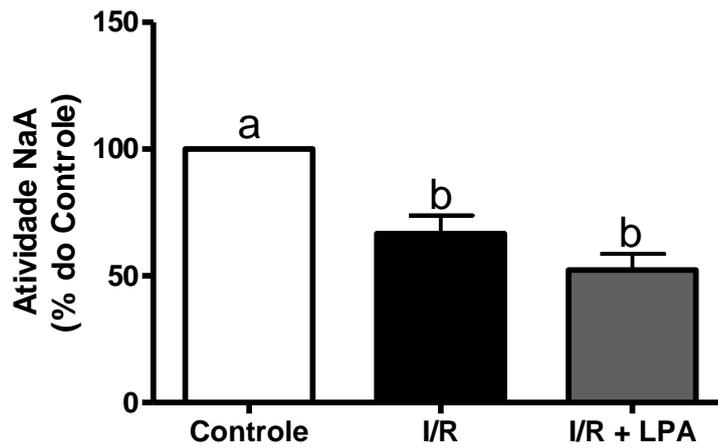


Figura 19. Efeito do processo de isquemia-reperfusão sobre a atividade da Na^+ -ATPase nos grupos controle, I/R e tratados. Os valores da atividade são expressos em $\text{nmolPi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Os resultados representam a média \pm EPM ($n=10$; $p<0,05$; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

IV.3 Identificação da via de sinalização ativada pelo LPA durante a I/R

A FIGURA 20 mostra a expressão dos receptores LPA₁ e LPA₂ no córtex renal nos grupos controle, I/R e LPA. Foi observado que a expressão do receptor LPA₁ não é modificada em nenhuma condição experimental. Por outro lado, o tratamento com LPA diminui a expressão do receptor LPA₂ em 33%. Este resultado indica um desbalanço na expressão entre os receptores de LPA, exacerbando a via do receptor LPA₁.

É sabido que o receptor LPA₁ pode estar acoplado a pelo menos 3 tipos de proteínas G: Gi/0, Gq/11, G12/13. As proteínas Gαq/11 e as subunidades βγ da proteína Gi/0 ativam a via de sinalização fosfolipase C/proteína cinase C (PLC/PKC) (PARRIL, 2011). Foi observado que no grupo I/R ocorreu perda (em torno de 50%) da sensibilidade da PKC ao seu estimulador, PMA, o tratamento com LPA preveniu este efeito. Neste grupo ocorreu redução da atividade para $1,33 \pm 0,25$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹ comparado ao grupo controle ($2,18 \pm 0,28$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹) (FIGURA 21). Com o objetivo de determinar se as ATPases de Na⁺ são proteínas alvo desta via de sinalização, a atividade da NKA e da NaA foram medidas na presença e na ausência do inibidor de PLC, U73122. O resultado expresso na figura 22 representa a diferença das atividades medidas na ausência e na presença do inibidor. Foi observado que no grupo controle, a atividade da NKA foi sensível à inibição de PLC. A atividade que era $44,5,3 \pm 5,3$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹ na ausência de U73122 passou para $21,8 \pm 3,7$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹ na presença do inibidor, gerando uma diferença de $21,4 \pm 2,3$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹. No grupo I/R, a atividade NKA foi sensível ao U73122 apresentando uma diferença de atividade 72% menor que o controle ($p < 0,005$), e o tratamento com LPA impediu essa perda de sensibilidade (FIGURA 22A).

Por outro lado, quando avaliado o efeito da inibição da PLC sobre a atividade da NaA foi observado que o tratamento com LPA não preveniu a perda de sensibilidade da enzima ao inibidor. Assim como a NKA, no grupo controle a atividade da NaA foi sensível à inibição de PLC. A atividade que era $35,2 \pm 75,6$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹ na ausência de U73122 passou para $13,6 \pm 3,8$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹ na presença do inibidor, gerando uma diferença de $21,6 \pm 2,5$ nmol Pi/mg⁻¹.min⁻¹. Nos grupos I/R e LPA, a atividade NaA foi insensível ao U73122 (FIGURA 22B).

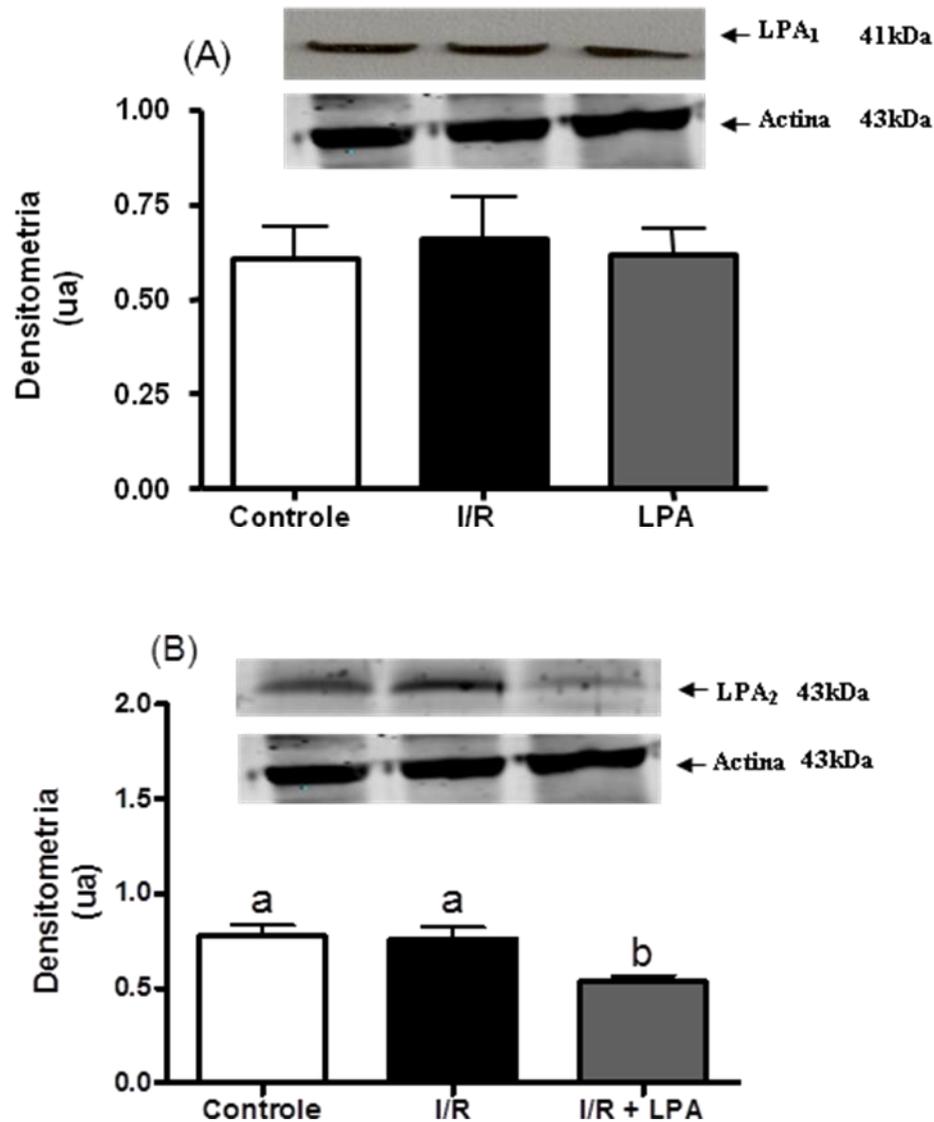


Figura 20. Expressão do receptor LPA₁ (A) e LPA₂ (B), através de imunoelctroforese. Os valores foram obtidos pela densitometria das bandas visualizadas no scanner odssey, nas preparações homogenato nos três grupos experimentais. Os resultados representam a média da densitometria \pm EPM (n=6; p<0,05; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

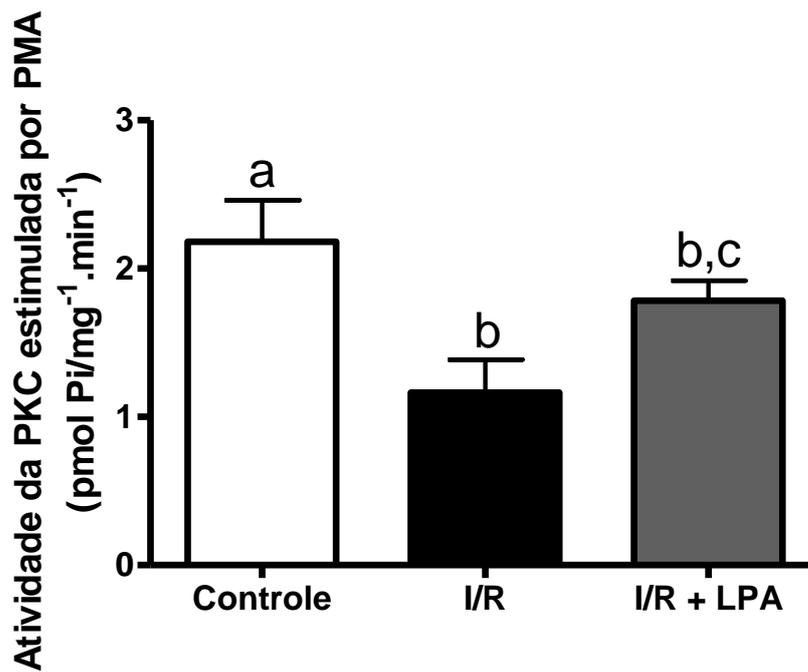


Figura 21. Efeito do processo de isquemia-reperfusão sobre a atividade da PKC estimulada por PMA (10^{-7}) nos grupos controle, I/R e tratados. Os valores da atividade são expressos em $\text{nmolPi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Os resultados representam a média \pm EPM ($n=7$; $p<0,05$; Tukey's test; $p<0,05$ t-test entre I/R e I/R+LPA). a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

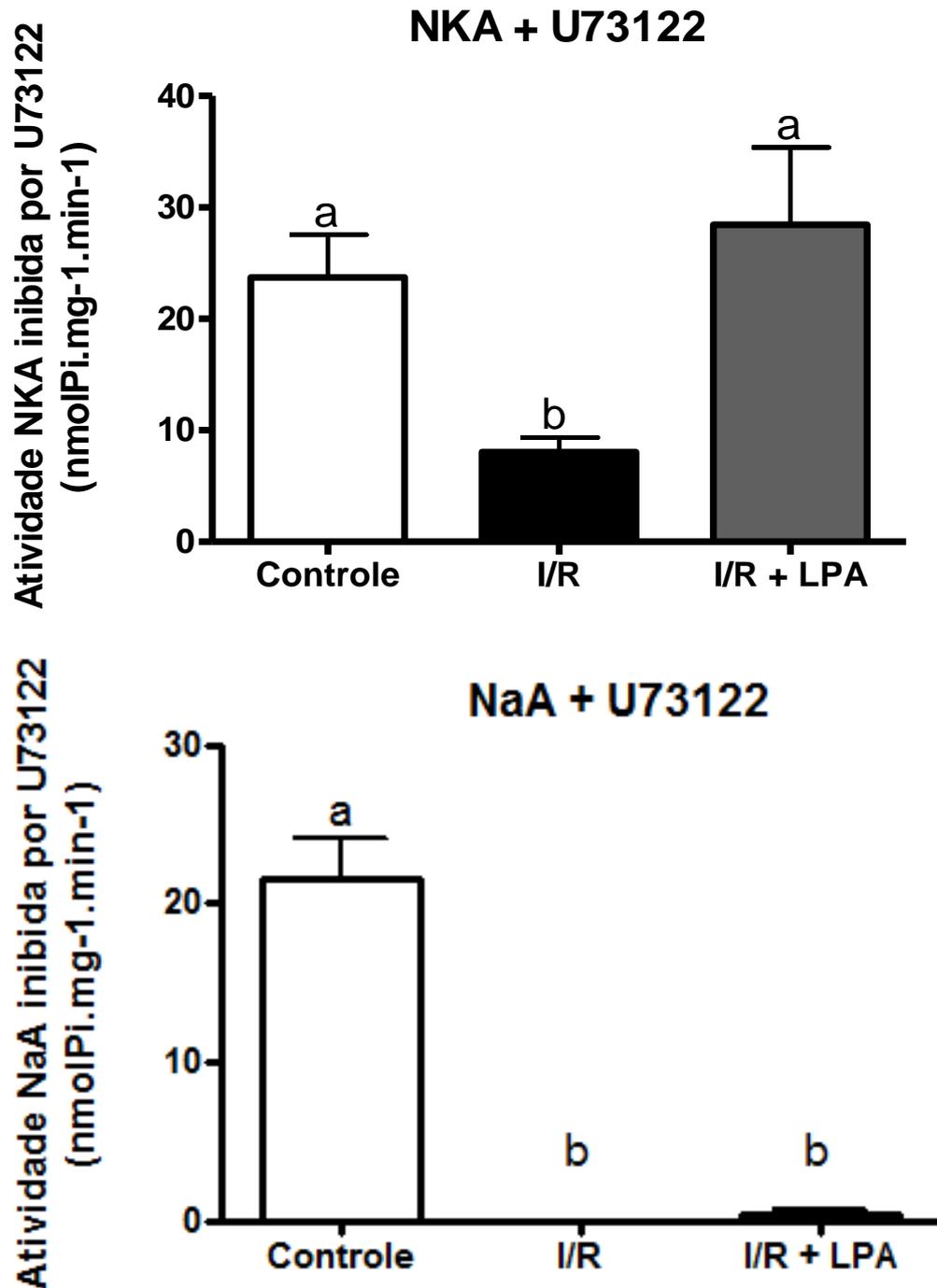


Figura 22. Efeito do processo de isquemia-reperfusão sobre a via de sinalização da PKC nos grupos controle, I/R e tratados. Nesses experimentos foi utilizado o U73122 10^{-8} M, sobre a regulação da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (A) e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ (B). Os valores da atividade são expressos em $\text{nmolPi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Os resultados representam a média \pm EPM ($n=8$; $p<0,05$; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

IV.4 Efeito da I/R na expressão das proteínas envolvidas com o estresse do RE e sua modulação pelo tratamento com LPA

A avaliação de proteínas envolvidas com ativação da resposta de proteção ao estresse do RE foi realizada, inicialmente através da expressão de GRP78 nos três grupos experimentais. Foi observado que a I/R promoveu o aumento da expressão de GRP78 (40%), enquanto o tratamento com LPA preveniu este aumento (FIGURA 23). Outro fator transcricional que atenua os danos causados pela estresse do retículo endoplasmático é a PERK. Na avaliação da sua expressão pela técnica de imunodeteção observamos que não houve diferença entre os três grupos experimentais (FIGURA 24).

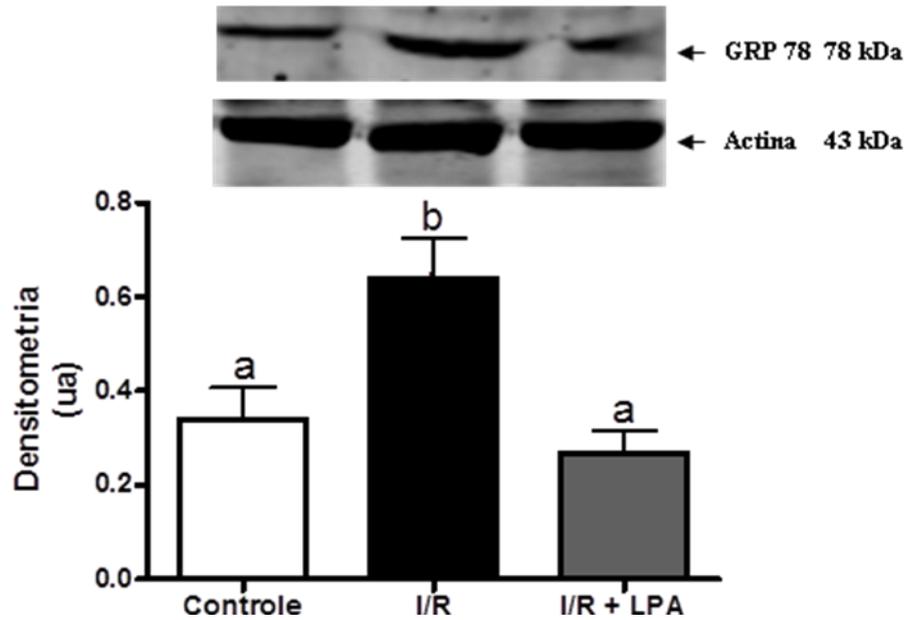


Figura 23. Expressão de GRP78 através de Western blott. Os valores foram obtidos pela densitometria das bandas visualizadas no escanner odssey e analisadas pelo programa , nas preparações homogenato nos três grupos experimentais. Os resultados representam a média da densitometria \pm EPM ($n= 3$; $p<0,05$; Tukey's test). a e b – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

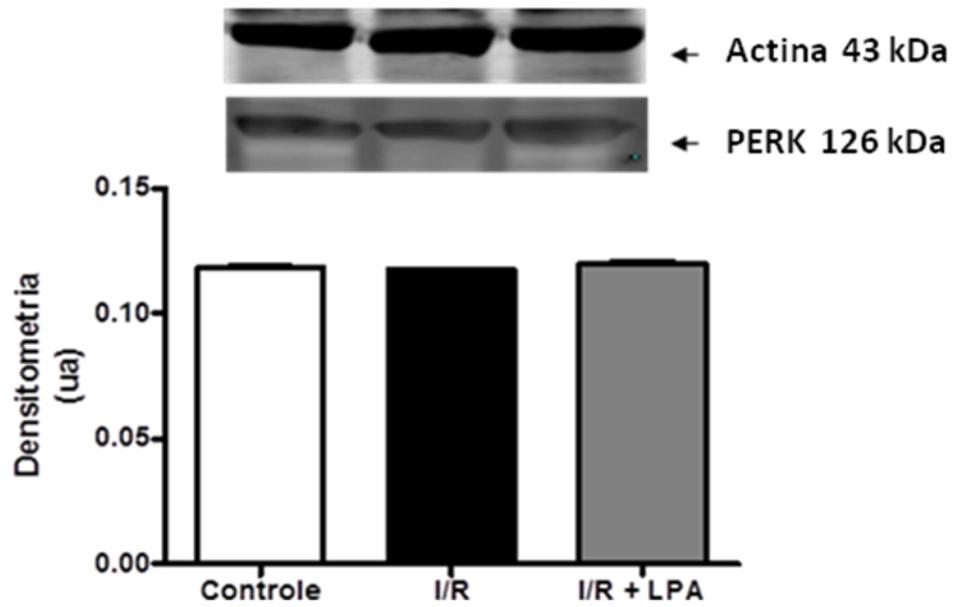


Figura 24. Expressão de PERK através de imunoeletróforese. Os valores foram obtidos pela densitometria das bandas visualizadas no scanner odssey, nas preparações homogenato nos três grupos experimentais. Os resultados representam a média da densitometria \pm EPM (n=3).

V. DISCUSSÃO

A isquemia é a principal causa da insuficiência renal aguda, uma vez que a subsequente reperfusão acarreta na ativação de fatores correlacionados à injúria do tecido e a apoptose celular (KUSCH *et al*, 2013). A ausência de medidas preventivas e de suporte associada a uma terapia farmacológica pouco efetiva contribui para o desenvolvimento da doença renal crônica e do processo de rejeição do órgão durante o processo de transplante. Os resultados obtidos nessa dissertação corroboram com a indicação de que o LPA pode ser uma potencial terapia farmacológica para a prevenção da I/R. O tratamento intracapsular com LPA na dose de 1 mg/Kg de peso corpóreo no momento da isquemia preveniu o acúmulo de ureia nitrogenada no sangue, a diminuição da taxa de filtração glomerular, os danos nos glomérulos renais, o aumento da expressão e da atividade da NKA no córtex renal e previne o estresse do RE.

Tem sido discutido o tratamento com LPA como fator protetor da injúria renal promovida pelo processo de I/R devido a sua complexidade de respostas celulares acarretando em efeitos controversos. *In vitro*, tem sido demonstrado que o LPA funciona como um fator de crescimento e sobrevivência para as células do túbulo proximal, inibindo apoptose e prevenindo a indução de citocinas pró-inflamatórias (LEVINE *et al*, 1997). A administração intraperitoneal de LPA (1 mg/Kg de peso corpóreo), durante a isquemia, logo antes da reperfusão preveniu a falência do rim em consequência do insulto isquêmico protegendo as células do processo de apoptose (DE VRIES *et al*, 2003). Além disso, foi demonstrado que o tratamento intraperitoneal com quatro doses de LPA a cada 2 horas antes do procedimento de isquemia, apresenta um efeito bifásico, dependente de qual receptor de LPA estava envolvido (OKUSA, 2003). Foi proposto que o efeito protetor ocorre quando o receptor de maior afinidade para o LPA, o LPA₂ é ativado. Já o aumento da concentração de LPA ativa o receptor LPA₃ causando dano ao tecido (OKUSA *et al*, 2003). Além disso, foi demonstrada que a ativação de LPA₁ leva ao desenvolvimento e progressão de fibrose intersticial, principal característica da doença renal crônica (PRADÈRE *et al*, 2007; PRADÈRE, *et al* 2008).

De fato, nesta dissertação foi observado que o tratamento com LPA não preveniu o aumento do volume de urina, a intensa proteinúria, a diminuição da fração de excreção urinária de Na⁺, da atividade da NaA e não alterou a ingestão de água. O aumento da diurese durante a I/R é atribuído a diminuição da capacidade de formar um interstício medular concentrado (BASILE *et al*, 2001). Em conjunto, os resultados indicam que o tratamento com

LPA preserva a função de filtração glomerular, a primeira etapa de formação da urina; mas não preserva completamente a função de reabsorção tubular. A ativação de receptores diferentes no glomérulo e no túbulo renal pode ser uma justificativa para as diferentes respostas.

A etiologia clínica da insuficiência renal aguda é multifatorial e complexa. Dentre os diversos modelos de I/R descritos na literatura, a aplicação de um grampo não traumático nas artérias renais por 30 min seguida da reperfusão de 24 horas é o mais apropriado e comumente utilizado para estimular alterações hemodinâmicas que acarretam na modificação da função renal. Uma vez que ocorre apenas a ligadura da artéria renal e não no pedículo, o grau de mortalidade dos animais diminui após o procedimento cirúrgico. A desvantagem deste modelo experimental é que a injúria causada pela I/R é alcançada através do procedimento cirúrgico de laparotomia, que acarreta na exposição prolongada das vísceras abdominais, determinando assim perdas metabólicas importantes, como a perda de peso. Com a finalidade de atenuar esse processo, a ligadura da artéria renal ocorreu durante 30 min e a duração média da cirurgia foi de 40 min e não foi observada a diminuição do peso em nenhum grupo experimental.

A determinação do acúmulo de ureia nitrogenada no plasma e a análise da depuração da creatinina são classicamente utilizadas como marcadores da insuficiência renal aguda (SINGH *et al*, 2012). A ureia é o principal catabólito do metabolismo proteico. A sua principal via de excreção é a urina, embora alguma quantidade seja encontrada nas fezes e suor. A ureia é livremente filtrada, no entanto, o resultante final do processo de transporte é uma grande reabsorção e também existe ao nível da alça de Henle secreção passiva de ureia através de transportador específico (SINGH *et al*, 2012). A avaliação de ureia no sangue e urina é um dos parâmetros que evidencia a qualidade do funcionamento do rim. Neste modelo, os ratos I/R apresentaram aumento no acúmulo de ureia nitrogenada no sangue e a diminuição da depuração de creatinina, ou seja, do RFG, evidenciando uma queda na função glomerular renal. Estes resultados reproduzem as observações dos estudos citados com animais experimentais e em humanos, validando o modelo experimental desta dissertação. O tratamento com LPA preveniu as alterações descritas acima, indicando que a tanto a dose escolhida, como a via de administração propiciam a melhora da função de filtração. Já que a concentração sérica de Na^+ não é modificada e como consequência do RFG, a carga de Na^+ filtrada diminui na I/R e é recuperada pelo tratamento com LPA. Além disso, a avaliação histomorfométrica demonstrou um aumento do espaço de Bowman e da expansão das células

mesangiais no rato I/R, indicando alteração na filtração glomerular destes animais, sendo esses eventos impedidos com o tratamento com LPA. Esta é a primeira vez que foi demonstrado o efeito do LPA exógeno sobre o glomérulo renal.

Fisiologicamente, a quantidade de proteína encontrada na urina é praticamente nula (cerca de 10 mg/dia). Isso ocorre porque o alto peso molecular de algumas proteínas inabilita o processo de filtração ou, se filtradas, são reabsorvidas principalmente no túbulo proximal através de endocitose mediada por receptor (ex: albumina, insulina) (Mello-AIRES, 2008a,b). De acordo com sua origem a proteinúria pode ser classificada em três tipos: (1) pré-glomerulares: ocorre quando no sangue circulante são encontradas proteínas de baixo peso molecular sendo facilmente filtradas; (2) glomerulares: podendo ser fisiológica – devido a uma modificação fisiológica da permeabilidade da membrana filtrante – ou patológica – relacionada a danos glomerulares que afetam a filtração de proteínas maiores e (3) tubulares: ocorre quando os túbulos renais são incapazes de reabsorver proteínas (MELLO-AIRES, 2008a,b e SBN, 2007). Uma vez que o tratamento com LPA recupera a morfologia do glomérulo, é plausível propor que a intensa proteinúria observada pode ser de origem tubular. Além disso, observa-se um intenso processo de reabsorção tubular de Na^+ no grupo I/R, evidenciado pela baixa fração de excreção de Na^+ e insensível ao tratamento com LPA. A diminuição do RFG acarreta menor formação de ultrafiltrado, que associado ao inapropriado aumento da reabsorção tubular ativa mecanismos de necrose tubular aguda, que mais tardiamente gera a doença renal crônica (SBN, 2007).

É sabido que o córtex renal, por receber 90% do fluxo sanguíneo renal, é a região mais sensível ao desenvolvimento de necrose tubular aguda ocasionada pelo I/R (BASILE *et al*, 2001). Esta região é composta em sua grande maioria de túbulo proximal, segmento do néfron responsável por reabsorver cerca de 70% do ultrafiltrado e contribuindo diretamente para a fração de excreção de Na^+ . Desta forma, a atividade dos transportadores primários de Na^+ : a NKA e a NaA, foram investigados. Na I/R, a atividade e a expressão da NKA encontram-se aumentadas em 110% e 50%, respectivamente em relação ao controle, enquanto a NaA diminuída 30%. Tem sido postulado que esta última ATPase também contribui para a regulação da reabsorção renal de Na^+ (CARUSO-NEVES *et al*, 1997). Com isso, a redução da atividade da NaA poderia ser uma tentativa de se evitar a reabsorção excessiva de Na^+ ; o efeito final é a diminuição da fração de excreção de Na^+ . Por outro lado, o LPA exógeno impede o aumento da atividade e da expressão de NKA, mas não impede a diminuição da atividade da NaA e tão pouco a diminuição da fração de excreção de Na^+ . Nesta condição, a

reabsorção de Na^+ em outros segmentos do néfron podem estar contribuindo para a diminuição da fração de excreção renal de Na^+ .

Com a finalidade de identificar a via de sinalização ativada pelo LPA exógeno que contribui para a proteção dos parâmetros funcionais e estruturais do rim, a expressão dos receptores de LPA foi investigada. Os receptores de LPA expressos no tecido renal são do tipo 1, 2 e 3 gerando uma variedade de respostas celulares (PARRIL, 2011). No modelo de obstrução do ureter, a ativação do receptor LPA_1 foi o responsável pelos danos renais, como exemplo a ocorrência de fibrose intersticial (PRADÈRE et al, 2008). Já o receptor LPA_2 quando ativado está geralmente associado a processos de sobrevivência e migração celular (CHOI *et al* , 2010). Por isso, a via de sinalização por ele ativada, vem despertando grande interesse como potencial fator inibidor de metástase (CHOI *et al*, 2010). Em modelo de isquemia-reperfusão, esse receptor, quando ativado, promove efeito benéfico prevenindo a apoptose desencadeada pela I/R. No entanto, quando a dose de LPA é aumentada, ocorre ativação do receptor LPA_3 , o efeito protetor é perdido (OKUSA *et al*, 2003).

Foi observado que tratamento com LPA promove a diminuição da expressão do receptor LPA_2 , mas não do LPA_1 . Uma vez que o receptor LPA_2 é o receptor de maior afinidade ao LPA (OKUSA *et al*, 2003), é plausível postular que a intensa ativação do receptor LPA_2 pelo LPA exógeno promova a sua dessensibilização. Este evento promove o desequilíbrio aumentando os sítios de ligação disponíveis do receptor LPA_1 . Vale a pena ressaltar que a I/R não altera a expressão dos receptores LPA_1 e LPA_2 .

Ambos, receptores LPA_1 e LPA_2 , são receptores acoplados à proteína Gq que ativa a via de sinalização PLC-PKC. A PKC é enzima que transfere o fosfato γ terminal do ATP para um resíduo de serina/treonina de proteínas regulando suas funções intracelulares (CHOI et al., 2010). A fosforilação mediada pela PKC está envolvida em uma série de respostas celulares incluindo a proliferação e sobrevivência celular, apoptose, adesão e motilidade celular, inflamação e adaptação à resposta imune (KUSCH *et al*, 2013). Essa complexidade de respostas é devido à existência de mais de 12 isoformas que diferem em suas estruturas, distribuição nos tecidos, localização, mecanismos de ativação e substrato específico (STEINBERH, 2008; NEWTON, 2010). As PKCs clássicas requerem o diacilglicerol (DAG) como ativador e, fosfatidilserina e Ca^{2+} como co-fatores da ativação. Esta via de sinalização inicia-se com a ativação da PLC, pela sub-unidade α da proteína Gq. A PLC, por sua vez, degrada fosfatidilinositol-bis-fosfato (PIP_2) de membrana gerando inositol-tri-fosfato (IP_3) e

DAG, este último ativa a PKC (KUSCH *et al*, 2013). A proteína cinase regula a atividade dos transportadores renais de Na⁺ presentes na MBL (NaK e NaA), pois possuem sítios de fosforilação para proteínas cinases e fosfatases (FERRAILE & DOUCET, 2001; CARUSO-NEVES *et al*, 2003; ROCAFULL *et al*, 2011).

O envolvimento desta via é evidenciado, pois: (1) o LPA retoma parcialmente a sensibilidade da PKC ao PMA e (2) no grupo I/R a atividade da NKA perde a sensibilidade ao inibidor de PLC, U73122, sendo que o LPA recupera a sensibilidade. O fato do LPA exógeno não recuperar a sensibilidade da NaA ao U73122 corrobora o achado de que o tratamento não é efetivo sobre a atividade da enzima e, conseqüentemente a fração de excreção de Na⁺.

A PKC foi identificada como um mensageiro intracelular envolvido na iniciação do estresse do RE em células T (PINO *et al*, 2008). Neste estudo, foi demonstrado que o tratamento das células T com inibidor da PKC (calhostina) promoveu a dessensibilização das vias de sinalização que ativam as células T e redução da síntese de GRP78. Ao utilizar PMA, ativador da PKC, foi observado aumento na produção de citocinas e chaperonas. Dessa forma, a indução do estresse do RE, via PKC, é um componente importante para a ativação da resposta imune ao antígeno (PINO *et al*, 2008).

O estresse do RE é um iniciador de morte celular durante a injúria tubular e glomerular causada pela isquemia renal (INAGI, 2010; YEH *et al*, 2010). A I/R promove aumento da expressão de GRP78 - regulador central do estresse do RE, assim como fosforilação de PERK e eIF2 α . A via de sinalização da UPR, uma vez ativada, culmina na ativação de fatores pró-apoptóticos como caspase-12 (INAGI, 2010; GARDNER *et al*, 2013). GAO e COLABORADORES demonstraram em 2011 que o ácido tauroursodeoxicolato (TDUCA), um inibidor do estresse do RE, pode representar uma estratégia para melhora da função renal após I/R. Essa terapia reduziu a apoptose das células tubulares epiteliais renais, com redução da expressão de GRP78, caspase 12 e CHOP.

No modelo experimental em estudo, houve manutenção da expressão de PERK nos três grupos experimentais. Esse resultado está de acordo com o dado encontrado por MAHFOUDH-BOUSSAID e COLABORADORES, 2012. O grupo mostrou aumento de p-PERK na I/R com manutenção da expressão de PERK. Outro marcador do estresse do RE é GRP78. Nossos resultados mostram aumento da expressão de GRP78 na I/R, corroborando com achados da literatura. Já o tratamento com LPA teve efeito inibidor da ativação do

estresse do RE. Ao manter a expressão dessa chaperona, a nível do grupo controle, o LPA foi capaz de inibir a UPR e consequentemente a apoptose. Observamos que durante a I/R ocorre aumento da atividade da PKC insensível ao PMA. Este evento pode ser associado ao aumento da expressão de GRP78. Desta forma, um possível mecanismo de ação do LPA seria o retorno da resposta da PKC ao seu estimulador, PMA, cessando a via UPR, recuperando a homeostasia do retículo endoplasmático e a função renal. (FIGURA 25)

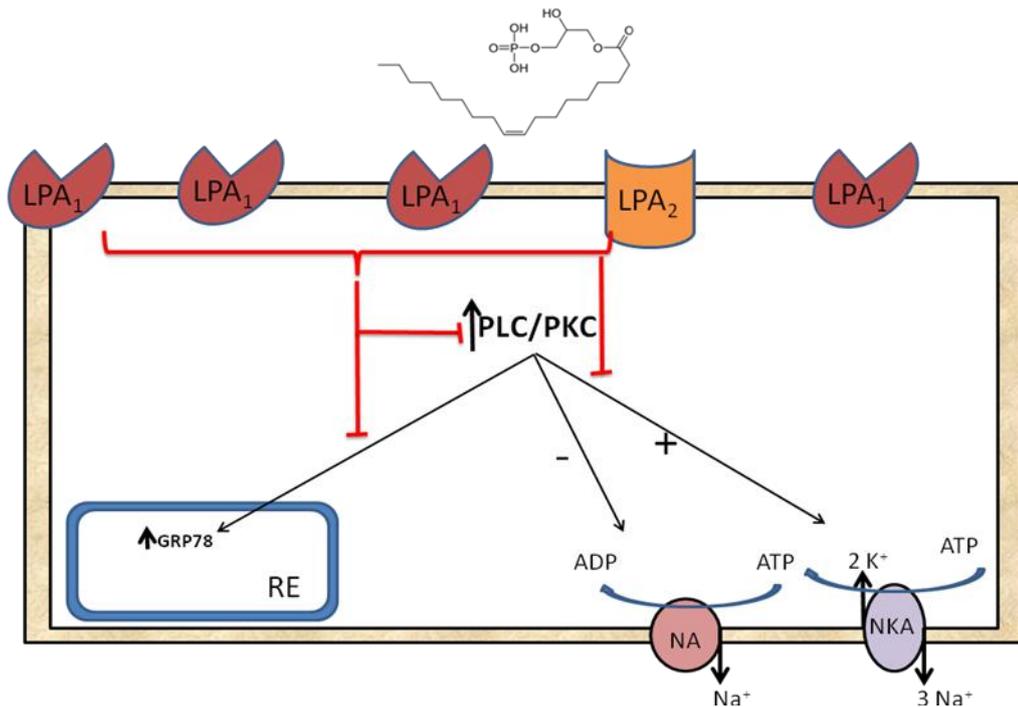


Figura 25: O tratamento com LPA previne alterações moleculares ativadas no processo de isquemia-reperfusão (I/R). O processo de I/R renal promoveu redução da transdução de sinal via PLC/PKC. Conseqüentemente, observou-se um desbalanço da atividade dos transportadores renais de Na⁺ (aumento da NKA e redução da NaA). O aumento da atividade da NKA promoveu redução da FENa⁺, característico da necrose tubular aguda. Ainda na I/R, ocorreu ativação da etapa inicial do estresse do RE, evidenciado pelo aumento da expressão de GRP78. O tratamento com LPA (1 mg/Kg de peso corpóreo) promoveu a diminuição da expressão do receptor LPA₂. Pela maior disponibilidade de ligação ao receptor LPA₁, propomos que este receptor seja o responsável pela manutenção da via de sinalização PLC/PKC, isto não impede que o receptor LPA₂ esteja envolvido no processo. O tratamento com LPA (setas em vermelho) impediu o aumento atividade da NaK e da expressão de GRP78, que poderia estar associada a prevenção dos danos glomerulares observados na I/R. A NaA foi insensível ao tratamento com LPA e poderia ser esta enzima a responsável pela não prevenção dos danos tubulares ocorridos durante a I/R. PLC: fosfolipase C; PKC: proteína cinase C; LPA_{1,2}: receptores de LPA; RE: retículo endoplasmático; GRP78: proteína regulada por glicose de 78 kDa. PLC: fosfolipase C; PKC: proteína cinase C; LPA_{1,2}: receptores de LPA; RE: retículo endoplasmático; GRP78: proteína regulada por glicose de 78 kDa.

VI. CONCLUSÃO

A administração, intracapsular, de LPA (1 mg/Kg de peso corpóreo) protege a função glomerular dos animais que sofreram o processo de I/R ao prevenir a redução do RFG, BUN e carga filtrada de Na^+ . O retorno do conteúdo do fluido intratubular, decorrente da manutenção da função glomerular, indica um mecanismo de prevenção da necrose tubular aguda, uma vez que o processo de I/R é marcado por um intenso transporte tubular. Esse transporte, caracterizado pela fração de excreção renal de Na^+ , não é afetado pelo tratamento com LPA. A insensibilidade da NaA ao tratamento com LPA pode ser a causa da ineficácia do tratamento sobre a função tubular. O retorno da sensibilidade da via PLC/PKC pode ser o mecanismo chave para o aumento da expressão e atividade da NKA e a ativação do estresse do RE durante a I/R. Esta via de sinalização pode ser consequência do desbalanço entre os receptores de LPA.

VII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesta dissertação utilizamos preparações de córtex renal, composto principalmente de glomérulos e túbulo proximal, com isso não foi possível localizar a ação do LPA. No doutorado propomos utilizar a cultura primária de células mesangiais renais para demonstrar o efeito do LPA sobre o estresse do RE e correlacionar com os parâmetros fisiológicos renais. Uma vez que foi demonstrado que o pós condicionamento isquêmico (PCI), ciclos curtos de isquemia e reperfusão momentos antes da reperfusão de 24h, recupera a função tubular (MAHFOUDH-BOUSSAID, *et al* 2012) pretendemos avaliar se a associação com LPA influencia na atividade da NaA, protegendo de uma necrose tubular aguda. Desta forma, pretendemos determinar se o tratamento com LPA e o PCI tem efeito sinérgico sobre a prevenção da injúria renal observada na I/R. Portanto, as perspectivas futuras deste trabalho serão:

1. Delinear o efeito do LPA sobre proteínas do estresse do RE em cultura primária de células mesangiais, identificando potenciais alvos farmacológicos;
2. Determinar o efeito do PCI associado a administração de LPA sobre a função renal de ratos Wistar submetidos à I/R, identificando o local e o mecanismo de ação;
3. Determinar o efeito do PCI associado a administração de LPA sobre a atividade da NaA e a via de sinalização envolvida.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASSI Z. A., WINAVER J., SKORECKI K. L. (2004) Control of extracellular fluid volume and the pathophysiology of edema formation. In: BRENNER, B. M. & RECTOR, F. C. *The Kidney*. 7 ed. USA: W. B. Saunders Company, v. 1 pp: 66-70.

ADACHI Y., YAMAMOTO K., OKADA T., YOSHIDA H., HARADA A., MORI K. (2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmatic reticulum. *Cell Struct Funct* 33: 75-89.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (2007) Protein Function, In: *Mol. Biology of the Cell*. 5 ed., Garland Science, New York. Chap. 5 pp. 212-217.

AOKI J. (2004) Mechanisms of lysophosphatidic acid production, *Seminars in cell & Develop. Biol.*, 15: 477-489.

ARAKI K., NAGATA K. (2011) Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, doi: 10.1101/cshperspect.a007526.

ARENDSHORT W. J. FINN W. F., GO

TTSCHALK C. W. (1975) Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circ. Res.*, 37:558-68.

ARENSTEIN I. R., CARUSO-NEVES C., ONUCHIC L. F., LOPES A. G. (1995) Mechanisms of cell volume regulation in the proximal segment of the malpighian tubule of *Rhodnius neglectus*. *J. Membr. Biol.*, 146: 47-57.

BAKER D. L., DESIDERIO D. M., MILLER D. D., TOLLEY B., TIGYI G. J. (2001) Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 292: 287-295.

BANDO K., AOKI J., TAIRA A., TSUJIMOTO M., ARAI H., INOUE K. (2000) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett.* 478:159-65.

BASILE D. P., DONOHOE D., ROETHE K., OSBORN J. L. (2001) Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long term function. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281: F887-99.

BEIRAL H. J., RODRIGUES-FERREIRA C., FERNANDES A. M., GONSALEZ S. R., MORTARI N. C., TAKIYA C. M., SORENSON M. M., FIGUEIREDO-FREITAS C., GALINA A., VIEYRA A. (2012) The Impact of Stem Cells on Electron Fluxes, Proton Translocation and ATP Synthesis in Kidney Mitochondria After Ischemia/Reperfusion. *Cell Transplant.*, doi: 10.3727/096368912X659862.

BELTOWSKI J. & WOJCICKA, G. (2002) Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Medical and Science Monitor.*, 2: RA39-RA52.

- BERTOLOTTI A., ZHANG Y., HENDERSHOT L. M., HARDING H. P., RON D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.*, 2: 326-332.
- BLANCO G. & MERCER R. W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.*, 5: F633-50.
- BONVENTRE J. V. & WEINBERG J. M. (2003) Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: 2199-2210.
- CABRAL L. (2006) Modulação da Ca^{2+} ATPase de túbulos proximais renais por ceramidas. Dissertação de mestrado (IBCCF – UFRJ).
- CABRAL L. (2008) Geração de ceramidas na membrana basolateral de túbulos proximais renais, e seu papel na regulação do transporte de sódio. Tese de doutorado (IBCCF – UFRJ).
- CARUSO-NEVES C., FRANCISCO-PEDRO L. G., PANTOZZI L. P., CHAGAS C., LOPES A. G., (1997) Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity from basolateral membranes of the proximal tubule. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1329: 336-344.
- CARUSO-NEVES C., LARA L. S.; RANGEL L. B.; GROSSI A. L.; LOPES A. G. (2000a) Angiotensin (1-7) modulates the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1467: 189-197.
- CARUSO-NEVES, C., RANGEL, L.B.A., VIVES, D., VIEYRA, A., COKA-GUEVARA, S., LOPES, A.G. (2000b) Ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity is an effector protein for cAMP in basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1468: 107-114.
- CARUSO-NEVES C., MALAQUIAS A. T., LÓSS F. F., CORRÊA DA COSTA V. M., GOMES V. O., LOPES A. G. (2003) Bradykinin B1 receptor stimulates the proximal tubule Na^{+} -ATPase activity through protein kinase C pathway. *Regul. Pept.*, 115: 195-201.
- CARUSO-NEVES C., LARA L. S., RANGEL L. B. A., GROSSI A. L., LOPES, A. G. (2004) Ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase of proximal tubule is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1660: 93-98.
- CHATAURET N., THUILLIER R., HAUET T. (2011) Preservation strategies to reduce ischemic injury in kidney transplantation: pharmacological and genetic approaches. *Curr. Opin. Organ Transplant.*, 16: 180-187.
- CHOI J. W., HERR D. R., NOGUCHI K., YUNG Y. C., LEE C. W., MUTOH T., LIN M. E., TEO S. T. PARK K. E., MOSLEY A. N., CHUN J. (2010) LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50: 157-186.
- CHOI J. W., LEE C. W., CHUN J. (2008) Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1781: 531-39.
- CHUN J., ROSEN H. (2006) Lysophospholipid receptors as potential drug targets in tissue transplantation and autoimmune diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 12: 161-71.

College of sciences, State University, - San Diego
<[HTTP://www.sci.sdsu.edu/Faculty/Paul.Poalini/ppp/lecture23/sld009.htm](http://www.sci.sdsu.edu/Faculty/Paul.Poalini/ppp/lecture23/sld009.htm)> (Acesso em 24.07.13).

CORNELIUS F. (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics. *Biochem.*, 40: 8842-8851.

CORNELIUS F. (2008) Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na,K-ATPase. *Biochem.*, 47: 1652-1658.

CORNELIUS F., TURNER N., CHRISTENSEN H. R. (2003) Modulation of Na,K-ATPase by phospholipids and cholesterol. II. Steady-state and presteady-state kinetics. *Biochem.*, 42: 8541-8549.

COSTA-SILVA J. H., SILVA P. A., PEDI N., LUZARDO R., EINICKER-LAMAS M., LARA L. S., BEZERRA A. M., CASTRO-CHAVES C., VIEYRA A. (2008) Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur. J. Nutr.* 48: 437-445.

DAVID R. & PETER W. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molec. cell biology.* 8: 519-528.

DE SOUZA A. M., MALAQUIAS A. T., LARA L. S., SILVA I. V., DE SOUZA A. M., LOPES A. G., CARUSO-NEVES C. (2007) Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na⁺ATPase in MDCK I cells. *Biochim.*, 11: 1425-1432.

DE VRIES B., MATTHIJSSEN R. A., VAN BIJEN A. A. J. H. M., WOLFS T. G. A. M., BUURMAN W. A. (2003) Lysophosphatidic Acid Prevents ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis and complement activation. *Am. J. Pathol.*, 163: 47-56.

DICKHOUT J. G. & KREPINSKY, J. C. (2009) Endoplasmic reticulum stress and renal disease. *Antioxid Redox Signal.*, 11: 2341-2352.

FÉRAILLE E. & DOUCET A. (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.*, 81: 345-418.

FUCHS B. & SCHILLER J. (2009) Lysophospholipids: their generation, physiological role and detection. Are they important disease markers? *Med. Chem.*, 8: 68-78.

FUTERMAN A. & HANNUN Y. A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *Embo. Rep.*, 5: 777-782.

GAO J., ZHANG D., YANG X., ZHANG Y., LI P., SU X. (2011) Lysophosphatidic acid and lovastatin might protect kidney in renal I/R injury by downregulating MCP-1 in rat. *Ren. Fail.*, 33: 805-10.

GARDNER B. M., PINCUS D., GOTTHARDT K., GALLAGHER C. M., WALTER P. (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, doi: 10.1101/cshperspect.a013169.

GEERING K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. of Bioenerg. and Biomemb.*, 33: 425-438.

- GOLDSPINK D. F. & KELLY F. J. (1984) Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from foetus to senility. *Biochem. J.*, 217: 507–516.
- GONZALEZ-MARISCAL L., BETANZOS, A., NAVA, P., JARAMILLO, B. E. (2003) Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81: 1-44.
- GOTTSCHALK C. W. (1963) RENAL TUBULAR FUNCTION: LESSONS FROM MICROPUNCTURE. *Harvey Lect.*, 58: 99-124.
- HANNUN Y. A. & OBEID L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Rev. Mol. Cell Bio.*, 9: 139-150.
- HETCH J. H., WEINER J. A., POST S. R., CHUN J. (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell Biol.*, 135: 1071-1083.
- HORISBERGER J. D. (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiol.*, 19: 377-387.
- Inagi R. (2009) Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Exp. Nephrol.*, 112: e1-9.
- INAGI R. (2010) Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr. Opin Pharm.*, 10: 156-165.
- INOUE C. N. (2002) LPA as a determinant of mesangial growth and apoptosis. *Semin Nephrol.*, 22: 415-422.
- ISHII I., FUKUSHIMA N., YE X., CHUN J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.*, 73: 321-54.
- JO S. K., ROSNER M. H., OKUSA M. D. (2007) Pharmacologic treatment of acute kidney injury. Why drugs haven't worked and what is on the horizon. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2: 256–365.
- KAUFMAN R. J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.*, 13: 1211-1233.
- KIMURA K., JIN H., OGAWA M., AOE T. (2008) Dysfunction of the ER chaperone BiP accelerates the renal tubular injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 366: 41048-1053.
- KOTARSKY K., BOKETOFT A., BRISTULF J., NILSSON, N. E., NORBERG A., HANSSON S., OWMAN C., SILLARD R., LEEB-LUNDBERG, L. M., OLDE B. (2006) Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *J. Pharmacol. Exp.*, 318: 619-628.
- KRIZ W., KAISSLING B. Structural organization of the mammalian kidney, (chapter 14) in *The Kidney—Physiology and Pathophysiology*, edited by Seldin D. W., Giebisch G., New York, Raven Press, 1985, pp. 265-306.
- KUSCH A., HOFF U., BUBALO G., ZHU Y., FECHNER M., SCHMIDT-ULLRICH R., MARKO L., MÜLLER D. N., SCHMIDT-OTT K. M., GÜRGEN D., BLUM M., SCHUNCK W. H., DRAGUN D. (2013). Novel signalling mechanisms and targets in renal ischaemia and reperfusion injury. *Acta Physiologica.*, 1: 25-40.

- LARA L. S., CORREA J. S., LAVELLE A. B., LOPES A. G., CARUSO-NEVES C. (2008) The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidyl inositol phospholipase Cbeta-protein kinase C pathway is involved in activation of proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1-7) in pig kidneys. *Exp. Physiol.*, 93: 639-647.
- LAYTON A. T. (2012) Modeling Transport and Flow Regulatory Mechanisms of the Kidney. *ISRN Biomath.*, doi: 10.5402/2012/170594.
- LEE M., CHOI G., HALLDEN G., YO S. J., APONTE G. W. (2009) P2Y5 is a G(alpha)I, G(alpha)12/13 G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 297: G641-G654.
- LEE, C. W., RIVERA R., GARDELL, S., DUBIN A. E., CHUN, J. (2006) GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J. Biol. Chem.*, 281: 23589-23597.
- LEVINE J. S, KOH J. S, TRIACA V., LIEBERTHAL W. (1997) Lisophosphatidic acid: a novel growth and survival factor for renal proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.*, 273: 575-585.
- LIMA E. Q., DIRCE M. T., CASTRO I., YU L. (2005) Mortality Risk Factors and Validation of Severity Scoring Systems in Critically Ill Patients with Acute Renal Failure. *Renal Fail.*, 27: 547-56.
- LINGREL J. B. & KUNTZWEILER T. (1994) Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 31: 19659-62.
- LONG J., DARROCH P., WAN K. F., KONG K. C., KTISTAKIS N., PYNE N. J., PYNE S. (2005) Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools. *Biochem. J.*, 391: 25-32.
- LOPES A. G., SOARES, A. C., SANTOS D. P., FERNADES M. S., LEÃO FERREIRA L. R., QUINTANA-GOMES E., CARUSO-NEVES C. (2004) PLA2/PGE2 are involved in the inhibitory effect of bradykinin on the angiotensin-(1-7)-stimulated Na⁺-ATPase activity of the proximal tubule. *Regul. Pep.*, 117: 37-41.
- MAHFOUDH-BOUSSAID A., ZAOUALI M. A., HAUET T., HADJ-AYED K., ABDEL-HÉDI M., GHOUL-MAZGAR S., SAIDANE-MOSBAHI D., ROSELLO-CATAFAU C., ABDENNEBI H. A. (2012) Attenuation of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in kidney with ischemic postconditioning application and trimetazidine treatment. *J. of Biom. Science.*, 19: 71-77.
- MALHOTRA J. D. & KAUFMAN R. J. (2007) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antiox. Red. Signal.*, 9: 2277-2293.
- MALNIC G., ENOIKIBARA H., MELLO-AIRES M., LACAZ-VIEIRA F. (1969) Effect of furosemid and NaCl-loading on chloride excretion in single nephrons of rat kidneys. *Pflügers. Arch.*, 309: 21-37.
- MCINTYRE T. M., PONTSLEA A. V., SILVA A. R., HILAIRE A., XU Y., HINSHAW J. C., ZIMMERMAN G. A., HAMA K., AOKI J., ARAI H., PRESTWICH G. D. (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 131-136.

- MELLO-AIRES M. (2008a) Excreção renal de solutos. Mello-Aires M. *Fisiologia*. 3ª ed. Guanabara Koogan S. A. Brasil, Rio de Janeiro. Cap. 51 pp. 730-736.
- MELLO-AIRES M. (2008b) Função Tubular. Mello-Aires M. *Fisiologia*. 3ª ed. Guanabara Koogan S. A. Brasil, Rio de Janeiro. Cap. 50 pp. 717-727.
- MELLO-AIRES M. (2008c) Visão morfofuncional do rim. Mello-Aires M. *Fisiologia*. 3ª ed. Guanabara Koogan S. A. Brasil, Rio de Janeiro. Cap. 48 pp. 681-689.
- MITREA D. M. & KRIWACKI R. W. (2013) Regulated unfolding of proteins in signaling. *Febs. Lett.*, 10: 10-16.
- MOLLER J. V., JUUL B., LE MAIRE M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1286: 1-51.
- MORETTI R., MARTIN M., PROVERBIO T., PROVERBIO R., MARIN R. (1991) Ouabain-insensitive Na.-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B: 623-626.
- MUTOH T., RIVERA R., CHUN J. (2011) Insights into the pharmacological relevance of lysophospholipid receptors. *Br. J. pharmacol.*, 165: 829-844.
- NEWTON A. C. (2010) Protein Kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.*, 298: E395-E402.
- NOGUCHI K. & ISHII S., SHIMIZU T. (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J. Biol. Chem.*, 278: 25600-25606.
- OKUSA M. D., YE H., HUANG L., SIGISMUND L., MACDONALD T., LYNCH K. R. (2003) Selective blockade of lysophosphatidic acid LPA₃ receptors reduces murine renal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 285: F565-574.
- OZTÜRK H., ALDEMIR M., BÜYÜKBAYRAM H., DOKUCU A. I., OTÇU S. (2001) The effects of the nitric oxide donor molsidomine prevent in warm ischemia-reperfusion injury of the rat renal--a functional and histopathological study. *Int. Urol. Nephrol.*, 32: 601-607.
- PAGES C., SIMON M. F., VATER P., SAULNIER-BLACHE J. S. (2001) Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 64:1-10.
- PARRIL A. L. (2011) LPA receptor agonists and antagonists (WO2010051053). *Expert Opin. Ther. Pat.*, 21: 281-286.
- PASCHER A. & KLUPP J. (2005) Biologics in the treatment of transplant rejection and ischemia/reperfusion injury: new applications for TNFalpha inhibitors? *Bio. Drugs.*, 19: 211-231.
- PASTERNAK S. M., VON KÜGELGEN, I., ABOUD K. A., LEE Y. A., RÜSCHENDORF F., VOSS K., HILLMER A. M., MOLDERINGS G. J., FRANZ T., RAMIREZ A., NÜRNBERG P., NÖTHEN M. M., BETZ R. C. (2008) G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat. Genet.*, 40: 329-334.

- PIERRE S. V., BELLIARD A., SOTTEJEAU Y. (2011) Modulation of Na(+)-K(+) ATPase cell surface abundance through structural determinants on the α 1-subunit. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 300: C42-48.
- PINO S. C., O'SULLIVAN-MURPHY B., ERICH A. L., THOMAS B. T., AGATA J., FUMIHIKO U., DALE L., GREINER J. P. M., ROSSINI A. A., BORTELL R. (2008) Protein kinase C signaling during T cell activation induces the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Stress and Chap.*, (2008) 13:421-434.
- PRACHASILCHAI W., SONODA H., YOKOTA-IKEDA N., OSHIKAWA S, AIKAWA C., UCHIDA K., ITO K., KUDO T., IMAIZUMI K., IKEDA M. (2008) A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *Europ. J. of Pharmacol.*, 592: 138-145.
- PRADÈRE J. P., GONZALEZ J., KLEIN J., VALET P., GRÈS S., SALANT D., BASCANDS J. L., SAULNIER-BLACHE J. S., SCHANSTRA J. P. (2008) Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1781: 582-587.
- PRADÈRE J. P., KLEIN J., GRÈS S., GUIGNÉ C., NEAU E., VALET P., CALISE D., CHUN J., BASCANDS J. L., SAULNIER-BLACHE J., SCHANSTRA J. P. (2007) LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18: 3110-3118.
- PRASAD R. (1996) *Manual on Membrane Lipids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Germany. 1ed. pp.23-31.
- PROVERBIO F. & DEL CASTILLO J. R. (1981) Na⁺-stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 646: 99-108.
- PROVERBIO F., MARÍN R., PROVERBIO T. (1991) The ouabain-insensitive sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta.*, 99: 279-283.
- QUEIROZ-MADEIRA E. P., LARA L. S., WENGERT M., LANDGRAF S. S., LÍBANO-SOARES J. D., ZAPATA-SUDO G., SUDO R. T., TAKIYA C. M., GOMES-QUINTANA E., LOPES A. G., CARUSO-NEVES C. (2010) Na(+)-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT(1) receptor target in the development of hypertension. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1798: 360-366.
- RANGEL L. B. A., MALAQUIAS A. T., LARA L. S., SILVA I. V., DE SOUZA A. M., LOPES A. G., CARUSO-NEVES C. (2001) Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na⁺-ATPase activity from proximal tubules. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1512: 90-97.
- RANGEL L. B., LOPES A. G., LARA L. S., CARVALHO T. L., SILVA I. V., OLIVEIRA M. M., EINICKER-LAMAS M., VIEYRA A., NOGAROLI L., CARUSO-NEVES C. (2005) PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. *Regul. Pept.*, 127: 177-182.
- RICKETTS W. G., BIRCHENALL-SPARKS M. C., HARDWICK J. P., RICHARDSON A. (1985) Effect of age and dietary nutrition on protein synthesis by isolated kidney cells. *J. Cell Physiol.*, 125:492-498.
- RIVARD C. J., ALMEIDA N. E., BERL T., CAPASSO J. M. (2005) The gamma subunit of Na/K-ATPase: an exceptional, small transmembrane protein. *Front. Biosci.*, 10: 2604-2610.

- ROCAFULL M. A., ROMERO F. J., THOMAS L. E., DEL CASTILLO J. R. (2011) Isolation and cloning of the K(+) independent, ouabain-insensitive Na(+)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1808: 1684-700.
- ROCAFULL M. A., THOMAS L. E., DEL CASTILLO J. R. (2012) The second sodium pump: from the function to the gene. *Pflugers Arch.*, 463(6): 755-777.
- RON D. & WALTER P. (2006) Signal integration in the unfolded endoplasmatic reticulum response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 519-529.
- SANTOS W. J., ZANETTA D. M., PIRES A. C., LOBO S. M., LIMA E. Q., BURDMANN E. A. (2006) Patients with Ischaemic, Mixed and Nephrotoxic Acute Tubular Necrosis in the Intensive Care Unit: a homogeneous population? *Crit. Care.* 10: R68-71.
- SBN - Sociedade Brasileira de Nefrologia (2011). Diretrizes e bases para a Insuficiência Renal Aguda da Sociedade Brasileira de Nofrologia Disponível em: <http://www.sbn.org.br/>. (Acesso em 10.02.12).
- SBN- Sociedade Brasileira de Nefrologia (2007). Diretrizes e bases para a Insuficiência Renal Aguda da Sociedade Brasileira de Nofrologia Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/diretrizes/Diretrizes_Insuficiencia_Renal_Aguda.pdf (Data de acesso: 15.04.2011).
- SCHRÖDER M. & KAUFMAN R. J. (2007) The Mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.*, 74: 739-789.
- SHAMRAJ O. I. & LINGREL J. B. (1994) A putative fourth Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 26: 12952-6.
- SHULL G. E., GREEB J., LINGREL B. (1986) Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit from rat brain. *Biochemistry.* 25: 8125-32.
- SHULL G. E., GREEB J., LINGREL J. B. (1986) Molecular cloning of three distinct forms of the Na,K-ATPase a subunit from rat brain. *Biochem.*, 261: 16788-91.
- SINGH S. K., MALIK A., FIROZ A., JHA V. (2012) CDKD: a clinical database of kidney diseases. *BMC Nephrol.*, doi: 10.1186/1471-2369-13-23.
- SKOU J. C. Nobel Lecture. (1957) The identification of the sodium pump. *Bioscien. Report*, 18: 155-169.
- STEINBERG S. F. (2008). Structural basis of protein Kinase C isoform function. *Physiol. Re.*, 88: 1341-1378.
- SWEADNER K. J. (1989) Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 988: 185-220.
- TANAKA T., MORITO K., KINOSHITA M., OHMOTO M., URIKURA M., SATOUCHI K., TOKUMURA A. (2012) Orally Administered Phosphatidic Acids and Lysophosphatidic Acids Ameliorate Aspirin-Induced Stomach Mucosal Injury in MICE. *Dig. Dis. Sci.*, 58: 950-958.

- TESSARI P., GARIBOTTO G., INCHIOSTRO S., ROBAUDO C., SAFFIOTI S., VETTORE M., RUSSO R., DEFERRARI G. (1996) Kidney, splanic, and leg protein turnover in humans: insight from leucine and phenilalanine kinetics. *J. Clin. Invest.*, 98: 1481-1492.
- TOKUMURA A., FUKUZAWA K., TSUKATANI H. (1978). Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids*, 13: 572-74.
- TOKUMURA, A., SINOMIYA J., KISHIMOTO S., TANAKA T., KOGURE K., SUGIURA T., SATOUCHI K., WAKU K., FUKUZAWA K. (2002) Human platelets respond differentially to lysophosphatidic acids having a highly unsaturated fatty acyl group and alkyl ether-linked lysophosphatidic acids. *Biochem. J.*, 365: 617-28.
- VAN MEER G., VOELKER D. R., FEIGENSON G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9: 112-124.
- VEMBAR S. S. & BRODSKY J. L. (2008) One step at a time: endoplasmatic reticulum-associated degradation. *Nat. Ver. Mol. Cell Bioll.*, 8: 944-957.
- VERDOORN K. S, LINDOSO R. S., LOWE J., LARA L. S., VIEYRA A., EINICKER-LAMAS M. (2010) Bone marrow mononuclear cells shift bioactive lipid pattern in injured kidney towards tissue repair in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 25: 3867-74.
- WENGERT M., ADÃO-NOVAES J., ASSAIFE-LOPES N., LEÃO-FERREIRA L. R., CARUSO-NEVES C. (2007) Adenine-induced inhibition of Na(+)-ATPase activity: Evidence for involvement of the Gi protein-coupled receptor in the cAMP signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.*, 467: 261-267.
- WHITTEMBURY G. & PROVERBIO F. (1970) Two modes of Na extrusion in cells from guinea-pig kidney slices. *Pflugers Arch.*, 316:1-25.
- WRIGHT W. S. (1952) Advances in renal physiology; a critical review. *Arch. Middx. Hosp.*, 2: 69-78.
- XIE Z. & CAI T. (2003) Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.*, 3: 157-68.
- YAMAMOTO K., SATO T., MATSUI T., SATO M., OKADA T., YOSHIDA H., HARADA A., MORI K. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α e XBP1. *Dev. Cell* 13: 365-376.
- YANAGIDA K., KURIKAWA Y., SHIMIZU T., ISHII S. (2013) Current progress in non Edg family LPA receptor research. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1831: 33-41.
- YEH C. H., HSU S. P., YANG C. C., CHIEN C. T., WANG N. P. (2010) Hypoxic preconditioning reinforces HIF- α -dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy. *Life Sci.*, 86: 115-23.
- ZHAO Y. & NATARAJAN V. Z (2009) Lysophosphatidic acid signaling in airway epithelium: role in airway inflammation and remodeling. *Cell Signal.*, 3: 367-377.

Anexo 1: Artigo Científico

Durante o meu mestrado, mais especificamente no ano de 2012, tive o convite do Prof^o Adalberto Vieyra para participar da realização de parte do trabalho experimental da sua aluna de pós-doutorado Hellen J. Beiral. A minha colaboração baseou-se na realização experimental, análise dos dados e discussão na confecção do artigo. Mais especificamente, realizei toda a análise funcional, desde a cirurgia dos animais, coleta das amostras biológicas até a quantificação dos parâmetros fisiológicos renais. Esses resultados foram fundamentais para avaliar a ação benéfica do tratamento com células tronco de medula óssea, prevenindo os danos funcionais renais dos animais que sofreram a injúria de isquemia-reperfusão renal. O trabalho foi publicado na revista *Cell transplantation*. Segue em anexo a folha de rosto do artigo.

Copyright © 2012 Cognizant Communication Corporation

DOI: 10.3727/096368912X659862

CT-0901 Accepted 11/19/2012 for publication in "Cell Transplantation"

**The Impact of Stem Cells on Electron Fluxes, Proton Translocation and ATP Synthesis
in Kidney Mitochondria After Ischemia/Reperfusion**

Hellen J. V. Beiral,*† Clara Rodrigues-Ferreira,*†§ Aline M. Fernandes,*† Sabrina R.
Gonsalez, †¶ Nicoli C. Mortari,* Christina M. Takiya,* Martha M. Sorenson,§† Cícero
Figueiredo-Freitas,§† Antonio Galina,§# and Adalberto Vieyra*†

*Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
Brazil

†National Institute of Science and Technology for Structural Biology and Bioimaging, Rio de Janeiro,
Brazil

¶Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

§Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

#National Institute of Science and Technology of Excitotoxicity and Neuroprotection

Suggested running head: STEM CELLS AND MITOCHONDRIA IN I/R

Address correspondence to Adalberto Vieyra, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal
University of Rio de Janeiro, Building G Health Sciences Center, Rio de Janeiro 21941-590.

Telephone: +55 21 25626520; Fax: +55 21 22808193; e-mail: avieyra@biof.ufjf.br

Anexo 2: Carta do CEUA para uso de animais experimentais

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2013

Prezado Professor Adalberto Vieyra

A Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **“Terapia Celular em Modelo de Obstrução Ureteral Unilateral Reversível: Análise de Marcadores Moleculares na Progressão da Lesão e do Reparo de tecido Renal”**, onde é prevista a utilização de **55 ratos**, foi aprovado por esta comissão no dia **28/05/2009**, sob o número de referência **IBCCF087**.

Atenciosamente;

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da CEUA - CCS
Comissão de Ética com Uso
de Animais em Pesquisa do CCS

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS