



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PATRÍCIA ANDRÉA DA FONSECA MAGALHÃES**

**ACIDOSE METABÓLICA AGRAVA A LESÃO RENAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO**

**FORTALEZA**  
**2016**

PATRÍCIA ANDRÉA DA FONSECA MAGALHÃES

ACIDOSE METABÓLICA AGRAVA A LESÃO RENAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Braga Libório.

FORTALEZA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- M168a      Magalhães, Patrícia Andréa da Fonseca.  
                Acidose metabólica agrava a lesão renal em modelo experimental de isquemia/reperfusão  
                / Patrícia Andréa da Fonseca Magalhães. – Fortaleza, 2016.  
                108 f. : il. color.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e  
                Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2016.  
                Orientação: Prof. Dr. Alexandre Braga Libório.
1. Cetose. 2. Heme Oxigenase-1. 3. NF-Kappa B. 4. Lesão Renal Aguda. I. Libório, Alexandre  
                Braga (Orient.). II. Título.

---

CDD 615.1

PATRÍCIA ANDRÉA DA FONSECA MAGALHÃES

ACIDOSE METABÓLICA AGRAVA A LESÃO RENAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia.

Aprovada em: 18/02/2016.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Alexandre Braga Libório (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Junior  
Universidade de Fortaleza- UNIFOR

---

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior  
Universidade Federal do Ceará - UFC

A minha mãe, Tânia, meu porto seguro, exemplo de coragem, amor e caráter. A ela devo minha vida e todas as minhas conquistas.

A minha vizinha, Marilena, a quem hoje infelizmente não posso mais agradecer pessoalmente, somente em pensamento, pois o que resta é somente a saudade.

A meu esposo, Pedro, o grande amor da minha vida, que me impulsiona a viver e acreditar no verdadeiro amor, depois de tantos desencontros o eterno encontro.

Aos meus eternos amores, Alessandro e Beatriz, razão da minha existência e as principais conquistas da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ouvir minhas súplicas, por me fazer mais forte a cada obstáculo e por me permitir chegar até aqui. E a Nossa Senhora, minha mãe do céu, por ser minha intercessora junto ao Pai.

Em especial à minha mãe, ao meu marido e aos meus filhos que foram essenciais durante essa caminhada e por suportarem as minhas dúvidas, angústias, receios, medos e provas. Sem vocês ao meu lado eu não conseguiria.

Ao meu sogro, Gerardo Magalhães (*in memoriam*), por ter me ensinado, através de suas singelas atitudes, que a família é o nosso maior tesouro. Saudades eternas!

A todos os meus familiares pelo apoio, torcida e pelas orações.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Braga Libório, pela oportunidade de realizar o doutorado, pela atenção, dedicação e pelos valiosos ensinamentos.

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins Nunes pela confiança depositada em mim desde o mestrado. Graças a sua confiança, meu sonho foi possível.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos pelo acolhimento gentil e cordial em seu laboratório e pelas constantes demonstrações de simplicidade e dedicação ao trabalho e às pessoas. Sou infinitamente grata por seus ensinamentos, carinho, amizade e pelas produtivas conversas durante o cafezinho.

Ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes pela disponibilidade com que sempre atendeu às minhas solicitações, mas, sobretudo pelos valiosos momentos de aprendizado. Meu respeito e admiração.

Às professoras Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar e Dra. Renata de Sousa Alves pelas importantes considerações realizadas em minha qualificação.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*) por abrir as portas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), mas, sobretudo pelos valiosos e inesquecíveis conselhos.

Aos professores Dr. Daniel Freire de Sousa e Dra. Jamile Magalhães Ferreira pelo apoio, por partilharem seus conhecimentos e por serem sempre prestativos.

Ao Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou por partilhar seus conhecimentos e pela atitude sempre solícita em diversos momentos.

Aos colegas de Pós-Graduação, agora professores, Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva e Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira pela dedicada colaboração nos experimentos, pelos momentos de aprendizado, apoio e por serem sempre prestativos.

À Dra. Teresinha Silva de Brito pelo constante incentivo e apoio nos bons e nos não tão bons momentos durante esse percurso. Foi um privilégio poder conviver diariamente com uma pessoa incrível e iluminada como você. Eternamente grata.

Em especial ao Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI), minha segunda casa. Aos que já passaram (Cássia Rodrigues, Fernanda Nóbrega, François Cosker, Helder Veras, Luan Ferreira, Marília Soares) e aos que permanecem (Alfredo Vasconcelos, Daniel Maia, Emanuella Feitosa, Felipe Macário, Franzé Batista, Kalinne Gadelha, Thiago Brasileiro, Tatyane Linhares) meu muito obrigado e minha eterna gratidão por todos esses anos de acolhida, carinho, colaboração, aprendizado e companheirismo. Desejo de coração um grande sucesso a todos.

Aos colegas do Laboratório Escola Luiz Capelo (LELC), por sempre me receberem com cordialidade, presteza e pelos agradáveis momentos de colaboração e aprendizado, em especial Klingem Freitas e Rômmulo Siqueira.

A toda a equipe do LAFICA, principalmente ao Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior e a Profa. Dra. Mariana Lima Valle pela disponibilidade e valiosa colaboração em muitos momentos, e em especial aos colegas Ana Paula Santana, Anielle Torres, Camila Meirelles, Carlos Wagner, Karoline Aragão, Deysi Wong, Eudmar Marcolino, Larisse Lucetti, Livia Mourão, Renan Silva por sempre me receberem com gentileza e cordialidade e pelos excelentes momentos de colaboração e aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDT), em especial: Alba Torres, Clarissa Perdigão, Dânya Lima, Gdayllon Cavalcante, Isabel Oliveira, Jáder Canuto, Kamila Soares, Louise Tessarolo, Marcus Felipe, Ramon de Paula Pessoa, Ticiane Praciano pela ajuda e atenção e por sempre me receberem com simpatia e cordialidade.

Ao Laboratório de Farmacologia de Venenos Toxinas e Lectinas (LFAVET), principalmente a Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro por conceder o uso do laboratório, e em especial aos colegas Aline Marinho, Natacha Alves, Rafael Jorge, Roberta Jeane, Rafael Ximenes pelos momentos de aprendizado e companheirismo.

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelo fornecimento dos animais e pelo espaço cedido para realização de vários experimentos.

A Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela disponibilização e realização dos experimentos de microscopia confocal.

À Dra. Rosemayre Souza Freire pela realização das análises em microscopia confocal, pela discussão dos dados e pelas agradáveis conversas.

Aos técnicos, Maria Silvandira França Pinheiro e Haroldo Pinheiro, pela constante disponibilidade, pela valiosa ajuda e por terem transformado dias árduos e intermináveis de experimentos em momentos leves e agradáveis.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial, Amanda Lopes pelos momentos de alegrias, tristezas e principalmente de companheirismo.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Raimundinha Gomes e Maxwell Rodrigues os meus mais sinceros agradecimentos pelo prestativo atendimento.

Ao Departamento de Morfologia pelo processamento do material biológico para confecção de lâminas histológicas.

À Socorro França, Josy e Margareth pelo inestimável apoio técnico.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelos serviços prestados e dedicação.

Aos funcionários do Centro de Biomedicina e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, em especial: José Amadeus, Lúcia Cutrim, Cláudia Mateus, Valdemir pela atenção e disponibilidade.

Aos amigos, Roberta Mapurunga, Valgícia Sales, Raquel Albuquerque, Vera Mendes, Elna Carvalho, Sérgio Barroso, Wagner Mapurunga, Mardem Carneiro pelo apoio, carinho e torcida. Agradeço a Deus por ter a companhia de vocês na jornada da vida.

A todos os profissionais, amigos e colegas, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Biomedicina do Semiárido Brasileiro pelo apoio financeiro.



“Enquanto houver vontade de lutar haverá esperança de vencer”.  
(Santo Agostinho)

## RESUMO

Lesão renal por isquemia/reperfusão (I/R) e acidose metabólica (AM) são duas condições críticas que ocorrem frequentemente na prática clínica. O resultado dessa combinação pode ser prejudicial para os rins, mas esta questão não tem sido exaustivamente estudada até hoje. O presente estudo avaliou em ratos a influência do baixo pH sistêmico em vários parâmetros da função renal mediante lesão renal por I/R. A acidose metabólica foi induzida em ratos Wistar machos através da ingestão de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) dissolvido na água de beber, iniciando 2 dias antes da indução de lesão renal por isquemia/reperfusão e mantida durante todo o estudo. Isquemia/reperfusão renal foi induzida por clampeamento bilateral das artérias renais durante 45 min, seguido por 48 h de reperfusão. Ao final do estudo, foram obtidas amostras de sangue arterial, urina e tecido renal. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (submetido à cirurgia *sham*,  $n = 8$ ), I/R ( $n = 8$ ), acidose metabólica (AM; solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M + cirurgia *sham*,  $n = 6$ ), e AM+I/R (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M + I/R,  $n = 9$ ). Em comparação com grupo I/R, ratos AM+I/R apresentaram maior mortalidade (50% vs. 11%), redução significativa de pH sanguíneo ( $7,00 \pm 0,04$  vs.  $7,35 \pm 0,03$ ), bicarbonato plasmático (pBic;  $9,0 \pm 1,4$  vs.  $21,4 \pm 0,9$  mmol/L), e excesso de base (SBE;  $-23,8 \pm 1,5$  vs.  $-2,7 \pm 0,9$  mmol/L), com declínio no ritmo de filtração glomerular ( $0,05 \pm 0,02$  vs.  $0,14 \pm 0,03$  mL/min/100 g) e função tubular. Além disso, as alterações tubulares foram mais intensas determinando escore de lesão tubular significativamente maior. Imunofluorescência mostrou que a combinação entre acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal aumentou nitidamente a expressão do fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) e da heme oxigenase-1 (HO-1), mas não interferiu na diminuição da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) causada por I/R. Os resultados sugerem que a lesão renal induzida por isquemia/reperfusão é agravada pela acidose.

**Palavras-chave:** Acidose metabólica. Heme-oxigenase 1. Fator nuclear  $\kappa\text{B}$ . Lesão renal aguda. Isquemia/reperfusão renal.

## ABSTRACT

Ischemia/reperfusion (I/R) injury and metabolic acidosis (MA) are two critical conditions that frequently occur in the clinical practice. The result of this combination can be harmful to the kidneys, but this issue has not been thoroughly investigated hitherto. The present study evaluated the influence of low systemic pH on several kidney function parameters in rats subjected to experimental model of renal I/R injury. Metabolic acidosis was induced in male Wistar rats by ingesting ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) in tap water, beginning 2 days before ischemic insult and maintained during the entire study. Ischemia/reperfusion was induced by clamping both renal arteries for 45 min, followed by 48 h of reperfusion. At the end of the study, arterial blood samples and urine were collected and left kidneys were harvested. Four groups were studied: control (subjected to sham surgery,  $n = 8$ ), I/R ( $n = 8$ ), metabolic acidosis (MA; 0.28 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution and sham surgery,  $n = 6$ ), and MA+I/R (0.28 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution plus I/R,  $n = 9$ ). Compared with I/R rats, MA+I/R rats exhibited higher mortality (50% vs. 11%), significant reduction of blood pH ( $7.00 \pm 0.04$  vs.  $7.35 \pm 0.03$ ), plasma bicarbonate (pBic;  $9.0 \pm 1.4$  vs.  $21.4 \pm 0.9$  mmol/L), and standard base excess (SBE;  $-23.8 \pm 1.5$  vs.  $-2.7 \pm 0.9$  mmol/L), with a severe decline in the glomerular filtration rate ( $0.05 \pm 0.02$  vs.  $0.14 \pm 0.03$  mL/min/100 g) and tubular function. In addition, tubular changes were more intense determining higher scores of tubular injury. Immunofluorescence revealed that the combination of MA and I/R markedly increased nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) and heme-oxygenase 1 (HO-1), but it did not interfere with the decrease in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression that was caused by I/R injury. Our findings suggest that acute ischemic kidney injury is exacerbated by acidic conditions.

**Keywords:** Metabolic acidosis. Heme-oxygenase 1. Nuclear factor  $\kappa\text{B}$ . Acute kidney injury. Renal ischemia/reperfusion.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do protocolo experimental.....	39
Figura 2 –	Representação esquemática dos grupos experimentais.....	40
Figura 3 -	Representação esquemática do sistema para vasos de resistência isolados (miógrafo) com preparação da artéria renal.....	45
Figura 4 -	Parâmetros biológicos de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal.....	49
Figura 5 -	Parâmetros gasométricos de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal.....	51
Figura 6 -	Parâmetros hemodinâmicos de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal.....	52
Figura 7 -	Efeitos da acidose metabólica na função renal de ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal.....	55
Figura 8 -	Efeitos da acidose metabólica no nível plasmático de eletrólitos de ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal.....	56
Figura 9 -	Efeitos da acidose metabólica nos parâmetros urinários de ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal.....	57
Figura 10 -	Alterações morfológicas renais em ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal.....	59
Figura 11 -	Efeito da acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal na expressão da eNOS.....	61
Figura 12 -	Relaxamento vascular induzido por acetilcolina em anéis de artéria renal de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal.....	62
Figura 13 -	Efeito da acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal na expressão de NF- $\kappa$ B.....	64
Figura 14 -	Efeito da acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal na expressão de HO-1.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ach	Acetilcolina
AM	Acidose metabólica
AM+I/R	Acidose metabólica + isquemia/reperfusão
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BR	Bilirrubina
BSA	Albumina sérica bovina
BV	Biliverdina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
ClCr	<i>Clearance</i> de creatinina
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTL	Controle
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRC	Doença renal crônica
DRCT	Doença renal crônica terminal
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FE	Fenilefrina
FECI <sup>-</sup>	Fração de excreção de cloreto
FEK <sup>+</sup>	Fração de excreção de potássio
FENa <sup>+</sup>	Fração de excreção de sódio
FSR	Fluxo sanguíneo renal

FU	Fluxo urinário
Hct	Hematócrito
HO-1	Heme oxigenase-1
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
i.p.	Intraperitoneal
I/R	Isquemia/reperfusão renal
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRA	Insuficiência renal aguda
K <sup>+</sup>	Potássio
LEC	Líquido extracelular
LPS	Lipopolissacarídeo
LRA	Lesão renal aguda
LRAi	Lesão renal aguda isquêmica
M	Molar
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
mN	Milnewton
Na <sup>+</sup>	Sódio
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico

NTA	Necrose tubular aguda
OAR	Oclusão da artéria renal
Osm	Osmolalidade
PAM	Pressão arterial média
pBic	Bicarbonato plasmático
PBS	Tampão fosfato-salina
PCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de carbono
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
SBE	Excesso de base
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
VCAM	Molécula de adesão vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 Lesão renal: fundamentos epidemiológicos e clínicos.....	16
1.2 E o papel da I/R na lesão renal aguda?.....	18
1.3 Modelo experimental de lesão renal aguda por I/R.....	24
1.4 Regulação do pH e acidose metabólica.....	26
1.5 Indução experimental de acidose metabólica com NH <sub>4</sub> Cl.....	30
1.6 Fator nuclear <i>kappa</i> B (NF- $\kappa$ B).....	30
1.7 Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).....	32
1.8 Heme oxigenase -1 (HO-1).....	33
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Aspectos éticos.....	37
4.2 Animais.....	37
4.3 Indução de acidose metabólica.....	37
4.4 Indução de lesão renal aguda por I/R renal.....	38
4.5 Grupos Experimentais.....	40
4.6 Parâmetros biológicos.....	41
4.7 Parâmetros gasométricos.....	41
4.8 Avaliação da função renal.....	42
4.9 Avaliação histopatológica do tecido renal.....	43
4.10 Expressão de eNOS, NF- $\kappa$ B, HO-1 por imunofluorescência.....	43
4.11 Avaliação da reatividade vascular em artérias renais.....	44
4.12 Análise Estatística.....	46
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1 Parâmetros biológicos.....	48
5.2 Parâmetros gasométricos e hemodinâmicos.....	50
5.3 Avaliação da função renal.....	53
5.4 Análise histopatológica.....	58
5.5 Acidose metabólica não altera a expressão reduzida da eNOS ou a menor responsividade colinérgica na artéria renal causada por I/R.....	60
5.6 Acidose metabólica potencializa a expressão de NF- $\kappa$ B causada por I/R.....	63
5.7 Acidose metabólica potencializa a expressão da HO-1 causada por I/R.....	65
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: METABOLIC ACIDOSIS AGGRAVATES EXPERIMENTAL ACUTE KIDNEY INJURY.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO A – DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.....</b>	<b>108</b>



# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Lesão renal: fundamentos epidemiológicos e clínicos

De acordo com estimativa da Associação Brasileira dos Centros de Diálise e Transplante, aproximadamente 15 milhões de brasileiros apresentam algum comprometimento renal, outros 100 mil estão em tratamento dialítico e 27 mil morrem anualmente em virtude de problemas renais (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CENTROS DE DIÁLISE E TRANSPLANTE, 2014). O censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011 e 2012, relata o gradual crescimento do número de pacientes em diálise - de 42.695, em 2000, 91.314 em 2011, a 97.586 em 2012 – assim como revela que a taxa anual de mortalidade correspondeu a 17,9% em 2010, 19,9% em 2011 e, 18,8% em 2012. A estimativa aponta para incremento anual de 8% na incidência de novos pacientes em diálise (média de 22 novos pacientes por dia) representando um importante problema de saúde pública (SESSO *et al.*, 2012; SESSO *et al.*, 2013).

Os avanços terapêuticos e tecnológicos mais atuais ainda não foram suficientes para amenizar o prognóstico de pacientes renais, especialmente os acometidos de insuficiência renal aguda que necessitam de tratamento dialítico contínuo e apresentam taxa de mortalidade superior a 50% (PONCE *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2012).

No cenário clínico, a Lesão Renal Aguda (LRA) é reconhecidamente grave e continua a ser enorme problema na prática médica, afetando cerca de 20% dos pacientes hospitalizados e 50% dos pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) (UCHINO *et al.*, 2005; POUKKANEN *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2014). É também uma condição recorrente no manejo de aloenxertos em pacientes sujeitos a transplante de rim. Além disso, LRA está fortemente associada com frequente utilização de recursos clínicos que envolvem uso de terapias de alta complexidade, maior tempo de permanência no leito hospitalar, sendo risco considerável para o desenvolvimento de Doença Renal Crônica (DRC) (CHAWLA *et al.*, 2011; BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012; ZENG *et al.*, 2014). Dependendo da gravidade, a LRA pode ocasionar várias complicações, incluindo acidose metabólica, hipercalemia, alterações no equilíbrio dos fluidos corporais e outros efeitos sistêmicos (AKSOY *et al.*, 2012).

A LRA revela-se complexa como síndrome clínica, repleta de etiologias múltiplas e variáveis, apresentando-se cada vez mais prevalente (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012; SINGBARTL; KELLUM, 2012). Caracteriza-se por redução abrupta do Ritmo de Filtração Glomerular (RFG; avaliado pela diminuição do *clearance* de creatinina) e retenção de produtos nitrogenados, como ureia e creatinina. Essas alterações ocorrem ou perduram por horas ou dias, resultando em diminuição do débito urinário (nem sempre presente) e disfunções na regulação do equilíbrio eletrolítico e ácido-básico (BRADY; SINGER, 1995; BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012; SINGH *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos relatam a existência de mais de 35 definições diferentes para LRA (SRISAWAT; KELLUM, 2011), fato que dificulta a comparação entre diagnóstico clínico e prognóstico. Historicamente, tal diversidade no diagnóstico e na classificação resultou na modificação da antiga terminologia Insuficiência Renal Aguda (conhecida pelo acrônimo IRA) para LRA. O termo IRA foi muitas vezes utilizado para definir pacientes que apresentaram súbito declínio na função renal. Entretanto, o espectro clínico dessa condição é bastante amplo, e a utilização do termo “Lesão” engloba desde a presença de estágios iniciais de lesão tecidual até a perda completa da função renal, exigindo terapia de substituição renal (EL SABBAHY; VAIDYA, 2011; SRISAWAT; KELLUM, 2011). Talvez por possuir definição diversa, a avaliação clínica de pacientes internados em UTI mostre que a incidência de LRA varie entre 11 e 67%, bem como a mortalidade oscile entre 13 e 69% (SRISAWAT; KELLUM, 2011; ZHOU *et al.*, 2015). Reforçando essa possibilidade, a revisão de Bellomo, Kellum e Ronco (2012) relata que a incidência da LRA varia de acordo com a definição adotada e com a população em diferentes regiões do mundo, variando de mais de 5000 casos/milhão de pessoas/ano para LRA sem necessidade dialítica a 295 casos/milhão de pessoas/ano para LRA com necessidade dialítica.

A adoção de critérios padronizados para diagnóstico de LRA é recente. Em 2004, o grupo *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) propôs o primeiro consenso de definição graduada para manejo de lesão renal aguda, os critérios RIFLE. A denominação RIFLE é acrônimo para *Risk* (risco de disfunção renal); *Injury* (lesão renal); *Failure* (falência da função renal); *Loss* (perda da função renal) e *End stage renal disease* (doença renal em estágio terminal). Os três primeiros (risco, lesão, falência) referem-se a critérios de diagnóstico e determinação da gravidade

da LRA e baseiam-se nos níveis séricos de creatinina e/ou diurese do paciente. Todavia, os dois últimos (perda da função e doença renal terminal) estão relacionados a critérios de evolução clínica do paciente e são determinados pela duração da perda da função renal. Em 2007, a *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) modificou os critérios RIFLE, e aumentou a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Em 2012, novas modificações foram propostas pelo grupo *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) baseada na definição AKIN. (BELLOMO *et al.*, 2004; MEHTA *et al.*, 2007; SRISAWAT; KELLUM, 2011; ZENG *et al.*, 2014).

São muitos os fatores que contribuem para a manutenção do quadro de lesão renal, dentre eles, destacam-se: instabilidade hemodinâmica, cirurgia vascular, hipovolemia, aterosclerose, diuréticos, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes mellitus, hipóxia, isquemia/reperfusão (I/R), pré-eclâmpsia/eclâmpsia, sepse, queimaduras graves e pancreatite (SINGH *et al.*, 2012). A associação desses fatores a complicações tais como sepse, hemorragias, cirurgias de alta complexidade e necessidade de diálise, aumentam o risco de agravamento do paciente e da LRA contribuindo para um índice aumentado de mortalidade, com variações de 37% a 88% (em particular quando diálise é necessária) (SCHWILK *et al.*, 1997). Segundo Singbartl e Kellum (2012) pacientes estão morrendo de LRA e não simplesmente com LRA, em particular os internados na UTI. De nosso principal interesse, daremos ênfase à LRA causada por isquemia/reperfusão.

## **1.2 E o papel da I/R na lesão renal aguda?**

Por definição, isquemia é a interrupção do suprimento de oxigênio e nutrientes para um dado tecido, durante determinado período de tempo, em decorrência da redução ou ausência de fluxo sanguíneo arterial (SCANELL, 1996; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Por sua vez, o termo reperfusão refere-se ao restabelecimento de fluxo sanguíneo ao tecido previamente isquêmico (ÉVORA *et al.*, 1996). Evidências clínicas e experimentais relacionam eventos que causam disfunções celulares e teciduais mediante subsequente perfusão de órgão isquêmico. Em conjunto são, por isso, denominadas lesões por I/R (EVORA *et al.*, 1996; YOSHIDA; HONMA, 2014).

Os rins são extremamente vulneráveis à isquemia, pois recebem aproximadamente 25% do débito cardíaco, apresentam elevado nível de atividade metabólica, complexidade de múltiplas vias enzimáticas, ações de enzimas de biotransformação, intensa capacidade de transporte endotelial, alta capacidade de reabsorção epitelial, e um alto consumo de oxigênio da medula externa (EL SABBAHY; VAIDYA, 2011; MUNSHI; HSU; HIMMELFARB, 2011). Se o aporte de sangue e/ou oxigênio ao tecido renal for insuficiente para manter a demanda metabólica, danos celulares e teciduais podem ocorrer, sendo responsáveis por deflagrar a instalação de lesão renal aguda. Tais danos podem ser evidenciados morfológicamente pela presença de necrose celular, acúmulo de cilindros hialinos intratubulares, e alterações na morfologia das células endoteliais glomerulares. Funcionalmente, retenção de resíduos de produtos metabólicos, desenvolvimento de uremia e comprometimento do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-básico podem surgir (BONVENTRE, 1988).

Assim, a I/R renal desempenha papel central na iniciação e estabelecimento da lesão renal aguda e contribui para 80 a 90% das etiologias renais (BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). Ocorre I/R em diferentes cenários clínicos, incluindo transplante renal, parada cardíaca, nefropatia induzida por meio de contraste, cirurgias renais, vasculares e sepse (GRENZ *et al.*, 2007; CONG *et al.*, 2012). Em pacientes sujeitos a transplante renal ou naqueles com rins nativos acometidos de alta morbidade, lesões por I/R afetam sobremaneira a sobrevida do enxerto ou mesmo a mortalidade, respectivamente (WANG *et al.*, 2011; WEVER *et al.*, 2011).

A fisiopatologia da lesão renal induzida por I/R envolve cascata complexa de eventos que não são limitados a alterações na hemodinâmica renal, mas incluem também dano tubular, recrutamento de mediadores inflamatórios e produção de espécies reativas de oxigênio (SUTTON; FISHER; MOLITORIS, 2002; CHU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014). Comprometendo a oferta de oxigênio e outros substratos essenciais para o metabolismo energético, a diminuição da perfusão renal pelo episódio isquêmico promove uma série de alterações vasculares e tubulares relacionadas com o desenvolvimento de LRA (BONVENTRE; WEINBERG, 2003).

Característica marcante da LRA é a redução do RFG, implicando por si em deficiência subjacente na regulação hemodinâmica. O fluxo sanguíneo renal é determinado pelo equilíbrio entre fatores que promovem vasoconstrição ou

vasodilatação, em especial nas arteríolas renais (BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). A isquemia contribui para a disfunção endotelial promovendo um desequilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação, resultando em exacerbação da resposta a agentes vasoconstritores (endotelina, angiotensina II, adenosina, leucotrieno, tromboxano  $A_2$ ) e diminuição a agentes vasodilatadores como acetilcolina, prostaglandinas, óxido nítrico e bradicinina. O deslocamento do balanço a favor da vasoconstrição, principalmente nas arteríolas aferentes e capilares glomerulares, reduz a área de filtração, o fluxo sanguíneo renal e consequentemente reduz o RFG (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; DEVARAJAN, 2006; BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012; YOSHIDA; HONMA, 2014).

Consequência adicional dos efeitos da I/R nos rins reside na diminuição da oferta de trifosfato de adenosina (ATP), elemento essencial ao funcionamento das células tubulares renais. As porções iniciais do néfron, o túbulo proximal, por exemplo, bem como, a alça ascendente espessa de Henle, apresentam alta demanda por esse composto, além de oxigênio, uma vez que expressam diversos mecanismos de transporte de substratos envolvidos com a habilidade renal de promover reabsorção, dentre outros processos de transporte tubular envolvidos com a fisiologia renal. Em condições de anaerobiose, esses segmentos tubulares possuem capacidade reduzida para obtenção de energia química na forma de ATP proveniente da glicólise (EL SABBAHY; VAIDYA, 2011; MUNSHI; HSU; HIMMELFARB, 2011; YOSHIDA; HONMA, 2014).

A diminuição dos níveis renais de ATP impõe outras consequências às células renais como a redução da atividade da bomba  $Na^+/K^+$ -ATPase, importante para a manutenção do gradiente eletroquímico que favorece indiretamente à reabsorção transepitelial de solutos, principalmente o  $Na^+$  (BONVENTRE, 1998; JIANG *et al.*, 2005; HUSSEIN *et al.*, 2012). Diminuindo-se a capacidade de reabsorver  $Na^+$ , aumenta-se a excreção fracional deste íon e, consequentemente, de outros solutos atrelados a ele. Por sua vez, menor reabsorção de solutos nos segmentos tubulares proximais, maior o aporte de solutos que chegam ao néfron distal e à mácula densa, promovendo ativação de mecanismos regulatórios que resultam em constrição das arteríolas aferentes e redução adicional do RFG (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; HUSSEIN *et al.*, 2012). Outras bombas, como a  $Ca^{2+}$ -ATPase, também ficam funcionalmente prejudicadas e, em geral, tais prejuízos nesses transportadores ocasionam acúmulo intracelular de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  e água, o

que pode levar a edema celular agudo, disfunção mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BONVENTRE, 1998; JIANG *et al.*, 2005; HUSSEIN *et al.*, 2012).

Além disso, pode ocorrer desestruturação do citoesqueleto pela redistribuição da actina do domínio apical e das microvilosidades com reorganização no citoplasma, desintegração da borda em escova das células epiteliais e desestabilização da membrana plasmática. Como resultado, fica comprometido o arranjo de proteínas claudinas envolvidas nas *tight junctions*, estruturas responsáveis pela natural resistência elétrica paracelular. A aderência das células tubulares à membrana basal fica fragilizada com a desestruturação celular, o que pode resultar em deslocamento e desarranjo tubular com consequente obstrução do fluxo luminal e perda das forças de Starling importantes ao balanço líquido nessas regiões. Além disso, perda da polaridade celular por translocação de proteínas integrinas e bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase da região basolateral para a superfície apical é outra repercussão da I/R (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; DEVARAJAN, 2006; BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012; HUSSEIN *et al.*, 2012).

Em resumo, diferentes mecanismos correlacionam dano tubular com redução da filtração glomerular como justificativa principal para o declínio do RFG como marcador da LRA: (i) injúria tubular compromete a reabsorção de sódio pelos segmentos tubulares proximais aumentando o aporte deste íon para o néfron distal e mácula densa, ativando o mecanismo de *feedback* túbulo-glomerular, com isso diminui o fluxo sanguíneo renal e o RFG por vasoconstrição das arteríolas aferentes com objetivo de reduzir a ultrafiltração e evitar perda de água e eletrólitos; (ii) restos de tecidos, células mortas e resíduos celulares produzem obstrução tubular em segmentos mais distais do néfron, reduzindo assim o RFG e a capacidade de excreção do rim. Além destes fenômenos, dano tubular e morte celular ativam células residentes que produzem mediadores pró-inflamatórios e vasoativos (citocinas e espécies reativas de oxigênio) que atuam de forma autócrina e parácrina para contrair células mesangiais e arteríolas. Estes, por sua vez, contribuem para manter filtração glomerular reduzida e amplificar os danos para diferentes estruturas renais. Todos os mecanismos descritos acima podem estar diretamente relacionados com mudanças que ocorrem nas células epiteliais tubulares renais (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012; SANCHO-MARTÍNEZ; LÓPEZ-NOVOA; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2015).

Em relação às células epiteliais tubulares, estudos experimentais relatam três possíveis destinos distintos após lesão renal aguda por I/R. Uma parte pode permanecer viável, demonstrando que não sofreram lesão ou apenas foram acometidas de lesão subletal e em seguida recuperadas, ou as células podem cursar para um estágio de morte por necrose ou apoptose. A necrose revela-se como um processo caótico resultando em perda da integridade da membrana, edema citoplasmático e fragmentação celular. Enquanto, a apoptose caracteriza-se por condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação do DNA, separação dos corpos apoptóticos que posteriormente serão fagocitados. Estes dois tipos de morte celular podem coexistir e parecem depender principalmente do quão intenso é o estímulo isquêmico e do quão resistente é a célula. Em lesões celulares mais graves, as porções proximais do néfron e a alça ascendente espessa de Henle ficam mais susceptíveis à necrose. Por outro lado, a apoptose ocorre após lesões mais leves e predomina nos segmentos menos sensíveis à isquemia, especialmente os túbulos distais (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; DEVARAJAN, 2006; SANCHO-MARTÍNEZ; LÓPEZ-NOVOA; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2015).

Danos no DNA e morte celular são consequências tardias em virtude da gama de proteínas que sofrem interferência funcional como proteases, óxido nítrico sintases, fosfolipases, cinases e endonucleases (BONVENTRE, 1998; JIANG *et al.*, 2005; HUSSEIN *et al.*, 2012). Muitas formas de LRA são caracterizadas pela morte de células epiteliais tubulares causando disfunção e ativação tubular. A necrose tubular aguda (NTA) é a causa mais frequente e caracteriza-se pela morte das células epiteliais tubulares além de disfunção de um ou vários segmentos tubulares. A disfunção de células tubulares decorrente de alterações letais ou subletais é o evento inicial em NTA levando à disfunção renal (ou seja, redução do RFG) e insuficiência renal (SANCHO-MARTÍNEZ; LÓPEZ-NOVOA; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2015).

Como descrito anteriormente, os principais achados histológicos que caracterizam lesão tubular em biópsia renal são perda da borda em escova nos segmentos tubulares proximais, descolamento das células epiteliais tubulares renais da membrana basal, dilatação tubular, formação de cilindros tubulares derivados a partir de células descamadas, detritos tubulares e proteína. Além disso, áreas de regeneração tubular podem ser visualizadas ao lado da área lesionada e evidenciadas pela presença de células tubulares com citoplasma basofílico e



núcleos hiper cromáticos e figuras de mitose em biopsias de pacientes com NTA (BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). Além dos danos causados por isquemia, sabe-se que a reperfusão pode causar dano adicional e agravar ainda mais a lesão principalmente por ocasionar o aumento da produção de EROs, acúmulo de íons, disfunção endotelial, agregação de plaquetas, ativação imune, durante a reoxigenação que, em conjunto, podem causar danos teciduais mais expressivos do que a própria isquemia (KOÇ *et al.*, 2014).

Nos últimos anos têm sido cada vez maiores as evidências da participação do componente inflamatório como evento crítico na lesão renal por I/R, dando ênfase a contribuição da lesão endotelial, a infiltração leucocitária e a geração de mediadores inflamatórios (GUELLER *et al.*, 2004; BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). Na fase inicial da I/R ocorrem disfunção e ativação do endotélio implicando em alteração no tônus vascular e, conseqüente aumento na permeabilidade capilar. A alteração na integridade da camada de células endoteliais da vasculatura renal ocasiona aumento da expressão de diferentes moléculas de adesão, tais como, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular (VCAM), E-selectina e P-selectina. Tais moléculas são cruciais, pois modulam a interação entre endotélio vascular e leucócitos, permitindo o extravasamento de leucócitos para o interior do tecido renal pós-isquêmico (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; GUELLER *et al.*, 2004; KINSEY; LI; OKUSA, 2008; BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). A interação leucócitos-endotélio é maior na medula que no córtex, demonstrando maior suscetibilidade a isquemia desta região do rim (BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012).

Fatores de transcrição, como fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), são ativados e induzem transcrição de citocinas e quimiocinas inflamatórias, intensificando assim o processo inflamatório (GUELLER *et al.*, 2004; YOSHIDA; HONMA, 2014). Durante a isquemia, as células endoteliais perdem suas propriedades antiaderentes e, portanto desenvolvem uma superfície trombogênica e adesiva tornando-se propensas a adesão de leucócitos e de plaquetas durante a reperfusão. Uma vez aderidos, os leucócitos podem: (i) prejudicar fisicamente o fluxo capilar, principalmente na medula renal; (ii) exacerbar a hipóxia nesta região; (iii) liberar agentes como EROs e/ou lípidos vasoativos, o que exacerba a vasoconstrição e aumenta a reação inflamatória local; (iv) contribuir para a lesão do parênquima celular, resultando em aumento da pressão dentro do lúmen tubular. Todos esses

fatores são parte de uma resposta inflamatória aguda que conduz a uma disfunção renal, resultando em redução adicional do RFG e eventual falência renal (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). Eventualmente, a maioria dos danos ocasionados por I/R podem ser revertidos caso a isquemia seja transitória e o restabelecimento do fluxo sanguíneo ocorra em curto período de tempo (GUELLER *et al.*, 2004).

### 1.3 Modelo experimental de lesão renal aguda por I/R

Considerando a complexidade da LRA, vários são os modelos experimentais empregados com objetivo de mimetizar suas condições clínicas (SINGH *et al.*, 2012). Em geral, os modelos animais de LRA induzida por I/R têm contribuído significativamente para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao início da insuficiência renal (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012; SINGH *et al.* 2012). Nesse contexto, as experiências com esses modelos animais (predominantemente em ratos ou camundongos) resultaram em um número considerável de publicações nos últimos anos (cerca de 43%) na *Kidney International* e *Nephrology Dialysis Transplantation* (HEYMAN; ROSENBERGER; ROSEN, 2010). Experimentalmente, a lesão por I/R pode ser estabelecida mediante oclusão da artéria renal ou do pedúnculo renal, podendo ser bilateral ou unilateral seguida de nefrectomia contralateral. Para este fim, utilizam-se tempos que variam entre 15 a 60 min de oclusão para, posteriormente, permitir-se o restabelecimento do fluxo sanguíneo (SINGH *et al.*, 2012). Em rim humano, a resposta hemodinâmica à agressão isquêmica é comparável à isquemia renal em ratos de aproximadamente 45 min seguidos de 24 h sob reperusão (SINGH *et al.*, 2012).

Entretanto, é importante destacar que o tempo de isquemia, o modo de oclusão (uni ou bilateral) e o momento da reperusão parecem determinar manifestações funcionais e estruturais renais variadas reproduzindo formas mais brandas ou mais severas da LRA (SKRYPNYK; HARRIS; DE CAESTECKER, 2013). É pertinente, ainda, um breve comentário sobre evidências que demonstram o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico na lesão renal induzida por I/R, doença renal crônica e transplante renal (HO; PANG; SZETO, 2015). O termo pré-condicionamento isquêmico significa indução de breves episódios transitórios de isquemia seguidos por pequeno período de reperusão antes de um insulto

isquêmico mais longo. Assim, impor o tecido a uma isquemia de menor extensão, o órgão parece ser condicionado a tolerar lesões maiores e potencialmente mais prejudiciais (HO; PANG; SZETO, 2015). O papel do pré-condicionamento isquêmico no aumento da tolerância à isquemia tem sido descrito em vários órgãos como coração, cérebro, medula espinhal, músculo esquelético, retina, fígado, intestino, além dos rins. Entretanto, o real fundamento envolvido no efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico não está ainda claramente resolvido (HO; PANG; SZETO, 2015).

A aplicabilidade e a viabilidade desses modelos experimentais são resultantes da similaridade dos efeitos vasculares, como vasoconstrição e diminuição da permeabilidade capilar, e efeitos tubulares, como obstrução e extravasamento, quando comparados com estudos obtidos de pacientes com LRA (LIEBERTHAL; NIGAM, 2000; HUSSEIN *et al.*, 2012). O modelo de LRA em ratos, devido à oclusão da artéria renal (OAR) caracteriza-se por extensa necrose nos túbulos proximais, sendo a duração da isquemia primordial para determinar a distribuição e a extensão da injúria tubular. Durante esse processo os segmentos mais distais dos néfrons são menos afetados, embora a área com maior lesão seja a alça de Henle. Outro achado importante é a presença de células apoptóticas no túbulo contorcido distal e ductos coletores (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012).

A necrose tubular aguda isquêmica (NTAi) em humanos é menos extensa, geralmente subletal e focal, afetando preferencialmente túbulos proximal e distal. Todavia, a necrose tubular em humanos e o modelo animal de OAR apresentam semelhanças patológicas e funcionais importantes. Assim como na NTAi, o modelo animal revela semelhanças patológicas que incluem lesão da borda em escova nas células do túbulo proximal, com predileção para ocorrência das lesões mais graves no segmento reto (dito S3) e a presença de elementos figurados na urina. Outras semelhanças funcionais incluem redução acentuada da filtração glomerular, embora de caráter reversível, pois na maioria dos casos de lesão tubular, ocorre com recuperação da função renal (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012).

A compreensão da diversidade de vias e mecanismos envolvidos na gênese da injúria renal passou a ser mais evidente através de modelos experimentais. A ativação local do sistema de coagulação, a infiltração de células inflamatórias no tecido renal, a lesão endotelial, bem como a participação de

moléculas de adesão e a produção de citocinas pró-inflamatórias começaram a ser descritas através de estudos em modelos animais de isquemia aguda induzida por oclusão da artéria renal (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012). Portanto, estudos provenientes de modelos experimentais com animais representam exemplo consistente de como o intercâmbio de ideias entre pesquisadores da área clínica e básica podem se complementar na compreensão da doença humana (LIEBERTHAL; NIGAM, 2000).

#### **1.4 Regulação do pH e acidose metabólica**

O rim é o principal órgão responsável pela regulação do equilíbrio ácido-básico, exercendo basicamente duas funções cruciais com esse propósito, a reabsorção do bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) luminal pelos túbulos proximais (80% - 85%) e a excreção de ácido equivalente à produção diária de ácidos não voláteis pelo néfron distal, o que corresponde à reabsorção adicional de  $\text{HCO}_3^-$  não luminal (FAROQUI; SHERIFF; AMLAL, 2006).

Manutenção fisiológica do pH arterial sistêmico entre 7,35 e 7,45 é necessária para que as células tenham condições compatíveis homeostáticas (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010). Considerando que as concentrações de íons  $\text{H}^+$  no líquido extracelular tenham valores reduzidos em condições fisiológicas, mesmo pequenas flutuações no pH podem ter efeitos importantes sobre a atividade de enzimas e proteínas celulares. A manutenção da concentração hidrogeniônica em faixa de variação estreita é conseguida através da existência de tampões intra e extracelulares, em conjunto com mecanismos reguladores respiratórios e renais, estes capazes de atuar em fases mais tardias, enquanto que os primeiros agem imediatamente à produção do ácido. Quimicamente, isso se traduz pelo controle fisiológico exercido minuto a minuto tanto para a pressão parcial de dióxido de carbono ( $\text{PCO}_2$ ) como para os níveis de  $\text{HCO}_3^-$ . Uma vez alcançado o equilíbrio, a relação química entre essas formas químicas  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  estabiliza o pH arterial por excreção ou retenção de ácido ou álcali, mantendo-se assim as variações normais dentro de faixa restrita para o pH corporal (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010; GOMEZ; KELLUM, 2015).

Por um lado, a  $\text{PCO}_2$  é regulada pela taxa de ventilação alveolar e, sendo assim, a hiperventilação aumenta a excreção de  $\text{CO}_2$  e consequentemente reduz a

PCO<sub>2</sub>, enquanto a hipoventilação diminui a excreção de CO<sub>2</sub>, aumentando PCO<sub>2</sub>. Embora não possua os requisitos químicos para ser caracterizado como um ácido em termos químicos, ressalta-se que, fisiologicamente, o CO<sub>2</sub> o é, pois age como um ácido no organismo por sua habilidade em combinar-se com água para formar o ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) de acordo com a seguinte reação:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010; GOMEZ; KELLUM, 2015). Por outro lado, o papel dos rins é o de reabsorver todo o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado e gerar novo HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> principalmente no ducto coletor, quando a escassez de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> na luz tubular proveniente da filtração é evidente. A reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado ocorre no túbulo proximal (85 - 90%), no ramo ascendente espesso da alça de Henle (10%) e o restante no néfron distal (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010). Reabsorver o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado é essencial para manter o equilíbrio ácido-base, pois excretar HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> na urina significa reter H<sup>+</sup> (ambos H<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sendo derivados da dissociação de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). A título de exemplo, uma dieta dita normal produz 50 - 100 mEq de H<sup>+</sup> por dia na forma de ácidos fixos, não voláteis, como o ácido sulfúrico e o ácido fosfórico (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010). Isso ocorre a partir do catabolismo de aminoácidos que contenham enxofre (como metionina e cisteína) ou do metabolismo de fosfolipídeos, ácidos nucleicos, fosfoglicerídeos e fosfoproteínas. Metabolização de carboidratos resulta principalmente em produção de ácidos voláteis caracterizada pela liberação de CO<sub>2</sub>. Assim produzidos, os íons H<sup>+</sup> são inicialmente tamponados por HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> no líquido extracelular (LEC) e outros tampões ácido-básicos em outros compartimentos corporais para minimizar a queda do pH extracelular. No entanto, o equilíbrio ácido-base é restaurado por excreção urinária de H<sup>+</sup>, que regenera o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> perdido na reação tampão inicial. Com efeito, a carga ácida da dieta é efetivamente excretada pela secreção de H<sup>+</sup> no túbulo coletor. No lúmen tubular, H<sup>+</sup> é combinado com HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (para formar H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, processo chamado de acidez titulável) ou com NH<sub>3</sub> (para formar NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Estes processos são de primordial importância em relação à manutenção do equilíbrio ácido-base, tendo em consideração a taxa extremamente baixa de excreção de H<sup>+</sup> livre (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010).

Em resumo, o corpo humano reage ao aumento da concentração de H<sup>+</sup> arterial por meio de quatro processos: tamponamento extracelular (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> é o tampão mais importante no fluido extracelular), tamponamento intracelular e osso, compensação respiratória e excreção renal de H<sup>+</sup>. Todavia, a ação inicial para restauração definitiva do equilíbrio ácido-base por meio da excreção renal do

excesso de  $H^+$  é desempenhada pelos três primeiros processos (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010).

Acidose metabólica é um dos distúrbios do equilíbrio ácido-base, sendo especialmente frequente em pacientes gravemente enfermos (KRAUT; MADIAS, 2010). Caracteriza-se por aumento na concentração de ácidos no líquido extracelular (LEC). Clinicamente, traduz-se em redução da concentração sérica de  $HCO_3^-$ , decréscimo da pressão parcial arterial de dióxido de carbono ( $PaCO_2$ ) e redução do pH sanguíneo (acidemia) (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010; KRAUT, 2011). É considerada multifatorial, ou seja, de etiologia complexa, variável com o tempo, o que ocasiona dificuldades na interpretação e no tratamento (O' DELL *et al.*, 2007).

A etiologia da acidose metabólica inclui muitos fatores causais, dentre eles: acidose láctica, cetoacidose, expansão rápida de volume com solução salina, insuficiência renal e outros (KELLUM; SONG; LI, 2004). A acidose metabólica pode estar presente em muitos pacientes que sofrem de LRA e está associada a maior mortalidade (ZHENG *et al.*, 2014). Além disso, ocorre em até 1/3 dos pacientes que são iniciados em terapia de substituição renal (HOSTE; DE CORTE, 2011).

Os principais mecanismos geradores de acidose metabólica são: perda excessiva de  $HCO_3^-$  pelo organismo (diarréia, acidose tubular renal), redução na excreção renal de ácidos (p. ex. na LRA), aumento na produção ou disponibilidade de ácidos (administração de ácido clorídrico ou precursores, cetoacidose, acidose láctica) (KRAUT; MADIAS, 2010; LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010). Se agudas, alterações pronunciadas do equilíbrio ácido-básico são potencialmente críticas e várias disfunções orgânicas podem se manifestar. Clinicamente, condições como edema cerebral, fraturas, decréscimo da contratilidade miocárdica, vasoconstrição pulmonar e vasodilatação sistêmica, dentre outras, são exemplos frequentes dessas repercussões (KRAUT; MADIAS, 2010).

Dependendo da duração, a acidose metabólica pode ser aguda (minutos a vários dias) ou crônica (semanas a anos) (KRAUT; MADIAS, 2010). Estudo realizado nos EUA mostra que a acidose metabólica aguda afeta cerca de 60% dos pacientes em UTI (KRAUT; MADIAS, 2010). Por outro lado, a acidose metabólica crônica é menos comum, apenas 1,9% das mais de 15 mil pessoas inquiridas no estudo NHANES III tiveram concentração sérica de  $HCO_3^-$  abaixo de 22 mmol/L, embora este valor alcance 19% em pacientes com RFG estimada ( $eGFR$ ) na faixa de

15 - 29 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Portanto, a ocorrência de acidose metabólica crônica pode estar envolvida com o aumento na ocorrência de DRC em nossa população e estudos em animais e em humanos confirmam essa relação (NATH; HOSTETTER; HOSTETTER, 1985; PHISITKUL *et al.*, 2008; DE BRITO-ASHURST *et al.*, 2009; KRAUT; MADIAS, 2011).

A literatura descreve a existência de correlação inversa entre gravidade da acidose metabólica e nível de função renal (KRAUT; KURTZ, 2005). Os efeitos da acidose metabólica aguda no organismo são razoavelmente conhecidos, ressaltando-se as complicações cardiovasculares. A ocorrência da disfunção cardiovascular depende do pH sanguíneo. A acidemia grave (pH < 7,1), através de atuações nas funções enzimáticas e no metabolismo protéico, inibe a contratilidade miocárdica, predispõe a arritmias graves, reduz a resistência vascular periférica, diminui a afinidade da hemoglobina ao oxigênio e provoca vasodilatação arteriolar e vasoconstrição do sistema venoso (KRAUT; MADIAS, 2010). Outro efeito adverso a ser considerado é o aumento da secreção de interleucinas pelos macrófagos e supressão da função do linfócito conduzindo resposta inflamatória aumentada e diminuição da resposta imune. As propriedades quimiotáticas e bactericidas dos leucócitos são alteradas pela acidose metabólica aguda, consequentemente os pacientes portadores desse distúrbio são mais suscetíveis a infecções. Em resposta à redução de pH, ocorre diminuição da ligação da insulina ao seu receptor, prejudicando a resposta celular. Ademais, a produção energética da célula é comprometida, pois a atividade da 6-fosfofrutoquinase, enzima com papel crítico na glicólise, é sensível a mudanças de pH (KRAUT; MADIAS, 2010).

Em contrapartida, a acidose metabólica crônica parece não apresentar efeito significativo sobre a função cardiovascular, embora ocorra um aumento da mortalidade em pacientes com DRC e níveis reduzidos da concentração sérica de bicarbonato (< 22 mmol/L) (KRAUT, 2011). Contudo as suas principais consequências são: aumento da degradação da proteína muscular com perda de massa muscular, produção e/ou exacerbação de doenças ósseas juntamente com retardo do crescimento em crianças (nanismo), redução na síntese de albumina resultando em hipoalbuminemia, tolerância à glicose deficiente por interferências com ações da insulina. De forma adicional a esses efeitos, a secreção e/ou ação de corticosteróides, hormônio da tireóide e paratireóide são alterados pela presença de acidose metabólica crônica. Além disso, a presença de evento inflamatório também

parece contribuir para amplificação dos efeitos adversos da acidose metabólica crônica (KRAUT; MADIAS, 2010). No âmbito renal, acidose metabólica pode reduzir o fluxo sanguíneo renal em voluntários humanos saudáveis (CHOWDHURY *et al.*, 2012).

Em resumo, a presença de acidose metabólica, aguda ou crônica, leva a uma série de efeitos adversos sobre a função celular além de contribuir para o aumento da morbidade e mortalidade (KRAUT; MADIAS, 2010).

### **1.5 Indução experimental de acidose metabólica com $\text{NH}_4\text{Cl}$**

Em 1921, Haldane foi o primeiro a descrever o efeito da ingestão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no balanço ácido-base. Desde então, a incorporação de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) em soluções oferecidas como água de beber a animais experimentais é protocolo padrão amplamente descrito na literatura para produção de acidose metabólica em modelos experimentais (ALLEYNE; SCULLARD, 1969; FELDMAN, 1989; FAROQUI; SHERIFF; AMLAL, 2006; BENTO *et al.*, 2007; NOWIK *et al.*, 2010). A acidose metabólica sistêmica produzida pela administração de solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  deriva da dissociação do cloreto de amônio nos tecidos em amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). Por conseguinte, o íon amônio  $\text{NH}_4^+$  dissocia-se em amônia ( $\text{NH}_3$ ) e hidrogênio ( $\text{H}^+$ ). Processo adicional de liberação de prótons se dará em virtude da absorção de  $\text{NH}_3$  e sua metabolização hepática em uréia e outros produtos. Também deve ser considerado o estímulo de secreções intestinais ricas em bicarbonato causado pela presença do sal de amônio na luz intestinal, o qual representa, efetivamente, aumento da quantidade de prótons aos líquidos corporais. Como resultado, a composição do líquido extracelular é alterada pelo aumento da produção de ácido no organismo, todavia o processo de excreção não sofre alteração criando um balanço positivo favorável para o desenvolvimento de acidose metabólica (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010).

### **1.6 Fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B)**

Um dos principais fatores pró-inflamatórios de transcrição envolvidos na lesão renal induzida por I/R é o NF- $\kappa$ B, que é encontrada no citosol de quase todas as células animais, em um estado inativo, devido à sua associação com a proteína



inibitória de subunidade  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Na LRA, o insulto isquêmico ativa o complexo NF- $\kappa$ B, promovendo a fosforilação da proteína I $\kappa$ B, etapa fundamental para sua degradação, resultando na liberação do NF- $\kappa$ B e permitindo assim, sua translocação para o núcleo e consequente ativação da transcrição de genes de fatores pró-inflamatórios, tais como as citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ ), moléculas de adesão (ICAM, VCAM, E-selectina), enzimas induzíveis (iNOS, COX-2), dentre outros (DONNAHOO *et al.*, 2000). De fato, LRA é caracterizada por uma intensa reação inflamatória no tecido renal e na circulação sistêmica e distúrbios do equilíbrio ácido-base também desempenham papel importante nesse contexto (HOSTE; DE CORTE, 2011).

A acidose metabólica aumenta a presença de moléculas inflamatórias na sepse experimental (KELLUM; SONG; ALMASRI, 2006). Além disso, pode aumentar a ligação do fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) ao DNA e liberação de mediadores inflamatórios (PEPPICELLI *et al.*, 2013). Outros eventos ocorrem durante indução de acidose metabólica. Bellocq *et al.* (1998) relataram que macrófagos incubados em meio ácido produziram mais nitrito e este efeito foi relacionado com a regulação positiva de RNA mensageiro da iNOS, via ativação do NF- $\kappa$ B.

Entretanto, o recrutamento de mecanismos inflamatórios parece depender do insulto e da intensidade da acidose, o que pode resultar em efeitos variáveis. Por exemplo, acidose hiperclorêmica e acidose láctica (duas formas comuns de acidose metabólica) são associadas a diferentes padrões de resposta imune em células RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS). Acidose hiperclorêmica induzida por ácido clorídrico (HCl) mostrou-se essencialmente pró-inflamatória por induzir aumento da razão IL-6/IL-10, da produção de óxido nítrico e da ligação do NF- $\kappa$ B ao DNA. Por outro lado, a acidose láctica apresenta um padrão anti-inflamatório devido à diminuição da produção de óxido nítrico, IL-6, IL-10 e ligação do NF- $\kappa$ B ao DNA (KELLUM; SONG; LI, 2004). Além disso, acidose hiperclorêmica moderada a severa induzida pela infusão de HCl resultou em aumento dos níveis circulantes de IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$  em ratos sépticos normotensos (KELLUM; SONG; ALMASRI, 2006). Esses achados demonstram a importância da presente investigação com um modelo de acidose e sua repercussão no perfil de ativação do NF- $\kappa$ B.

## 1.7 Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

No rim, o óxido nítrico (NO) desempenha papel importante em vários processos fisiológicos incluindo reabsorção de sais e fluidos, hemodinâmica renal, secreção de renina e o *feedback* túbulo-glomerular (ORTIZ; GARVIN, 2002). Por outro lado, o NO é reconhecidamente envolvido na gênese de várias patologias, dentre elas, a LRA isquêmica (BETZ *et al.*, 2012). O NO pode exercer tanto efeitos deletérios ou protetores dependendo da enzima geradora. Todas as três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) foram identificadas como sendo presentes no rim: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS), porém são diferencialmente expressas em todo o rim. Além disso, têm sido mostradas por estarem envolvidas em vários aspectos da I/R renal, embora talvez exista mais evidências para o papel das isoformas, endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (MITTERBAUER *et al.*, 2003; BETZ *et al.*, 2012). Estudos sugerem que o papel da NOS na LRA difere para as isoformas de NOS, tanto em relação à heterogeneidade anatômica na instalação da LRA como também na evolução temporal da LRA (KOMURAI *et al.*, 2003).

A expressão da eNOS no epitélio tubular tem sido relatada em vários segmentos do néfron como no túbulo proximal, no ramo ascendente espesso da alça de Henle, e nos ductos coletores corticais e medulares internos (UJIIE *et al.*, 1994; EVANS; FITZGERALD, 2005). Devido à sua elevada difusibilidade, o NO produzido em um dado segmento do néfron ou nos vasos renais pode afetar o funcionamento de estruturas circundantes (ORTIZ; GARVIN, 2002).

A via do óxido nítrico é alterada na LRA isquêmica resultante de uma reduzida expressão da eNOS no tecido renal e a correção desta alteração correlaciona-se com uma melhoria da função renal após lesão I/R (FOGLIENI *et al.*, 2006; BAE *et al.*, 2008; BETZ *et al.*, 2012). Dados indicam que os efeitos protetores renais devido ao pré-condicionamento isquêmico em lesão renal aguda por I/R são atribuíveis a produção de NO renal mediada pelo aumento da expressão da proteína eNOS após reperfusão (YAMASHITA *et al.*, 2003; YAMASOWA *et al.*, 2005).

## 1.8 Heme oxigenase-1 (HO-1)

A heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima expressa em baixos níveis em rins saudáveis (FERENBACH; KLUTH; HUGHES, 2010). Entretanto, sua indução ocorre como uma resposta adaptativa e benéfica para vários processos de sinalização de lesão celular, tendo sido implicada em diversos estados de doenças clinicamente relevantes, incluindo lesão renal aguda (MAINES *et al.*, 1993; NATH, 2013).

Na progressão da lesão renal aguda, observaram-se respostas teciduais protetoras associadas ao aumento da expressão da enzima HO-1 em modelo experimental de isquemia/reperfusão renal (MORIMOTO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2007; NATH, 2013). As proteínas heme sofrem desestruturação durante a lesão isquêmica resultando em liberação de heme, que são moléculas tóxicas para as células renais. Dessa forma, o efeito protetor da HO-1 parece estar associado, em parte, à sua habilidade de catalisar a degradação oxidativa do grupamento heme para monóxido de carbono (CO), ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e biliverdina (BV), sendo essa última posteriormente metabolizada em bilirrubina (BR) pela biliverdina redutase, e o  $\text{Fe}^{+2}$  rapidamente sequestrado pela ferritina. Esses produtos (CO,  $\text{Fe}^{+2}$ , BV) exercem importantes funções como citoprotetores, antioxidantes e anti-inflamatórios (NATH, 2013).

Em condições de acidose, Christou *et al.* (2005) demonstraram que células musculares lisas vasculares expostas a meio ácido (pH 6,8) aumentaram significativamente a expressão protéica e de RNAm para HO-1 em comparação ao meio fisiológico (pH 7,4). Esta indução é dependente de tempo, reversível e envolve mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Outros estudos descrevem que a indução de HO-1 promoveu efeito protetor contra danos neuronais após isquemia transitória da medula espinal em coelhos por melhorar o acúmulo de lactato 15 min após a reperfusão (JUNG *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2013) relataram que o efeito protetor da acidose hipercápnica em modelo de lesão pulmonar por I/R em ratos foi mediado em parte pela ação anti-inflamatória e anti-apoptótica da HO-1.

## 2 JUSTIFICATIVA

A LRA resulta de doenças graves em pacientes criticamente enfermos e contribui para elevar a taxa de mortalidade, consequência confirmada por vários estudos epidemiológicos (KRAUT; MADIAS, 2010; KRAUT, 2011; LIBÓRIO *et al.*, 2015). Constituem-se como parte integrante dos efeitos deletérios da LRA a hipercalemia, a acidose metabólica, a sobrecarga de volume e a hiponatremia. Distúrbios ácido-básico são considerados por si só um desafio clínico dada sua complexidade, especialmente quando são estabelecidos em pacientes acometidos de lesão renal. Vários fatores são complicadores adicionais dessa relação como a ocorrência de inflamação e infecção, agravando ainda mais a relação entre LRA e mortalidade (KRAUT; KURTZ, 2005; LIBÓRIO *et al.*, 2015).

Em geral, a maior parte dos estudos que investigam as consequências da LRA e sua associação com a mortalidade lançam mão de marcadores relacionados com características demográficas, comorbidades e severidade das doenças, mas a compreensão de suas relações com o metabolismo ainda podem ser consideradas escassas (LIBÓRIO *et al.*, 2015). Apesar dos estudos confirmarem os altos níveis de mortalidade, ainda não compreendemos bem o seu porquê. Neste contexto, existe a possibilidade de que a ocorrência de acidose metabólica seja resultado da LRA e, por isso, funcione como um fator complicador dessa injúria (KRAUT; KURTZ, 2005; KRAUT; MADIAS, 2010; CHAWLA *et al.*, 2011). Além disso, acidose metabólica e isquemia renal transitória podem ocorrer simultaneamente na prática clínica.

Precisamos saber se essa combinação pode ser prejudicial para os rins, e abordagens experimentais para avaliar o real impacto de um pH baixo sobre o estabelecimento de lesão renal isquêmica são necessárias. Apesar de existirem relatos na literatura sobre os efeitos da acidose metabólica ou da LRA, não encontramos abordagens em que essas condições sejam simultâneas, sendo elas potencialmente interessantes para correlacionar com seus aspectos clínicos. Essa compreensão pode oferecer maiores argumentos e estratégias sobre a natureza de tais distúrbios.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar o efeito da acidose metabólica induzida previamente ao estabelecimento da lesão renal aguda no modelo de isquemia/reperfusão em ratos.

#### 3.2 Específicos

No presente trabalho, para os animais submetidos simultaneamente a isquemia/reperfusão renal e acidose metabólica pretende-se:

- Avaliar a taxa de mortalidade, peso corporal e consumo hídrico;
- Estabelecer os parâmetros gasométricos e hemodinâmicos;
- Analisar a função renal;
- Estimar as alterações histológicas em tecidos renais;
- Averiguar a existência de alterações na expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) nos tecidos renais;
- Avaliar o papel da eNOS na regulação do tônus vascular da artéria renal;
- Investigar a expressão do fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) nos tecidos renais;
- Verificar a expressão da enzima heme-oxigenase (HO-1) nos tecidos renais.

## MATERIAL E MÉTODOS

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC número de protocolo 32/13) (ANEXO A). A manipulação dos animais antes e durante os experimentos obedeceu aos critérios éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela referida CEUA.

### **4.2 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 270 e 320 g (peso prévio ao tratamento) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina dessa Universidade. Os animais foram mantidos em condições padrão de laboratório (ciclo claro/escuro 12/12 h a 22-25°C), com livre acesso à água potável e ração padrão (Biotec®).

### **4.3 Indução de acidose metabólica**

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas durante cinco dias consecutivos. Os três primeiros dias foram dedicados à aclimação dos animais. A partir do segundo dia, a água de beber foi substituída por uma solução de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,28 M para indução de acidose metabólica (AM). A escolha da concentração da solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  baseou-se em protocolos bem estabelecidos na literatura com intuito de produzir uma acidose moderada (AMLAL *et al.*, 2001; FAROQUI; XERIFE; AMLAL, 2006; NOWIK *et al.*, 2010).

Após 48 h de ingestão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para a indução de isquemia renal, conforme descrito a seguir. Após a recuperação da cirurgia, os animais foram colocados novamente em gaiolas metabólicas, individualmente, e a ingestão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi mantida por um período adicional de dois dias. Os animais sham (controle) ingeriram apenas água

potável durante 5 dias e foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico porém sem indução de isquemia renal (ver abaixo). A ração padrão foi ofertada *ad libitum* para todos os animais durante os primeiros 4 dias de experimentação, exceto no período de 12 h antes dos procedimentos cirúrgicos de indução de I/R renal. No último dia, os animais foram mantidos em jejum. A ingestão de líquidos e o volume de urina foram medidos a cada 24 h.

Durante todo o período experimental as gaiolas metabólicas foram mantidas em uma sala com controle do ciclo claro-escuro (ciclo claro/escuro 12/12 h a 22-25°C).

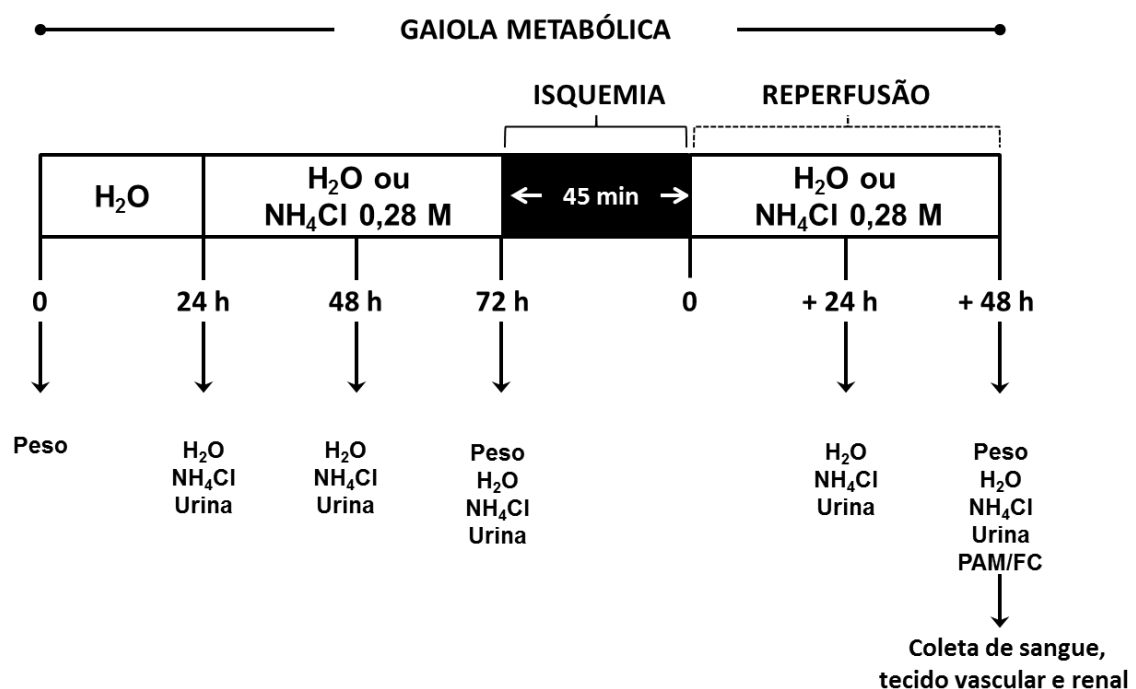
#### **4.4 Indução de lesão renal aguda por I/R renal**

Os animais foram submetidos a I/R renal de acordo com os procedimentos experimentais adaptados de estudos anteriores (WILLIAMS *et al.*, 1997; DORAI *et al.*, 2011;). Após 48 h da indução de acidose metabólica, os ratos foram pesados individualmente e anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, *i.p.*, Hypnol, Syntec, São Paulo, Brasil). Confirmado o plano anestésico (ausência de resposta ao toque da pata, aproximadamente 10 -15 min após injeção de pentobarbital), os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma manta térmica (37°C) de uso veterinário (Styllus Term, São Paulo, Brasil) e submetidos à tricotomia e assepsia com álcool iodado na região abdominal. A temperatura corporal dos ratos foi controlada durante todo o procedimento cirúrgico com auxílio de um termômetro digital retal (TS-101PM, Techline®, São Paulo, Brasil). Após laparotomia, as alças intestinais foram cuidadosamente afastadas e envolvidas com gaze estéril umedecida com solução salina 0,9% (37°C). Exposto o retroperitônio, as artérias renais foram identificadas e cuidadosamente isoladas e a isquemia renal foi induzida pela oclusão bilateral das artérias renais com *clamp* vascular não traumático por 45 min. A eficácia do clampeamento foi certificada por inspeção visual por ocorrência de escurecimento rápido e progressivo da superfície serosa renal. Durante o período de isquemia renal, as alças intestinais foram reposicionadas na cavidade abdominal e umedecidas com solução salina 0,9% (37°C) e a parede abdominal foi suturada em uma camada para diminuir a perda de fluido e temperatura. Após 45 min, os *clamps* foram removidos e o restabelecimento da perfusão renal foi visualizado pela recuperação gradual da coloração normal do



rim. Por fim, a incisão abdominal foi suturada com fios de seda tamanho 4-0 (Point Suture<sup>®</sup>, Fortaleza, Brasil) em duas camadas (muscular e pele) e finalizada com álcool iodado. Nos casos em que a reperfusão não foi observada mesmo com a liberação do *clamp*, o animal foi descartado do estudo sendo rapidamente eutanasiado com pentobarbital (100 mg/kg, *i.p.*). Os animais foram mantidos sob aquecimento (manta térmica) até completa recuperação da anestesia. Na sequência, foram devolvidos para as suas respectivas gaiolas metabólicas. Quarenta e oito horas após a indução de isquemia renal (período de reperfusão), os ratos foram novamente pesados e anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg, *i.p.*), e a pressão arterial média foi medida durante 20 min por meio de um cateter inserido na artéria carótida e conectado ao transdutor de pressão ligado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab ADInstruments, Lab Chart Pro 7.3). A frequência cardíaca foi estimada a partir do registro da pressão arterial pulsátil. Amostras de sangue foram coletadas a partir do cateter em uma seringa heparinizada para a análise gasométrica e da função renal. O rim esquerdo foi removido para avaliação histológica e de imunofluorescência. Finalmente, os animais foram eutanasiados com overdose de pentobarbital de sódio (100 mg/kg, *i.p.*) A Figura 1 ilustra o delineamento esquemático do protocolo experimental utilizado nesse estudo.

**Figura 1-** Representação esquemática do protocolo experimental



#### 4.5 Grupos Experimentais

A Figura 2 mostra a distribuição dos animais nos seguintes grupos experimentais de acordo com a descrição abaixo:

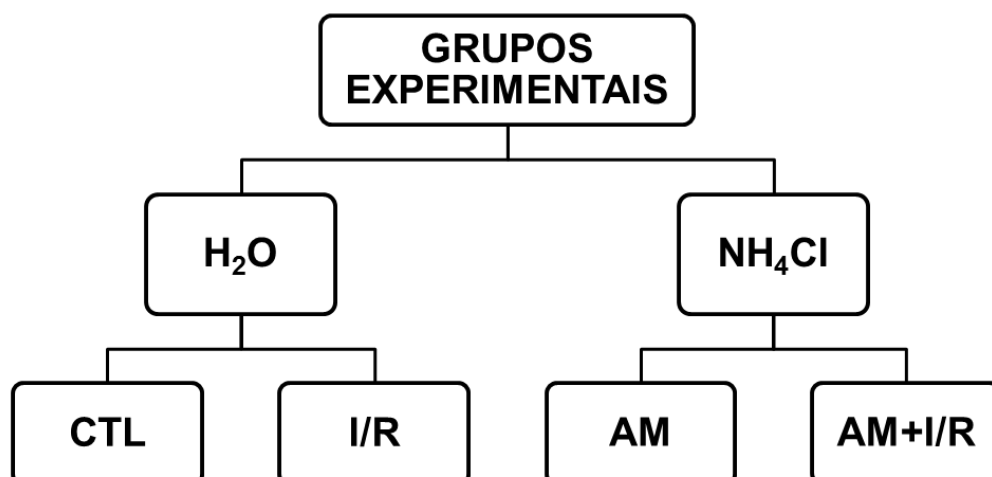
**Grupo Sham (CTL; n = 8):** animais com livre acesso à água potável durante todo o período experimental (5 dias) e submetidos ao procedimento cirúrgico sham (sem clampeamento bilateral da artéria renal).

**Grupo Isquemia/Reperusão (I/R; n = 8):** animais com livre acesso à água potável durante todo o período experimental (5 dias) e submetidos ao clampeamento bilateral da artéria renal por 45 min, seguido de reperusão (48 h).

**Grupo Acidose Metabólica (AM; n = 6):** animais com livre acesso à solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M 48 h antes e 48 h após o procedimento cirúrgico sham (sem clampeamento bilateral da artéria renal).

**Grupo Acidose Metabólica + Isquemia/Reperusão (AM+I/R; n = 9):** animais com livre acesso à solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M 48 h antes e 48 h após o clampeamento bilateral da artéria renal por 45 min, seguido de reperusão (48 h).

**Figura 2** – Representação esquemática dos grupos experimentais



#### 4.6 Parâmetros biológicos

O peso, em gramas, dos ratos foi verificado imediatamente antes do início do período de ambientação na gaiola metabólica, no dia do procedimento cirúrgico (I/R) e no dia do sacrifício, a fim de avaliar as médias de perda de peso dos ratos entre os tempos no período experimental, analisando as possíveis variações entre os animais tratados com solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e os que receberam somente água *ad libitum*, como também os ratos submetidos à I/R sob tratamento com solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e os que foram submetidos somente à I/R.

O consumo de água ou solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e o volume de urina foram medidos por meio de proveta graduada em intervalos de 24 h durante todo o período experimental (5 dias).

Avaliou-se, ainda, a mortalidade, desde o início da indução de acidose metabólica até o dia do sacrifício, conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ Mortalidade} = 100 - \% \text{ VB}$$

Sendo:

$$\% \text{ VB (viabilidade)} = \frac{\text{número de ratos vivos (final)}}{\text{número de ratos vivos (inicial)}}$$

#### 4.7 Parâmetros gasométricos

As amostras de sangue arterial foram coletadas em seringas plásticas previamente heparinizadas (10  $\mu\text{L}$  de heparina sódica 5000 UI e 90  $\mu\text{L}$  de soro fisiológico 0,9%) e imediatamente vedadas com tampas adaptáveis ao bico da seringa para manutenção da anaerobiose. As amostras foram processadas em analisador de gases sanguíneos (COBAS B 121, Roche<sup>®</sup>, Mannheim, Alemanha) para obtenção dos seguintes parâmetros: pH, pressão parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{PCO}_2$ ), excesso de bases (SBE), bicarbonato plasmático (pBic), hematócrito (Hct) e osmolalidade (Osm). O intervalo entre a coleta e a realização do exame gasométrico não ultrapassou 15 min e as seringas foram acondicionadas em recipiente com bolsa de gelo em gel, tomando-se o devido cuidado para que ficassem localizadas sobre a bolsa, evitando congelamento.

#### 4.8 Avaliação da função renal

A função renal dos animais foi avaliada por meio da medida dos níveis plasmáticos de creatinina e ureia. Após a gasometria, o sangue foi centrifugado (3500 rpm/10 min a 4°C) para obtenção do plasma, e imediatamente resfriado e acondicionado a -80°C para estudos posteriores de mensuração de creatinina, ureia e eletrólitos (sódio, potássio e cloreto). Amostras de urina de 24 h foram colhidas em frascos protegidos da luz sob óleo mineral à temperatura ambiente (22 - 25°C). Após remoção do óleo, as amostras de urina foram centrifugadas (3000 rpm/5 min) e o pH medido imediatamente, usando-se um pHmetro digital (MD-10, Marte, São Paulo, Brasil) e, subsequentemente armazenadas a -80°C para posterior dosagens de creatinina, ureia e eletrólitos (sódio, potássio e cloreto). A mensuração da ureia plasmática e urinária se deu por técnica enzimático-colorimétrica seguindo o método descrito pelo *kit* do fabricante LABTEST (URÉIA CE). A creatinina plasmática e urinária foi determinada pelo método colorimétrico (Picrato alcalino - Jaffé) de acordo com o *kit* do fabricante LABTEST (CREATININA K). A dosagem da creatinina plasmática e urinária permitiu a avaliação da filtração glomerular por meio da metodologia do *clearance* de creatinina (ClCr). O cálculo do *clearance* de creatinina (ClCr) foi obtido conforme fórmula abaixo (MARTINEZ-MALDONADO; OPAVA-STITZER, 1978):

$$ClCr = \frac{\text{Creatinina urinária} \left( \frac{mg}{dL} \right) \times \text{fluxo urinário} \left( \frac{mL}{min} \right)}{\text{Creatinina plasmática} \left( \frac{mg}{dL} \right)}$$

Os resultados foram apresentados como valores ajustados por 100 g de peso corporal dos animais conforme classicamente aplicado nesses modelos.

As concentrações plasmática e urinária de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cloreto (Cl<sup>-</sup>) foram medidas em analisador de eletrólitos modelo 9180 (Roche®, Brasil) pelo método eletrodo íon seletivo. A partir dos valores de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> plasmático e urinário, foi calculada a fração de excreção desses íons (FE) por meio da fórmula a seguir (MARTINEZ-MALDONADO; OPAVA-STITZER, 1978):

$$FE_{Na^+} = \frac{Na^+ \text{ urinário } \left( \frac{mmol}{L} \right) \times Creatinina \text{ plasmática } \left( \frac{mg}{dL} \right)}{Creatinina \text{ urinária } \left( \frac{mg}{dL} \right) \times Na^+ \text{ plasmático } \left( \frac{mmol}{L} \right)} \times 100$$

#### 4.9 Avaliação histopatológica do tecido renal

O rim esquerdo foi imerso em solução de formol tamponado 10% durante 24 h e, em seguida transferido para solução de álcool 70%. Posteriormente, o material foi enviado para o Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para a realização do processamento histológico. Após inclusão em parafina, secções de 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e observadas por microscopia óptica (ampliação 400x) para avaliar a presença de necrose tubular, dilatação tubular, atrofia tubular, formação de cilindros, infiltração de células inflamatórias e edema celular no interstício tubular. Para avaliação da extensão da área de lesão tubular, 10 campos não sobrepostos foram selecionados aleatoriamente no córtex renal e medula externa de cada animal de modo cego por dois avaliadores. O dano histológico foi expresso como uma percentagem da área tecidual afetada em amostras de rim, utilizando uma escala semi-quantitativa: 1 (área afetada < 10%), 2 (área afetada 10 - 25%), 3 (área afetada 26 - 50%), 4 (área afetada 51 - 75%), e 5 (área afetada > 75%) (PARK, Y. *et al.*, 2008).

#### 4.10 Expressão de eNOS, NF-κB, HO-1 por imunofluorescência

Secções com 4 µm de espessura foram desparafinizadas, hidratadas, submetidas à recuperação antigênica (tampão citrato de sódio 0,1 M; pH 6,0; 18 min; 98 °C), incubadas em solução de PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS/BSA 5%) contendo 0,1% de Triton X-100 durante 10 minutos à temperatura ambiente, e, posteriormente, bloqueadas com glicina 0,5 M em BSA 5% por 30 min. Decorrido o período de bloqueio das ligações inespecíficas, estas secções foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos primários ([eNOS; *rabbit polyclonal*; sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; diluição 1:200], NF-κB [*rabbit polyclonal*; sc-114, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; diluição 1:200], e HO-1 [*goat polyclonal*; sc-1796, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA;

diluição 1:200]) previamente diluídos em PBS/BSA 5%, *overnight* a 4°C, em câmara úmida. Subsequentemente, foram realizadas lavagens em PBS, e os cortes incubados durante 90 min com os anticorpos secundários (Alexa Fluor 568 *conjugated to anti-rabbit IgG antibody* [1:400, Invitrogen, A10042] ou Alexa Fluor 594 *conjugated to anti-goat IgG antibody* [1:400, Invitrogen, A11058]) à temperatura ambiente em câmara úmida, protegidos da luz. Os controles negativos da reação foram cortes de tecido processados conforme descrição acima, e incubados em PBS/BSA ao invés do anticorpo primário. Finalmente, os núcleos foram corados com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), e as secções observadas em microscópio confocal de varredura a laser (LSM 710, Zeiss, Munique, Alemanha).

Para cada animal, foram capturadas imagens de, pelo menos, dez campos da região cortical e medular externa. A intensidade de fluorescência foi analisada através do *software* FIJI – Image J® e os resultados expressos como percentagem do número de *pixels* da área demarcada em relação à área total capturada.

#### 4.11 Avaliação da reatividade vascular em artérias renais

Para os experimentos *in vitro* foram utilizados adicionalmente 22 ratos Wistar machos divididos entre os grupos CTL (n = 6), I/R (n = 6), AM (n = 5) e AM+I/R (n = 5). No último dia do experimento, os animais foram eutanasiados conforme descrição anterior e o ramo principal da artéria renal esquerda removido para avaliação do efeito vasorrelaxante dependente do endotélio induzidos por acetilcolina (ACh). Após remoção, a artéria renal foi transferida imediatamente para uma placa de Petri contendo solução fisiológica (Krebs-Henseleit) oxigenada. Foram obtidos quatro anéis (1,5 – 2 mm) livres de tecido conjuntivo e adiposo, de cada segmento arterial. Os anéis de artéria renal foram montados horizontalmente no sistema para vasos (Miógrafo 610 M-DMT, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dinamarca). Pela luz do vaso foram passados dois fios de tungstênio (40 µm), sendo um dos fios fixado a um micrômetro para ajustes de tensão, e o outro conectado a um transdutor de força para medida de contração isométrica (Figura 3). Cada anel foi colocado em cubas para banho de tecidos isolados contendo solução de Krebs-Henseleit (concentração em mM: NaCl 118; KCl 4,7; MgSO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25 e glicose 11,1) aerada continuamente com mistura carbogênica

(95% de  $O_2$  - 5% de  $CO_2$ ; pH 7,4) e mantida a 37° C. As preparações foram estabilizadas durante 1,5 h sob uma tensão constante de 5 mN (MICHEL; MAN; VANHOUTTE, 2007). Para evitar a interferência de prováveis metabólitos, a solução fisiológica foi trocada a cada 15 min durante o período de estabilização das artérias. Antes de iniciar os experimentos, a capacidade contrátil de cada segmento foi testada com 60 mM  $K^+$  até a observação de duas contrações de amplitude semelhante reproduzíveis. A presença do endotélio funcional foi verificado pelo relaxamento  $\geq 60\%$  na presença de 1  $\mu M$  ACh (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em anéis pré-contraídos com 1  $\mu M$  de fenilefrina (FE; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Em seguida, curvas concentração-efeito foram construídas para ACh (0,01 - 30  $\mu M$ ) sobre a fase tônica da contração induzida por 1  $\mu M$  FE.

**Figura 3** – Representação esquemática do sistema para vasos de resistência isolados (miógrafo) com preparação da artéria renal



As figuras não estão em escala.

Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI)

#### 4.12 Análise Estatística

Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As comparações entre grupos foram realizadas pelo teste *t* de Student pareado e análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelos testes Student-Newman-Keuls ou Holm-Sidak conforme apropriado. Todas as análises estatísticas foram feitas através do programa GraphPad Prism versão 5.0 e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



RESULTADOS

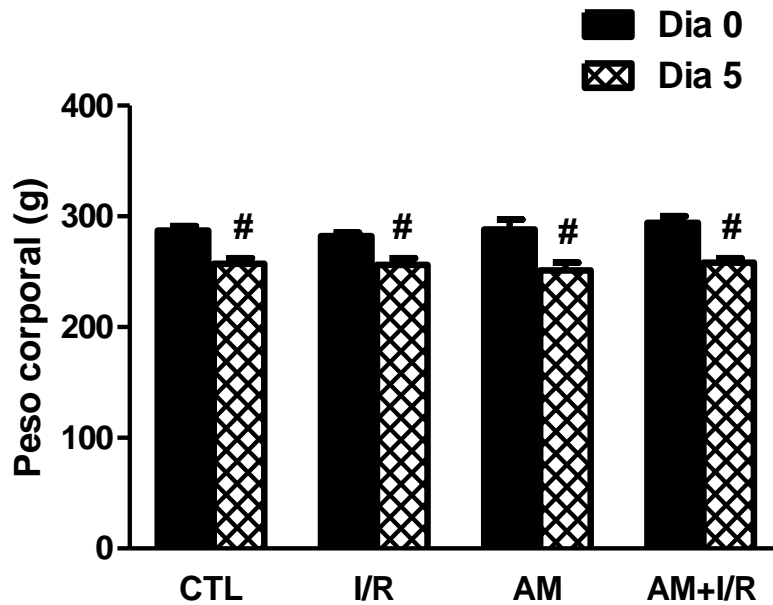
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros biológicos

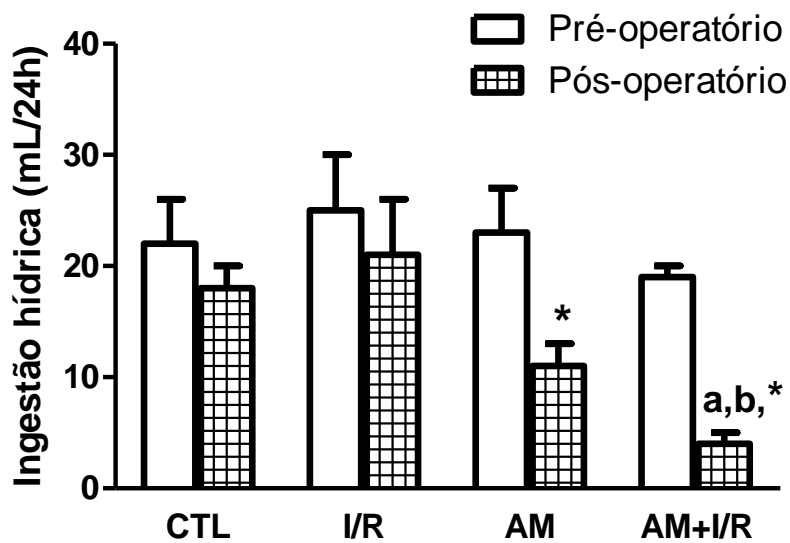
A Figura 4 resume os valores médios de peso e ingestão hídrica nos quatro grupos experimentais. O peso corporal dos animais no início do período experimental não revelou diferença significativa ( $p > 0,05$ ; ANOVA) entre os grupos estudados (CTL:  $287 \pm 4$  g; I/R:  $282 \pm 3$  g; AM:  $288 \pm 9$  g, AM+I/R:  $294 \pm 6$  g; Figura 4A). Porém, todos os animais apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) do peso corporal após 5 dias de período experimental, mas sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. Na avaliação da ingestão de líquidos verificamos que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos em relação ao volume líquido ingerido no período pré-operatório (Figura 4B). Apenas os animais que ingeriram a solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do volume ingerido no pós-operatório, sendo exacerbado pela combinação com o insulto isquêmico ( $p < 0,05$ ; Figura 4B). Durante o período experimental, dez ratos foram a óbito, sendo 1 do Grupo I/R (11% de mortalidade) e 9 do Grupo AM+I/R (50% de mortalidade), principalmente entre 12 e 24 h após o procedimento cirúrgico. Os dados coletados a partir destes animais não foram incluídos no presente estudo. Não houve morte nos grupos CTL e AM sob nossas condições experimentais. Dessa forma, ao término do período experimental os grupos CTL, I/R, AM e AM+I/R ficaram com 8, 8, 6 e 9 animais respectivamente.

**Figura 4** - Parâmetros biológicos de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal

**A**



**B**

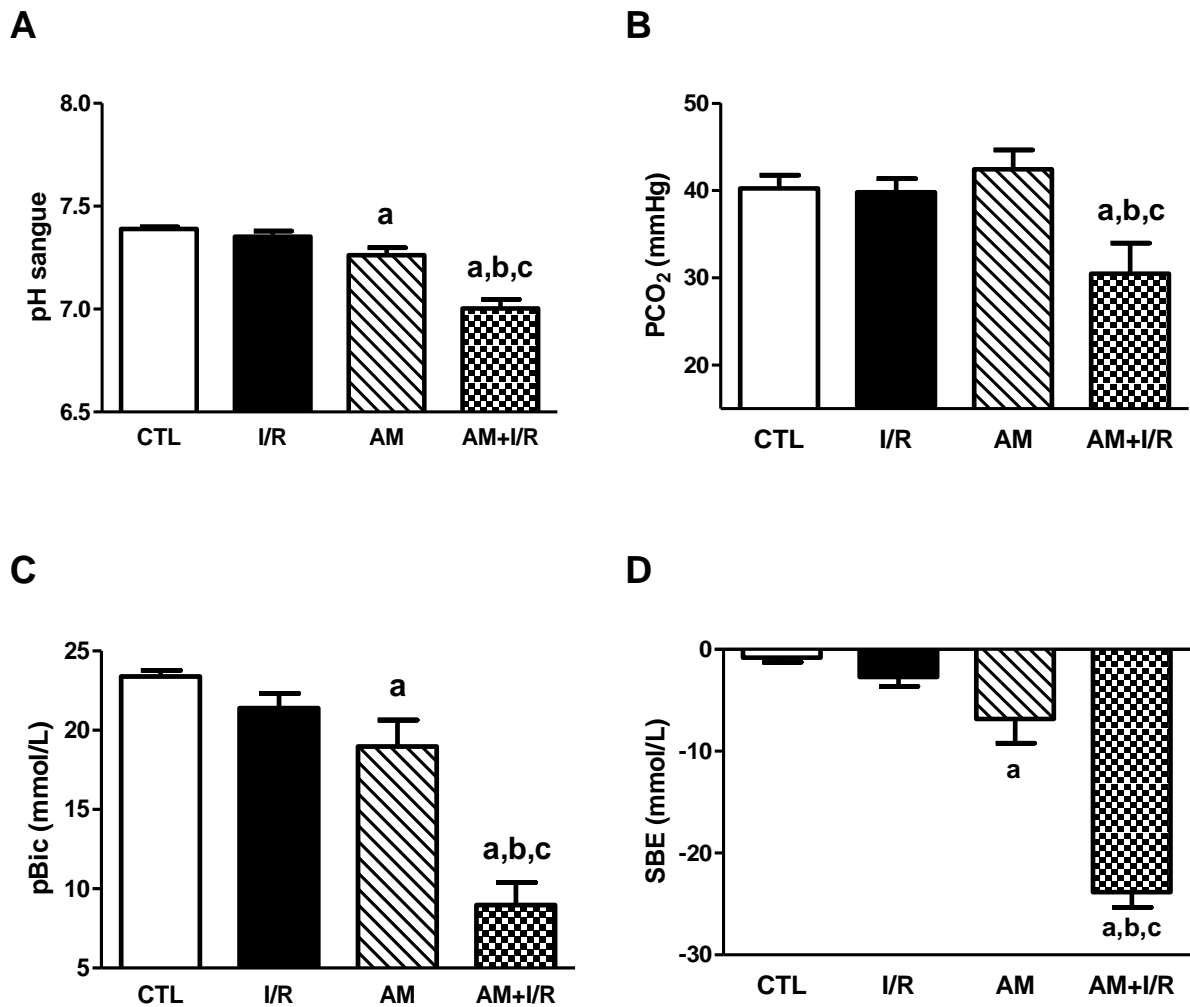


CTL, controle (cirurgia sham); I/R, insulto de isquemia/reperfusão renal (água potável e isquemia bilateral por 45 min); AM, acidose metabólica (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e cirurgia sham) e AM+I/R, acidose metabólica + insulto de isquemia/reperfusão renal (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e isquemia bilateral por 45 min). Os dados são média  $\pm$  EPM do ultimo dia do experimento. <sup>a</sup> $p$  < 0,05 vs. CTL; <sup>b</sup> $p$  < 0,05 vs. I/R (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls); <sup>#</sup> $p$  < 0,05 vs. Dia 0; <sup>\*</sup> $p$  < 0,05 vs. pré-operatório (teste  $t$  de Student pareado).

## 5.2 Parâmetros gasométricos e hemodinâmicos

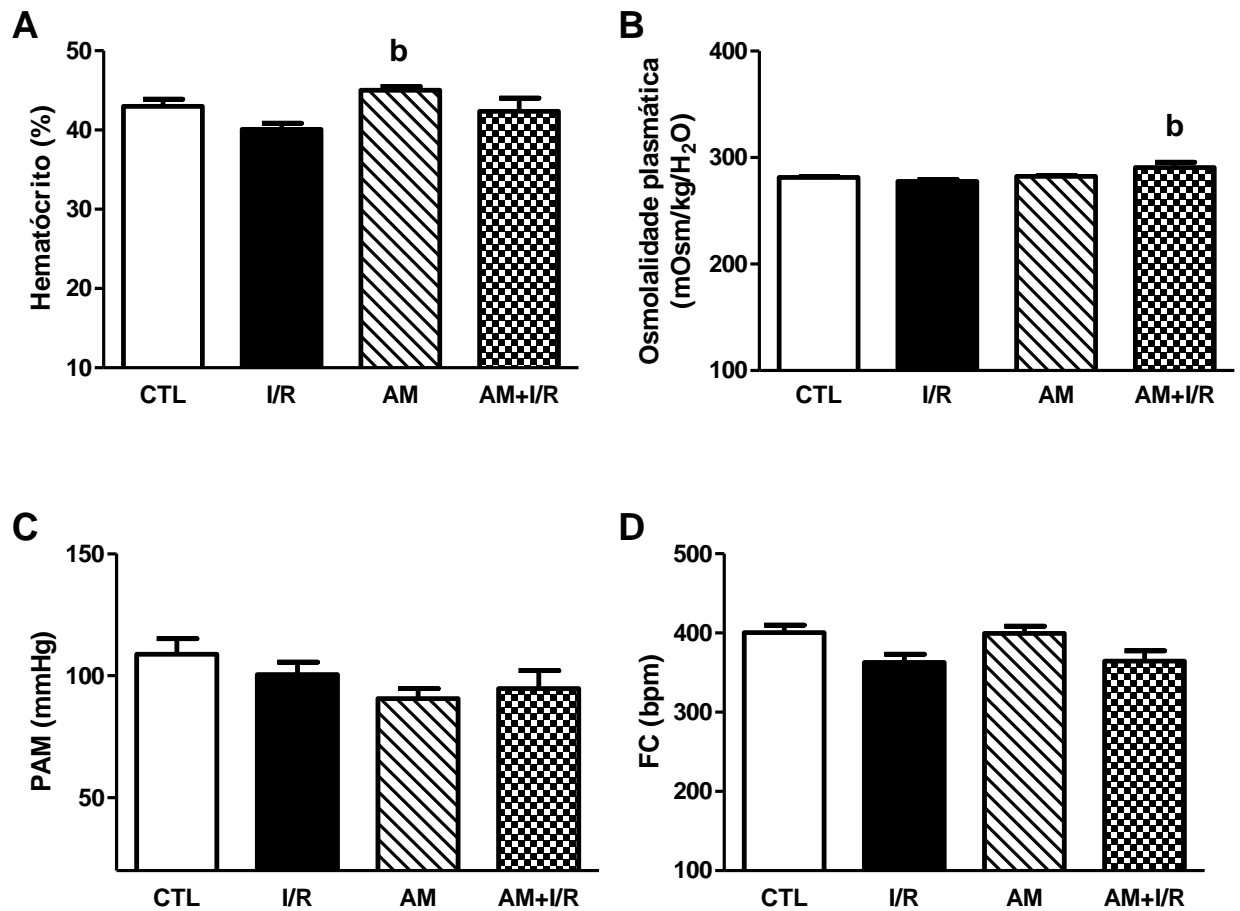
As Figuras 5 e 6 apresentam os resultados dos parâmetros gasométricos e hemodinâmicos. Em todos os animais, os parâmetros foram determinados 48 h após insulto isquêmico ou a falsa isquemia. Os valores de pH sanguíneo arterial,  $\text{PCO}_2$ , pBic e SBE do grupo I/R não revelaram diferença significativa em relação aos mesmo valores coletados para os animais do grupo CTL ( $p > 0,05$ ; Figura 5). Conforme esperado, os ratos submetidos somente à sobrecarga ácida ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M) apresentaram redução significativa dos valores de pH sanguíneo arterial ( $7,27 \pm 0,04$  vs.  $7,39 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ), pBic ( $19,0 \pm 1,7$  vs.  $23,4 \pm 0,4$  mmol/L;  $p < 0,05$ ) e SBE ( $-6,8 \pm 2,4$  vs.  $-0,8 \pm 0,5$  mmol/L;  $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo CTL (Figura 5). Contudo, a redução dos parâmetros acima citados foi ainda mais evidente nos animais do grupo AM+I/R ( $p < 0,05$ ; Figura 5). Em relação ao hematócrito, observou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) apenas entre o grupo AM *versus* I/R (Figura 6A). A osmolalidade plasmática, por sua vez, aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) apenas no grupo AM+I/R quando comparado ao grupo I/R (Figura 6B). Referente à PAM e FC, não houve alteração significativa entres os grupos estudados ( $p > 0,05$ ; Figura 6, C e D).

**Figura 5** - Parâmetros gasométricos de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal



CTL, controle (cirurgia sham); I/R, insulto de isquemia/reperfusão renal (água potável e isquemia bilateral por 45 min); AM, acidose metabólica (solução de NH<sub>4</sub>Cl 0,28 M e cirurgia sham) e AM+I/R, acidose metabólica + insulto de isquemia/reperfusão renal (solução de NH<sub>4</sub>Cl 0,28 M e isquemia bilateral por 45 min). Os dados são média  $\pm$  EPM do ultimo dia do experimento. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. CTL; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. I/R; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. AM (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls); PCO<sub>2</sub>, pressão parcial de dióxido de carbono; pBic, bicarbonato plasmático; SBE, excesso de base.

**Figura 6** - Parâmetros hemodinâmicos de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal



CTL, controle (cirurgia sham); I/R, insulto de isquemia/reperfusão renal (água potável e isquemia bilateral por 45 min); AM, acidose metabólica (solução de NH<sub>4</sub>Cl 0,28 M e cirurgia sham) e AM+I/R, acidose metabólica + insulto de isquemia/reperfusão renal (solução de NH<sub>4</sub>Cl 0,28 M e isquemia bilateral por 45 min). Os dados são média  $\pm$  EPM do ultimo dia do experimento. <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. I/R (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls); PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.

### 5.3 Avaliação da função renal

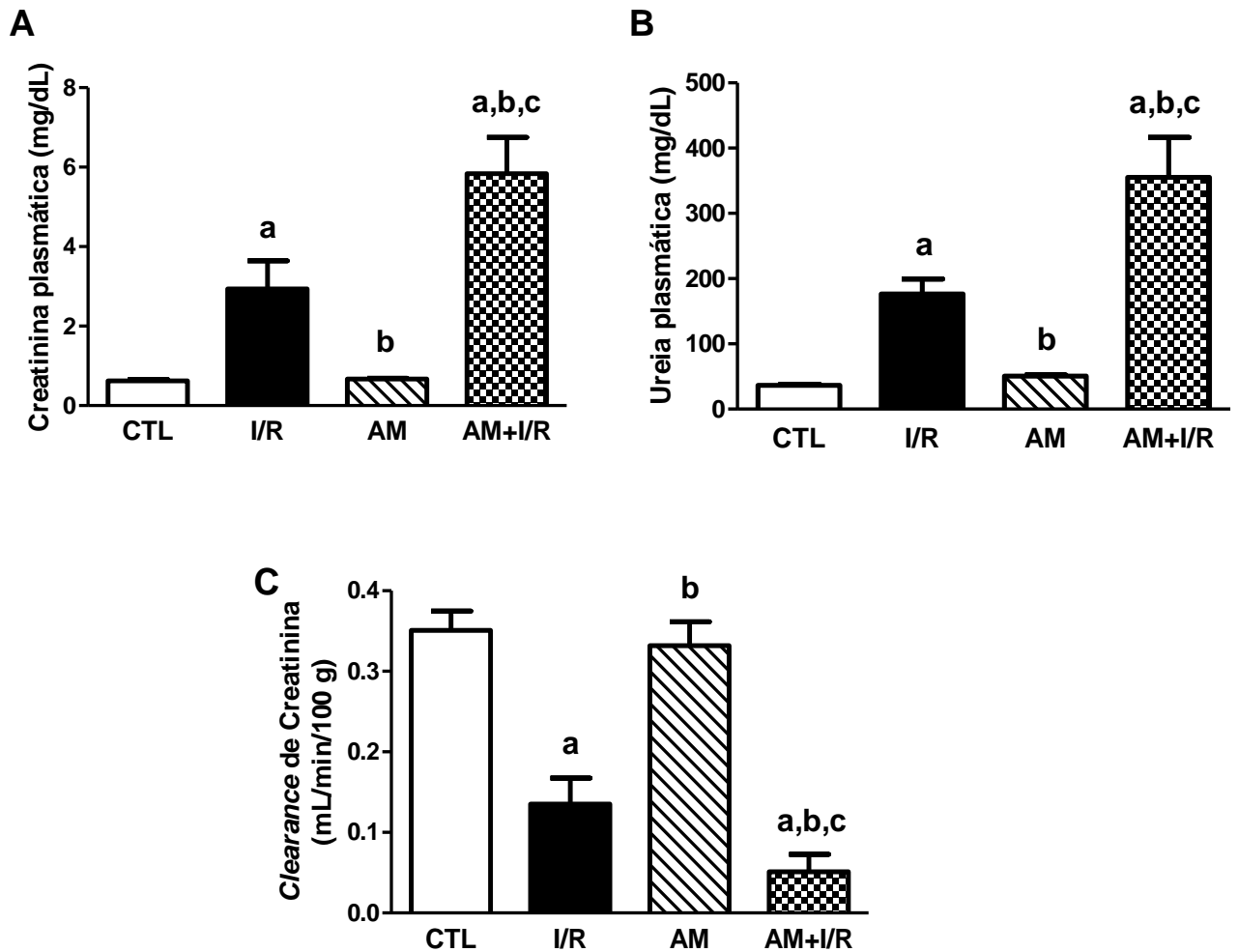
Nas Figuras 7, 8 e 9 constam os resultados dos parâmetros bioquímicos. Em todos os animais, esses parâmetros foram determinados 48 h após o insulto isquêmico ou procedimento de falsa isquemia. Os animais submetidos à lesão renal aguda por I/R apresentaram elevação significativa nas concentrações plasmáticas de creatinina ( $2,9 \pm 0,7$  vs.  $0,6 \pm 0,03$  mg/dL,  $p < 0,05$ ; Figura 7A) e ureia ( $176,4 \pm 22,9$  vs.  $36,5 \pm 1,6$  mg/dL,  $p < 0,05$ ; Figura 7B) acompanhado de significativa queda no ritmo de filtração glomerular, representado pela redução no ClCr, quando comparado aos valores observados para animais CTL ( $0,14 \pm 0,03$  vs.  $0,35 \pm 0,02$  mL/min/100 g,  $p < 0,05$ ; Figura 7C). Entretanto, a ingestão de solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M durante todo o período experimental não promoveu alterações significativas ( $p > 0,05$ ) na função renal dos animais do grupo AM quando comparados ao grupo CTL. De outro modo, os animais do grupo AM+I/R revelaram valores plasmáticos de creatinina e ureia significativamente aumentados não só em comparação com o CTL, como também maiores que o grupo I/R ( $p < 0,05$ ; Figura 7, A e B). Concomitantemente, houve queda significativa ( $p < 0,05$ ) do RFG no grupo AM+I/R não só em relação ao grupo CTL, como também ele foi significativamente menor em comparação com o grupo I/R ( $0,05 \pm 0,02$  vs.  $0,14 \pm 0,03$  mL/min/100 g; Figura 7C). O grupo AM+I/R revelou aumento significativo na concentração plasmática dos eletrólitos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ( $p < 0,05$ ; Figura 8). Este último também foi significativamente aumentado nos animais do grupo AM, mas com valor menor que no grupo AM+I/R ( $p < 0,05$ ; Figura 8C).

Conforme demonstrado na Figura 9 (painéis A e B), a LRA induzida por I/R não alterou significativamente o pH e fluxo urinário (FU) ( $p > 0,05$ ) em comparação aos animais CTL. Por outro lado, os animais do grupo AM apresentaram redução significativa do fluxo urinário ( $p < 0,05$ ), mas os valores de pH urinário não diferiram ( $p > 0,05$ ) quando comparados ao grupo CTL. No grupo AM+I/R, a redução do fluxo urinário também foi significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo I/R, porém os valores de pH urinário foram semelhantes aos grupos CTL e I/R ( $p > 0,05$ ). Os valores de creatinina e ureia na urina se mostraram significativamente aumentados apenas nos animais do grupo AM ( $p < 0,05$ ; Figura 9, painéis C e D).

As  $FENa^+$ ,  $FEK^+$  e  $FECI^-$  foram significativamente aumentadas no grupo I/R quando comparado com o grupo CTL ( $p < 0,05$ ; Figura 9, painéis E a G), mas não nos animais do grupo AM ( $p > 0,05$ ). Exceto para  $K^+$ , os valores para  $FENa^+$  e  $FECI^-$  foram significativamente maiores em AM+I/R do que no grupo I/R ( $p < 0,05$ ).

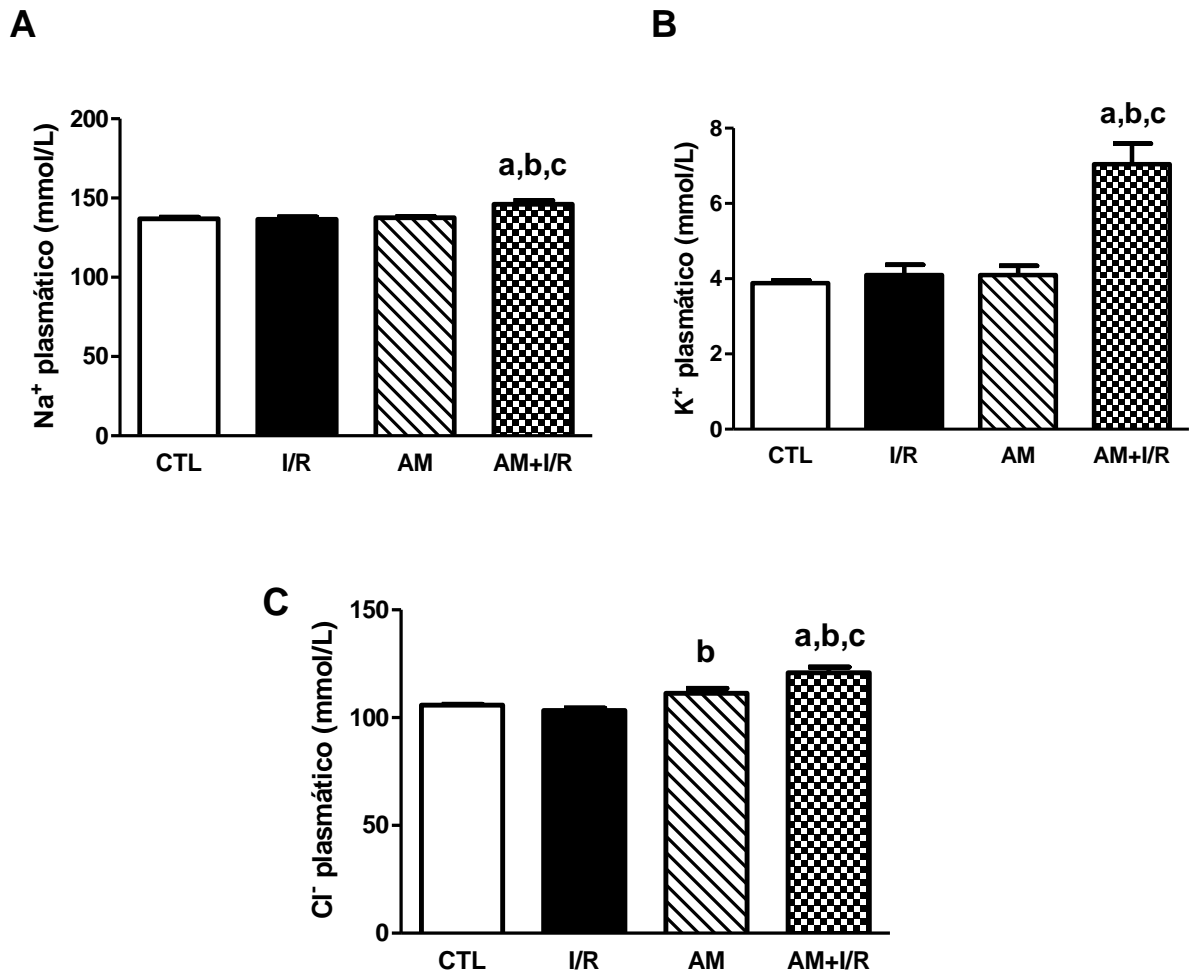


**Figura 7** – Efeitos da acidose metabólica na função renal de ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal



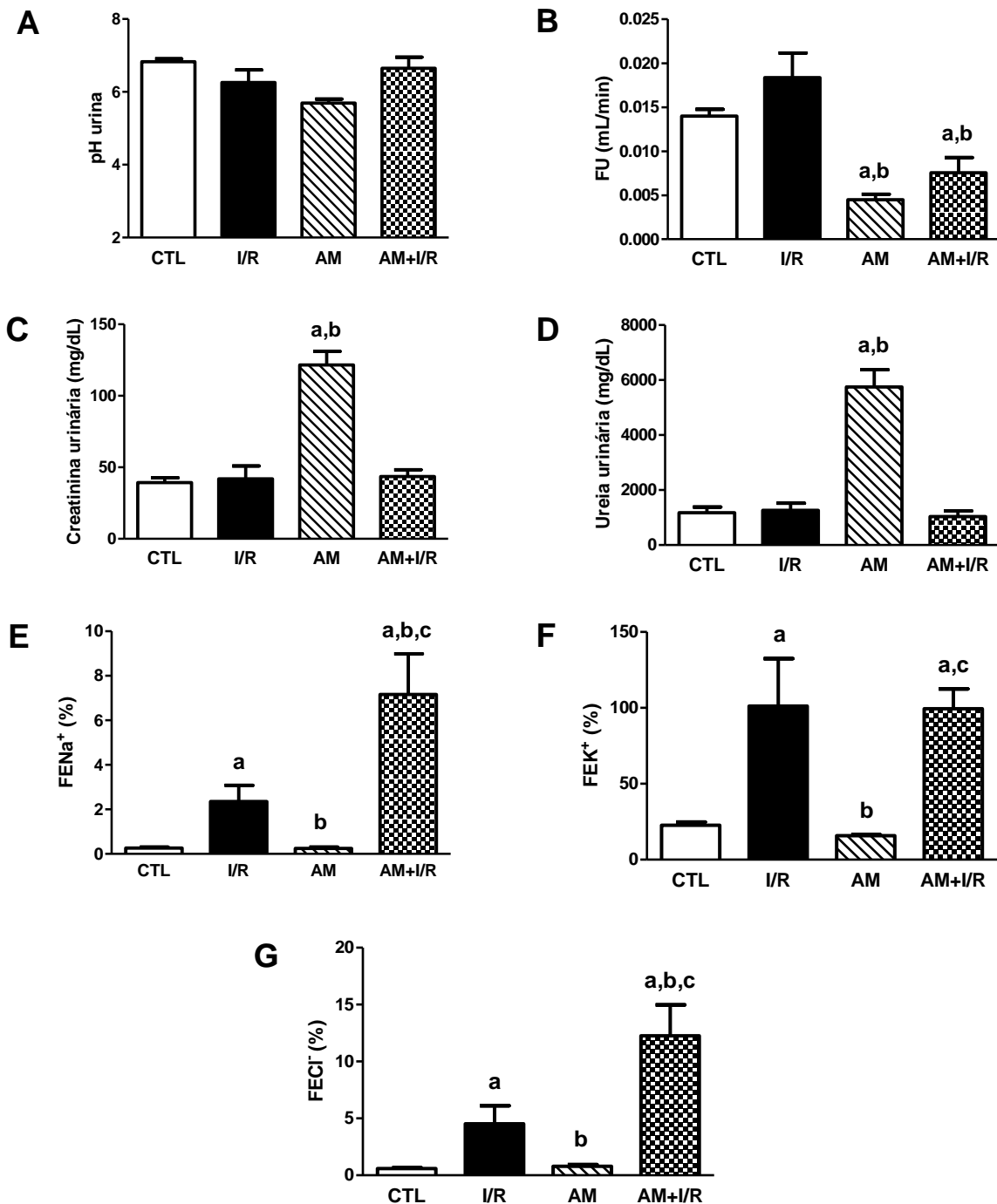
CTL, controle (cirurgia sham); I/R, insulto de isquemia/reperfusão renal (água potável e isquemia bilateral por 45 min); AM, acidose metabólica (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e cirurgia sham) e AM+I/R, acidose metabólica + insulto de isquemia/reperfusão renal (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e isquemia bilateral por 45 min). Os dados são média  $\pm$  EPM do ultimo dia do experimento. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. CTL; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. I/R; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. AM (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls).

**Figura 8** – Efeitos da acidose metabólica no nível plasmático de eletrólitos de ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal



CTL, controle (cirurgia sham); I/R, insulto de isquemia/reperfusão renal (água potável e isquemia bilateral por 45 min); AM, acidose metabólica (solução de NH<sub>4</sub>Cl 0,28 M e cirurgia sham) e AM+I/R, acidose metabólica + insulto de isquemia/reperfusão renal (solução de NH<sub>4</sub>Cl 0,28 M e isquemia bilateral por 45 min). Os dados são média ± EPM do ultimo dia do experimento. <sup>a</sup>*p* < 0,05 vs. CTL; <sup>b</sup>*p* < 0,05 vs. I/R; <sup>c</sup>*p* < 0,05 vs. AM (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls).

**Figura 9** – Efeitos da acidose metabólica nos parâmetros urinários de ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal

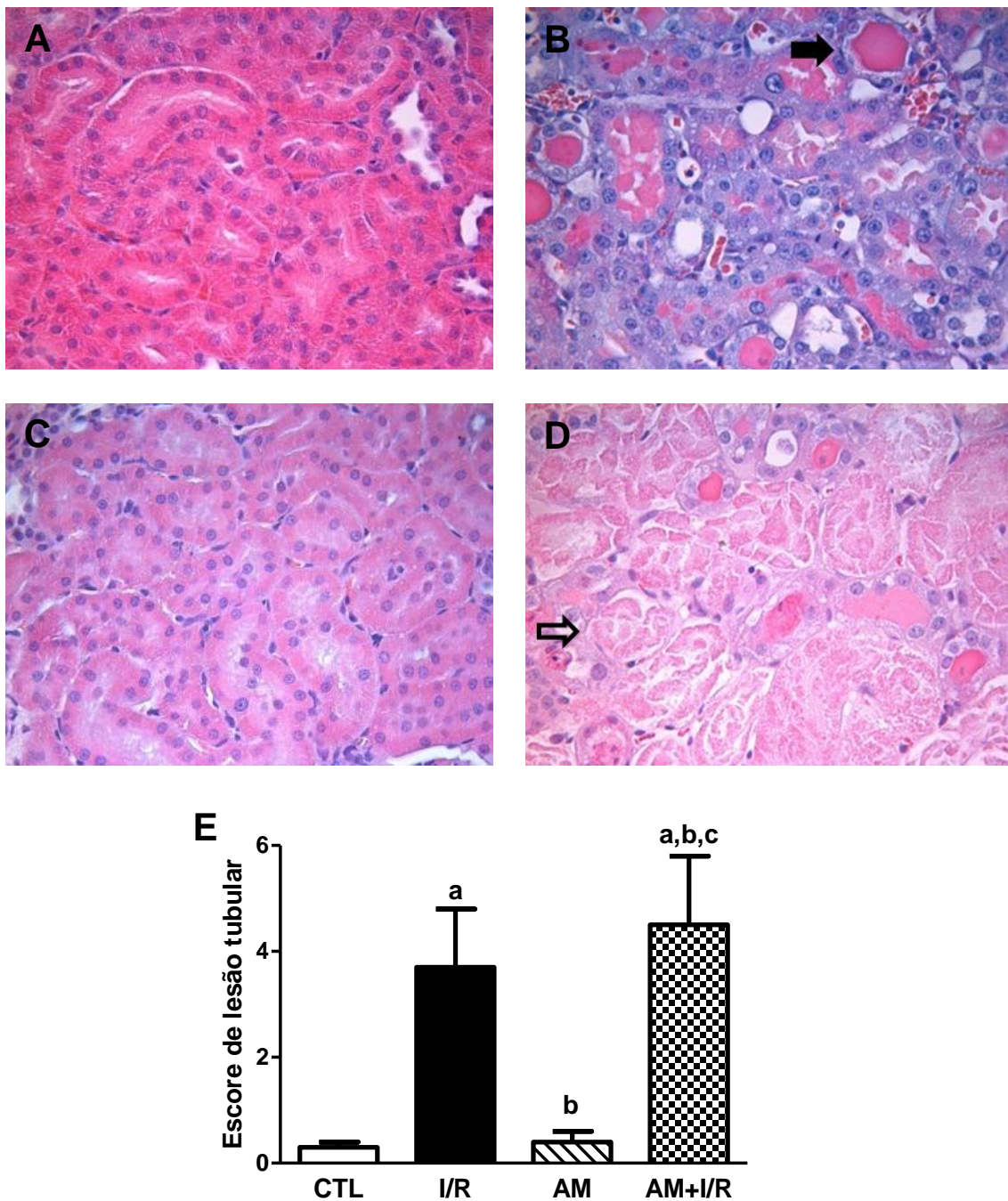


CTL, controle (cirurgia sham); I/R, insulto de isquemia/reperfusão renal (água potável e isquemia bilateral por 45 min); AM, acidose metabólica (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e cirurgia sham) e AM+I/R, acidose metabólica + insulto de isquemia/reperfusão renal (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M e isquemia bilateral por 45 min). Os dados são média  $\pm$  EPM do ultimo dia do experimento. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. CTL; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. I/R; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. AM (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls); FU, fluxo urinário; FENa<sup>+</sup>, FEK<sup>+</sup>, and FECI<sup>-</sup>, fração de excreção de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, e Cl<sup>-</sup>, respectivamente.

#### 5.4 Análise histopatológica

A análise histopatológica das amostras de rim dos grupos CTL e AM (Figura 10, painéis A e C) revelou escores de lesão tubular correspondentes a  $0,3 \pm 0,1$  e  $0,4 \pm 0,2$ ; respectivamente. Nesses dois grupos, os achados mais frequentes nos tecidos renais foram restritos às células tubulares e consistiram em dilatação e vacuolização, cuja intensidade tenha sido considerada apenas discreta. Já o grupo I/R (Figura 10, Painel B) revelou achados tubulares importantes tais como: perda da borda em escova, túbulos acentuadamente dilatados com formação de cilindros e detritos luminais, necrose tubular, moderada degeneração hidrópica-vacuolar, infiltração de células inflamatórias e edema celular no interstício tubular. Essas alterações não ficaram restritas ao córtex, mas se estenderam para medula renal externa. Tais achados histopatológicos do grupo I/R corresponderam a escore de lesão tubular maior ( $3,7 \pm 1,1$ ; Figura 10, painel E) que os grupos CTL e AM ( $p < 0,05$ ). Entretanto, as alterações tubulares foram mais intensas no grupo AM+I/R (Figura 10, painel D), determinando escore de lesão tubular significativamente maior ( $4,5 \pm 1,3$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 10, painel E) quando comparado aos grupos CTL, AM e I/R.

**Figura 10** – Alterações morfológicas renais em ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal



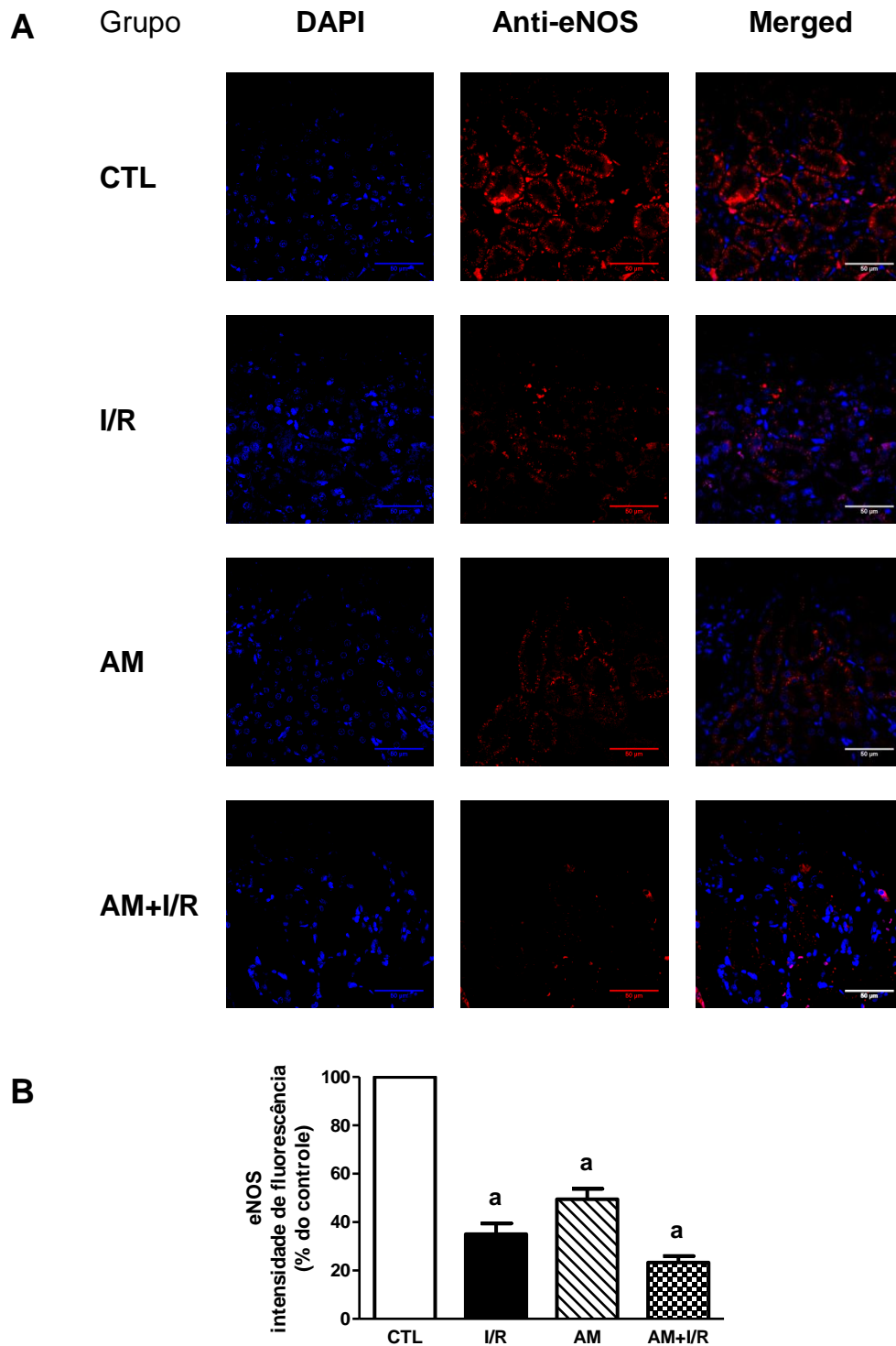
Fotomicrografias de tecido renal obtido de ratos dos grupos: (A) controle (CTL), (B) insulto de isquemia/reperfusão renal (I/R), (C) acidose metabólica induzida por NH<sub>4</sub>Cl (AM) e (D) acidose metabólica + insulto de isquemia/reperfusão renal (AM+I/R). Em A e C, os túbulos renais apresentam arquitetura preservada. Em B, visualiza-se dilatação tubular com acúmulo de cilindros hialinos (seta cheia) e presença de necrose tubular. Em D, observam-se túbulos renais desprovidos de epitélio e repletos de debris celulares (seta vazada), intensa necrose tubular em todo o campo e a perda da preservação da arquitetura do parênquima renal (hematoxilina - eosina, ampliação 400x). (E) Escore de lesão tubular. Os dados são média ± EPM do ultimo dia do experimento. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. CTL; <sup>b</sup>p < 0,05 vs. I/R; <sup>c</sup>p < 0,05 vs. AM.

### **5.5 Acidose metabólica não altera a expressão reduzida da eNOS ou a menor responsividade colinérgica na artéria renal causada por I/R**

As imagens na Figura 11 (painel A) foram obtidas por microscopia confocal e mostram que a expressão da eNOS (fluorescência vermelha) localizou-se, em geral, nas células epiteliais tubulares. Quarenta e oito horas após o procedimento cirúrgico isquêmico ou sham, os animais do grupo I/R exibiram acentuada redução ( $p < 0,05$ ) na expressão da proteína eNOS em comparação com o grupo CTL. Tanto nos animais do grupo AM como no AM+IR, a expressão da proteína eNOS revelou-se significativamente reduzida, mas sem diferença significativa em relação ao grupo I/R ( $p > 0,05$ ; Figura 11). Os valores da expressão de eNOS estão mostrados no painel B.

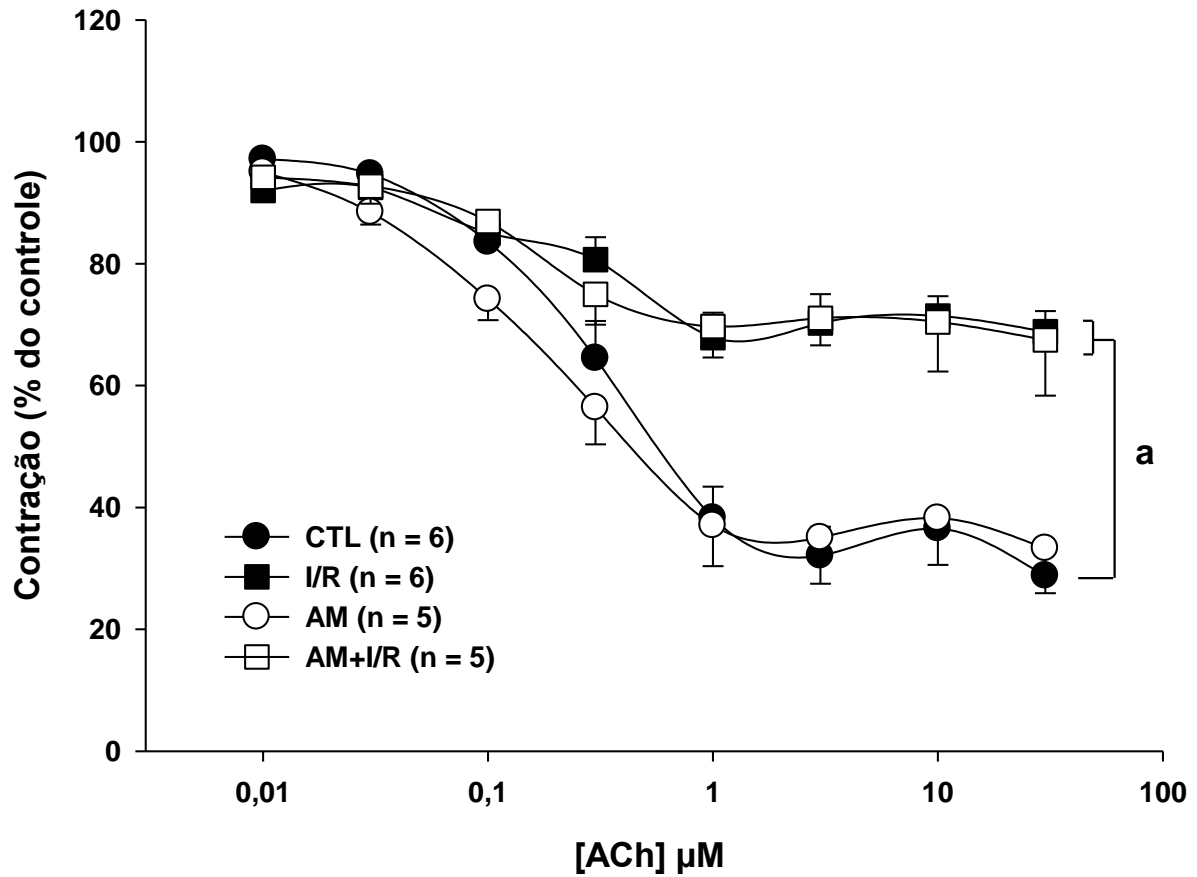
Estudos funcionais revelaram que a acetilcolina (0,01 - 30  $\mu$ M) produziu efeito relaxante em preparações isoladas de artéria renal previamente contraídas com fenilefrina (1  $\mu$ M). Em tecidos isolados obtidos de ratos do grupo CTL, a contração da fenilefrina foi reduzida para  $28,8 \pm 4,3\%$  da magnitude inicial após adição de 30  $\mu$ M acetilcolina (ACh; Figura 12). Tecidos vasculares de animais do grupo AM apresentaram relaxamento colinérgico cujo perfil não diferiu do grupo CTL. Por outro lado, o relaxamento colinérgico foi menor nas artérias renais de ratos dos grupos I/R ou AM+I/R, uma vez que os vasos isolados desses animais foram mais resistentes às ações relaxantes da acetilcolina e a contração controle foi reduzida apenas a  $68,8 \pm 3,4\%$  e  $67,5 \pm 9,1\%$ , respectivamente, valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em relação àqueles do grupo CTL (Figura 12).

**Figura 11** - Efeito da acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal na expressão da eNOS



As imagens revelaram redução significativa da imunofluorescência para eNOS em células tubulares em resposta a sobrecarga ácida ou I/R, um fenômeno que não aumentou quando ambos os insultos (AM e I/R) estavam presentes juntos. Núcleos corados com DAPI (azul). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Os dados são média  $\pm$  EPM (n = 6) expresso em porcentagem dos valores obtidos para o grupo CTL. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. CTL (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls).

**Figura 12** – Relaxamento vascular induzido por acetilcolina em anéis de artéria renal de ratos submetidos à acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal



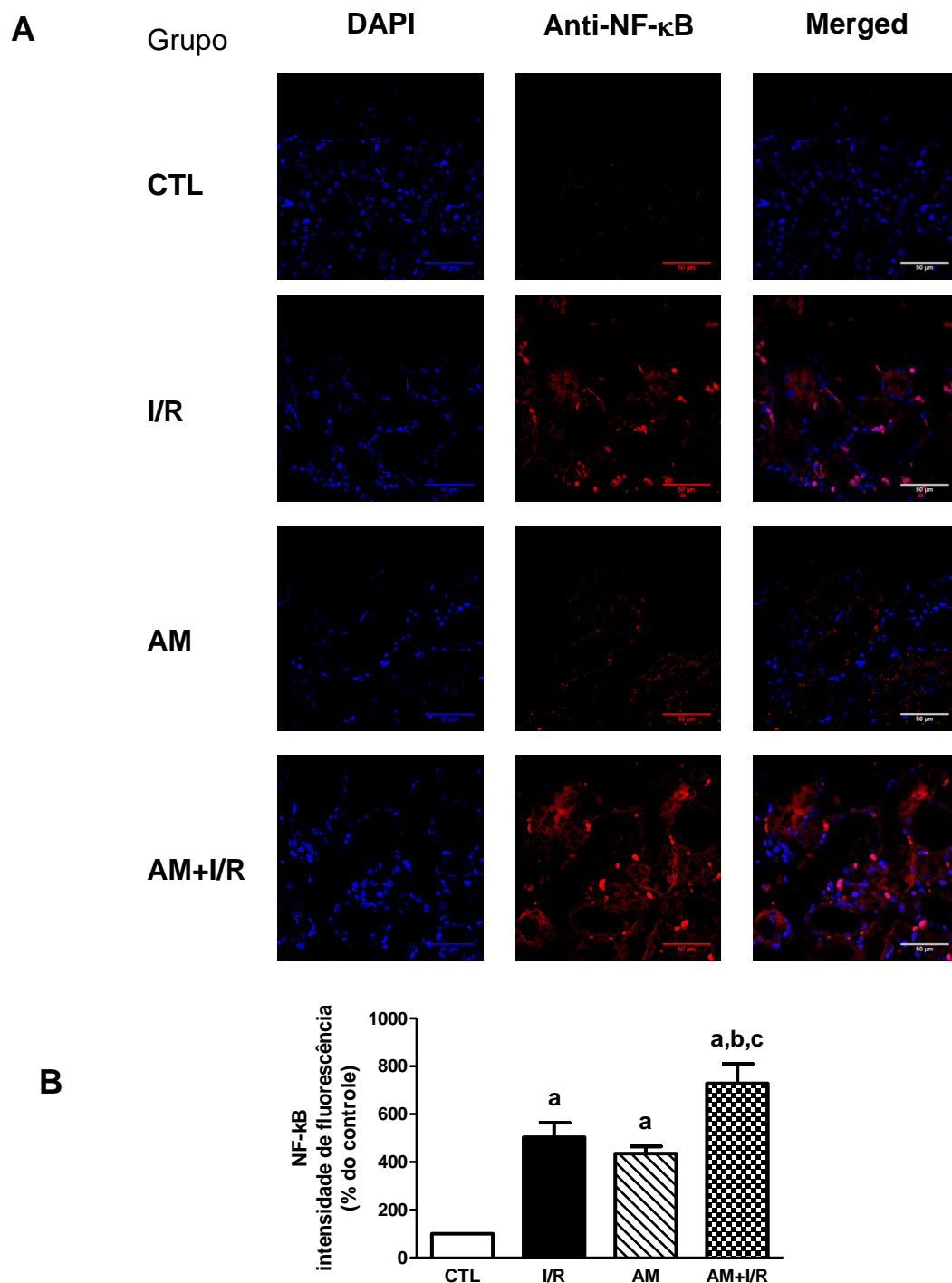
Anéis de artéria renal de ratos foram pré-contráidas com fenilefrina 1  $\mu\text{M}$  (FE). O relaxamento induzido por acetilcolina foi significativamente atenuado em vasos obtidos de ratos I/R (■) e ratos AM+I/R (□), mas não em ratos AM (○) em comparação com o controle (CTL, ●). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. O número de ratos utilizado em cada protocolo experimental está apresentado dentro do parêntese. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. CTL (ANOVA de duas vias, Holm-Sidak).



## **5.6 Acidose metabólica potencializa a expressão de NF- $\kappa$ B causada por I/R**

As imagens na Figura 13 (painel A) foram obtidas por microscopia confocal e mostram que, após 48 h do procedimento cirúrgico isquêmico ou sham, a expressão de NF- $\kappa$ B teve perfil semelhante nos animais submetidos apenas a AM ou a I/R, embora com expressão de NF- $\kappa$ B aumentada em ambos os grupos em comparação com o grupo de CTL ( $p < 0,05$ ). Quando combinada com I/R, a acidose metabólica aumentou ainda mais a expressão de NF- $\kappa$ B, visto que os valores obtidos para esse grupo foram significativamente maiores tanto em comparação com o grupo CTL, como em relação do grupo I/R ( $p < 0,05$ ; Figura 13, painel B).

**Figura 13** - Efeito da acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal na expressão de NF- $\kappa$ B

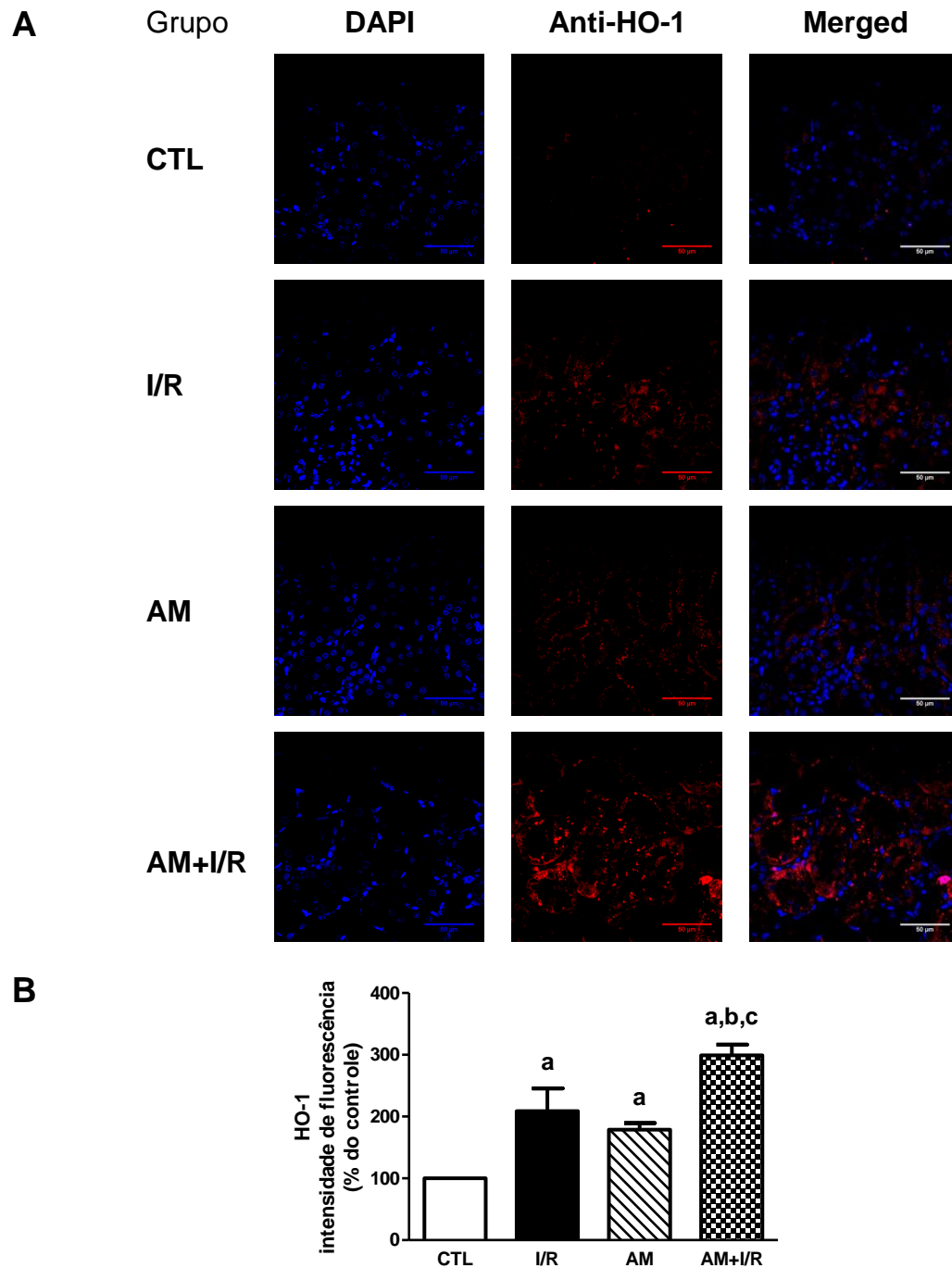


Fotomicrografias da marcação de NF- $\kappa$ B (vermelho) por imunofluorescência em tecido renal de rato. Em comparação com ratos CTL, a intensidade da fluorescência para NF- $\kappa$ B aumentou significativamente nos grupos I/R e AM. Este aumento foi intensificado quando ambos os insultos (AM e I/R) estavam presentes juntos. Núcleos corados com DAPI (azul). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Os dados são média  $\pm$  EPM (n = 6) expresso em porcentagem dos valores obtidos para o grupo CTL. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. CTL; <sup>b</sup>p < 0,05 vs. I/R; <sup>c</sup>p < 0,05 vs. AM (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls).

### **5.7 Acidose metabólica potencializa a expressão da HO-1 causada por I/R**

As imagens na Figura 14 (painel A) foram obtidas por microscopia confocal e mostram que, após 48 h do procedimento cirúrgico isquêmico ou sham, aumento significativo na expressão de HO-1 foi observado tanto no grupo I/R como no grupo AM em comparação com o grupo CTL ( $p < 0,05$ ). Nos tecidos renais de animais do grupo AM+I/R, a expressão de HO-1 teve valores significativamente maiores se comparados tanto com os valores do grupo CTL, como com relação aos grupos I/R ou AM ( $p < 0,05$ ; Figura 14, painel B).

**Figura 14** – Efeito da acidose metabólica e isquemia/reperfusão renal na expressão de HO-1



Fotomicrografias mostram que a imunofluorescência para HO-1 (vermelho) aumentou nas células tubulares de ratos dos grupos I/R e AM em comparação com o CTL, com um aumento ainda mais significativo da fluorescência no grupo AM+I/R. Núcleos corados com DAPI (azul). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Os dados são média  $\pm$  EPM (n = 6) expresso em porcentagem dos valores obtidos para o grupo CTL. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. CTL; <sup>b</sup>p < 0,05 vs. I/R; <sup>c</sup>p < 0,05 vs. AM (ANOVA de uma via, Student-Newman-Keuls).

DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

A LRA apresenta patogênese complexa em diferentes estágios que podem incluir inicialmente o dano endotelial e a inflamação, até culminar na falência do órgão (BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012). A acidose metabólica pode ter efeitos deletérios sobre os rins e envolve processos similares, incluindo inflamação e alterações no fluxo sanguíneo renal (KRAUT; MADIAS, 2010; CHOWDHURY *et al.*, 2012; PEPPICELLI *et al.*, 2013). Embora a acidose metabólica seja uma consequência conhecida da lesão renal grave, muitos pacientes criticamente enfermos desenvolvem acidose metabólica como entidade própria (por exemplo, a acidose láctica e a acidose hiperclorêmica, devida à expansão do volume), sendo ela anterior a eventual LRA. Embora nossos dados não possam ser extrapolados para a acidose láctica, o presente estudo sugere que a acidose hiperclorêmica pode ser potencialmente prejudicial a pacientes criticamente doentes, alertando, pois para a utilização de soluções equilibradas em expansão de volume (YUNOS *et al.*, 2012). Embora seja difícil determinar se o tratamento com álcalis possa minimizar o efeito prejudicial da acidose metabólica, este deve se constituir em hipótese a ser considerada.

Os dados descritos acima ilustram o conceito em que nos baseamos para desenvolver o nosso estudo. Para responder nossa pergunta inicial, o presente trabalho buscou estabelecer um modelo experimental associando duas situações críticas e comuns na prática clínica: acidose metabólica e LRA. O estudo contemplou todas as etapas, desde a padronização do modelo no estabelecimento da LRA isquêmica até sua combinação simultânea com modelo clássico de indução de acidose metabólica. Com o objetivo de avaliar o grau de disfunção renal, optamos por estudar funcional e histologicamente os danos renais e avaliar a expressão de importantes proteínas envolvidas em eventos de sinalização fisiológica nas células tubulares renais.

A seleção da espécie, ratos Wistar machos, empregada no presente estudo teve como base a elevada utilização dessa espécie em protocolos experimentais envolvendo as metodologias utilizadas (WILLIAMS *et al.*, 1997; CHATTERJEE *et al.*, 2004; POMPERMAYER *et al.*, 2005; BENTO *et al.*, 2007; NOWIK *et al.*, 2010; DORAI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011; CONG *et al.*, 2012; EL ETHER; ALDREES, 2012; RAMALHO *et al.*, 2012; KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013) e

por esses animais apresentarem semelhanças patológicas e funcionais importantes que mimetizam a LRA humana (LIEBERTHAL; NIGAM, 2000; BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012; HUSSEIN *et al.*, 2012). Mesmo apresentando uma série de limitações, modelos animais ainda permanecem fundamentais para a compreensão da LRA humana (BELLOMO *et al.*, 2004). Deve-se destacar que a acidose metabólica é frequentemente observada em pacientes com LRA, os quais apresentam alta taxa de mortalidade (ZHENG *et al.*, 2014)

O presente estudo revelou que a existência de acidose metabólica prévia e a ocorrência subsequente de LRA isquêmica piorou o cenário fisiopatológico da função renal de ratos, refletido pela intensificação no declínio do RFG, como demonstrado pelo ClCr, e significativa lesão tubular. Adicionalmente, observou-se incremento na expressão de NF- $\kappa$ B, esta já aumentada pela injúria hipóxica. Entretanto, nenhum efeito aditivo resultante da acidose metabólica foi observada na expressão da proteína eNOS, que se apresentou reduzida em animais submetidos à I/R. Assim como para a expressão de NF- $\kappa$ B, a combinação de injúrias entre acidose e isquemia resultou em maior expressão de HO-1. Sabe-se que este é um mecanismo conhecido de proteção contra a lesão de I/R renal.

Os achados acima foram obtidos no presente estudo através do tratamento de animais divididos em diferentes grupos. Num desses grupos, os animais foram submetidos à sobrecarga ácida 48 h antes da indução de lesão renal por I/R. Considerando esta abordagem inicial, observou-se diminuição significativa de parâmetros do equilíbrio ácido-básico como os valores de pH que, associados à diminuição da pBic e do SBE, foram compatíveis com o desenvolvimento de grau moderado de acidose metabólica nos animais do grupo AM. A indução de acidose metabólica mediante ingestão de solução de NH<sub>4</sub>Cl como água de beber é modelo tradicional para experimentos desse tipo. Infusão de NH<sub>4</sub>Cl assemelha-se à ingestão de HCl uma vez que NH<sub>4</sub>Cl pode ser metabolizado pelo fígado em ureia e HCl, o que resulta em cenário compatível com acidose metabólica hiperclorêmica.

Na prática clínica, ingestão de NH<sub>4</sub>Cl (100 mg/kg) em aplicação única por 30 a 40 min é um dos testes de acidificação mais comumente empregados no diagnóstico de pacientes com suspeita de acidose tubular distal (ELKINTON *et al.*, 1960; BUCKALEW JR *et al.*, 1968). Após a carga ácida, amostras de sangue desses pacientes revelam se ocorre redução esperada de 4 a 5 mEq/L na concentração plasmática dos íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para assegurar a acidificação sistêmica, enquanto

observa-se há aumento da excreção ácida na urina, esperada ocorrer em condições normais. Esse teste de acidificação não é, entretanto, indicado em pacientes com disfunção hepática (OSTER *et al.*, 1975). Portanto, o modelo experimental adotado nesse estudo é compatível com observações clínicas e permite-nos tentar aproximar os presentes achados com a fisiopatologia da acidose metabólica em humanos.

Para esse modelo animal, tem sido relatada a instalação de leve desidratação em ratos experimentais (NOWIK *et al.*, 2010). Sob nossas condições experimentais, consideramos improvável a ocorrência de desidratação por alguns motivos. Deve ser considerado que tanto os animais CTL como os animais dos demais grupos experimentais apresentaram perdas similares no peso corporal durante o tratamento de acidificação sistêmica e após os procedimentos cirúrgicos e o restante do período experimental. Além disso, os valores de hematócrito, osmolalidade sanguínea, pressão arterial e frequência cardíaca também não apresentaram diferença significativa entre os grupos quando comparados ao CTL. Apesar disso e considerando que desidratação pode ser parâmetro importante na avaliação de nosso estudo, algumas considerações adicionais merecem ser feitas a seguir.

Primeiro, o déficit de peso dos animais possivelmente pode ter sido ocasionado por dois fatores: o procedimento cirúrgico *per se* e o alojamento individual em gaiola metabólica ou por ambos. Por serem considerados seres sociais, os ratos necessitam interagir com os outros membros da sua espécie e quando mantidos isolados por longos períodos, desenvolvem estresse (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Entretanto, em nosso modelo experimental fez-se necessário o alojamento individual dos animais para acompanhamento dos parâmetros fisiológicos de forma individualizada. Nesse aspecto, estudos sugerem que fatores genéticos e ambientais (predominantemente comportamentais / interações sociais) podem afetar a ingestão de comida, a massa corporal e os hormônios, tais como corticosterona, os quais são conhecidos por influenciar a composição corporal de ratos e camundongos (NAGY *et al.*, 2002; TAMASHIRO *et al.*, 2007). De fato, Armando *et al.* (2007) relataram maiores conteúdos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona adrenal em ratos colocados individualmente em gaiolas metabólicas, quando comparados com animais mantidos em caixas coletivas. Infelizmente, não realizamos a dosagem dos níveis de cortisol em nosso estudo e, portanto, não podemos descartar a hipótese de que parte dos



efeitos observados possam ter sofrido alguma interferência decorrente desses fenômenos. Por outro lado, todos os animais foram sujeitos às mesmas condições de isolamento, o que torna pouco provável que as diferenças aqui relatadas sejam decorrentes de estresse.

Segundo, o termo desidratação, conforme Riella e Pachaly (2003, p. 111) “refere-se à perda de água que leva a uma elevação do sódio plasmático e a um déficit de água intracelular devido ao movimento de água das células para o líquido extracelular.” É bem conhecido que os valores de hematócrito e osmolalidade plasmática servem de referência para avaliação do estado de hidratação do animal (ÉVORA *et al.*, 1999; NOWIK *et al.*, 2010). E em situações de desidratação, seus valores apresentam-se aumentados (SCHREIJER; REITSMA; CANNEGIETER, 2010; HOOPER *et al.*, 2014). Entretanto, os nossos resultados não são compatíveis com um estado de desidratação visto que os valores de hematócrito e osmolalidade plasmática dos animais do grupo AM não revelaram valores estatisticamente diferentes aos do grupo CTL. Condição semelhante foi visualizada nos demais grupos experimentais quando comparados ao CTL. Em relação ao aumento da osmolalidade plasmática dos animais do grupo AM+I/R *versus* grupo I/R, pode-se inferir que esse aumento acompanhou as alterações que ocorreram com os níveis plasmáticos de sódio, principal eletrólito regulador desse parâmetro no organismo (RIELLA; PACHALY, 2003, p. 111). Corroborando esses achados, hematócrito e osmolalidade plasmática dos grupos estudados apresentaram valores semelhantes aos descritos em outros estudos (NUNES *et al.*, 1994; QUENTIN *et al.*, 2004; NOWIK *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010) e dentro da faixa descrita por Harkness & Wagner (1993) e Powers Jr (2002) para roedores, entre 36 - 48% e 280 - 312 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, respectivamente.

Terceiro, o estado de desidratação, de acordo com a literatura, ocasiona uma diminuição da volemia, comprometendo o retorno venoso. Em consequência, ocorre uma diminuição da PAM e, com a redução do retorno venoso, uma diminuição do volume sistólico. Dessa forma, a FC tende a aumentar para compensar a diminuição do volume de ejeção (COYLE; GONZÁLEZ-ALONSO, 2001). Acerca do exposto acima, consideramos pouco provável a existência de desidratação nos animais experimentais visto que, os valores obtidos de PAM e FC não diferiram significativamente dos animais CTL.

O efeito da acidose extracelular na hemodinâmica é controverso e complexo (KELLUM; SONG; VENKATARAMAN, 2004). Pedoto *et al.* (2001), demonstraram diminuição da pressão arterial média ocasionada pela presença de acidose metabólica moderada através da infusão de HCl em modelo de lesão intestinal em ratos. Kellum, Song e Venkataraman (2004), também demonstraram que acidose induzida por infusão de HCl em modelo experimental de sepse grave em ratos causou uma diminuição da PAM. Em contraposição a esses dados, existem estudos mostrando que acidemia estimula a vasopressina, o hormônio adrenocorticotrófico, e aldosterona em modelos experimentais com animais e podem, portanto, aumentar PAM (AUGUSTINSSON; FORSLID, 1989; WOOD; CHEN, 1989).

Os resultados obtidos no nosso estudo em relação à PAM e FC diferiram dos descritos na literatura, porém deve-se considerar o tempo de avaliação, visto que a maioria dos trabalhos descritos acima avaliou os dois parâmetros em intervalos menores (5 – 8 h) e a nossa avaliação ocorreu após 48 h do insulto isquêmico. Do ponto de vista experimental, existe na literatura grande variedade de modelos de acidose metabólica com diferentes graus de intensidade e tempos de avaliação da PAM e FC, o mesmo acontece com o modelo de LRA por I/R. Em virtude disso, os resultados podem apresentar aspectos heterogêneos, dependendo do tipo, magnitude e do modelo experimental. Em conjunto, parece-nos razoável concluir que os nossos resultados sejam possivelmente decorrentes do dano às estruturas renais provavelmente atribuíveis à influência sistêmica do estado ácido-base e não aos parâmetros macro-hemodinâmicos.

Embora a exacerbação da resposta inflamatória induzida por acidose metabólica seja conhecida, até o momento nenhum consenso foi alcançado sobre os efeitos do desequilíbrio ácido-base em lesão de órgãos por I/R. Alguns estudos mostram um efeito protetor de formas mais leves de acidose (metabólica ou hipercápnica) em outros órgãos, como os pulmões, coração e cérebro (RODRÍGUEZ-SINOVAS *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2014). No presente estudo, os animais desenvolveram AM moderada antes do insulto de I/R renal, todavia 48 h após o insulto a acidose metabólica tornou-se mais grave. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que uma menor severidade no grau de acidose possa produzir um efeito oposto sob outras condições.

Na prática clínica, os parâmetros mais comumente utilizados para o monitoramento dos distúrbios ácido-básico do organismo são: pH,  $\text{PCO}_2$ , bicarbonato e SBE (SCHLICHTIG; GROGONO; SEVERINGHAUS, 1998; PARK, M. *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2014). A análise dos gases sanguíneos, também denominada gasometria, é um valioso exame de avaliação dos gases (oxigênio e gás carbônico) do sangue arterial ou venoso e dos distúrbios do equilíbrio ácido-básico com intuito de verificar alterações no desequilíbrio do sistema respiratório e metabólico (MÁRQUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

Os resultados da gasometria arterial obtidos dos animais do grupo AM, demonstraram claramente que a solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M como única fonte hídrica durante todo o período experimental mostrou-se efetiva na obtenção do modelo experimental de acidose metabólica utilizado nesse estudo, evidenciado pela redução significativa nos valores de pH, pBic e SBE. Este achado corrobora com os relatos encontrados na literatura (QUENTIN *et al.*, 2004; NOWIK *et al.*, 2010).

O pH é determinado pela concentração de íons  $\text{H}^+$  no sangue que por sua vez indica a existência de acidemia ( $\text{pH} < 7,35$ ) ou alcalemia ( $\text{pH} > 7,45$ ) (ROCCO, 2003). Conforme esperado, apenas os animais de ambos os grupos AM e AM+I/R apresentaram valores de pH abaixo de 7,35. Entretanto, os animais do grupo AM desenvolveram uma acidemia moderada ( $7,2 < \text{pH} < 7,35$ ), já o grupo AM+I/R apresentou valores de pH abaixo de 7,2, considerado acidemia grave (KRAUT; MADIAS, 2010). A manutenção do pH em valores fisiológicos depende fundamentalmente do balanço entre dois sistemas principais: o sistema respiratório e o tampão plasmático (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010).

Em relação à gasometria, os animais do grupo CTL e I/R não registraram variações significativas nos parâmetros avaliados, mantendo seus valores dentro da faixa de normalidade. Isso indica que os danos causados pela I/R parecem ser locais, não tendo, portanto, repercussão sistêmica.

O bicarbonato é o principal componente do sistema tampão no líquido extracelular (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010). O valor normal do bicarbonato oscila de 22 a 26 mmol/L (KRAUT; KURTZ, 2005). Os animais do grupo AM apresentaram valores inferiores a 22 mmol/L, demonstrando que houve consumo da reserva de bases. Tal achado correlaciona-se com a redução observada no pH desses animais, pois a carga de  $\text{H}^+$  é tamponada inicialmente por sua ligação ao bicarbonato. Então, os íons  $\text{H}^+$  reagem com  $\text{HCO}_3^-$  e a concentração de ambos

diminui em uma proporção de 1:1. Desta forma, o decréscimo de pH aliado à redução de bicarbonato revelam um quadro compatível com acidose metabólica. Esses resultados estão em consonância com Lardner e O'Donovan (1997). Vale ressaltar que a indução de lesão renal por I/R na presença de carga ácida agravou consideravelmente esse quadro de acidose metabólica. Este achado foi constatado pela redução significativa dos valores de bicarbonato visualizado nesses animais, contrastando, sobretudo com os valores do grupo AM e I/R.

A participação do sistema respiratório é representada pela quantidade de ácido carbônico presente no sangue, regulando a sua retenção ou eliminação pela respiração (HAMM; NAKHOUL; HERING-SMITH, 2015). A quantidade de  $\text{CO}_2$  presente no sangue arterial pode ser determinada pela pressão parcial de dióxido de carbono ( $\text{PCO}_2$ ) e os valores considerados representativos da normalidade oscilam entre 35 e 45 mmHg (ROCCO, 2003). Baseado nisso, valores da  $\text{PCO}_2$  acima de 45 mmHg representam retenção de  $\text{CO}_2$  e consequentemente redução do pH, indicando a existência de acidose respiratória. Na alcalose respiratória, as circunstâncias são contrárias, ou seja, elevação de pH decorrente da excessiva eliminação de  $\text{CO}_2$  resultando em valores de  $\text{PCO}_2$  abaixo de 35 mmHg (ROCCO, 2003; LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2010; HAMM; NAKHOUL; HERING-SMITH, 2015). Entretanto, dependendo da origem dos distúrbios do equilíbrio ácido-básico, o organismo desenvolve mecanismos compensatórios (renal ou respiratório) visando minimizar as alterações na concentração de  $\text{H}^+$ . Por exemplo, nos distúrbios metabólicos a resposta compensatória ocorre através do sistema respiratório, e consequentemente, nos distúrbios respiratórios a resposta compensatória ocorre pelo sistema renal (ROCCO, 2003; GOMEZ; KELLUM, 2015; HAMM; NAKHOUL; HERING-SMITH, 2015). Assim, a resposta compensatória sempre acompanha a direção do distúrbio primário.

Nesta lógica, observamos que os animais do grupo AM+I/R apresentaram valores da  $\text{PCO}_2$  abaixo da normalidade ( $< 35$  mmHg), alterações que poderiam estar relacionadas a tentativa de restaurar a relação  $[\text{HCO}_3^-]/\text{PCO}_2$  e compensar o distúrbio. Entretanto, a combinação com o insulto isquêmico contribuiu para o péssimo estado geral desses animais. Esse achado pode estar associado a provável diminuição ou perda dos principais mecanismos reguladores do equilíbrio ácido-básico e eletrolítico decorrente da lesão renal aguda por I/R (BRADY; SINGER, 1995; BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012). Além disso, em pacientes com LRA, as

respostas compensatórias são insuficientes, tanto no âmbito respiratório como metabólico (ROCKTAESCHEL *et al.*, 2003). Visto que os animais submetidos somente à carga ácida não apresentaram agravamento do estado geral, além disso, apresentaram valores da  $PCO_2$  dentro da faixa de normalidade e similares àqueles observados nos animais do grupo CTL. Os achados de Quentin *et al.* (2004) e Nowik *et al.* (2010) também mostram redução significativa do pH sanguíneo e bicarbonato sem alteração da  $PCO_2$  em resposta à administração de solução de  $NH_4Cl$  a ratos.

A ocorrência de acidose metabólica pode manifestar-se como consequência da lesão renal aguda, sendo considerada um dos fatores que contribuem para o agravamento dessa lesão (KRAUT; KURTZ, 2005; KRAUT; MADIAS, 2010; CHAWLA *et al.*, 2011). Apesar disso, os animais submetidos somente ao insulto por I/R não apresentaram variações indicativas da ocorrência de acidose de acordo com os parâmetros analisados pela gasometria. Nossa interpretação para esse resultado é que, provavelmente, o tempo de reperfusão possa ter contribuído para essa situação, visto que avaliação desses parâmetros ocorreu após 48 h do insulto isquêmico. Talvez um tempo menor de reperfusão pudesse revelar tal condição, pois observamos que as médias dos parâmetros analisados pela gasometria estiveram sempre próximas do limite mínimo da normalidade. Outro ponto que dificultou a nossa análise foi a escassez de relatos na literatura sobre valores específicos para parâmetros gasométricos em modelo experimental de LRA induzido por I/R. Tulafu *et al.* (2014) utilizando o modelo de lesão renal por I/R, reportaram a existência de acidose metabólica através da redução significativa de pH sanguíneo e SBE, diferentemente do que foi verificado no nosso estudo. A provável explicação para esses achados talvez seja decorrente das diferenças na metodologia, pois o clampeamento foi do pedúnculo renal esquerdo, o tempo de isquemia, 30 min e o período de avaliação ocorreu 3 h após insulto isquêmico. Dessa forma, optou-se por analisar os resultados obtidos por gasometria baseando-se em critérios utilizados na prática clínica.

Outro parâmetro de grande interesse utilizado como ferramenta complementar na identificação dos distúrbios do equilíbrio ácido-básico é o excesso de base padrão (SBE), pois através do seu valor é possível verificar o tipo de desvio metabólico existente como também estimar a gravidade dos distúrbios metabólicos (SCHLICHTIG; GROGONO; SEVERINGHAUS, 1998; PARK, M. *et al.*, 2008). A obtenção do seu valor provém da quantidade de ácido ou base, em mEq/L,

adicionado a cada litro de sangue a 37°C e PCO<sub>2</sub> de 40mmHg para restabelecer o valor de pH para 7,4 ou, simplesmente, a diferença entre o total de bases e ácidos tituláveis (GOMEZ; KELLUM, 2015). Dessa forma, o valor necessário para correção do pH para 7,4 designa-se por excesso de base (BE). Geralmente, valores negativos indicam uma deficiência de bases, sugerindo um quadro de acidose metabólica devido à redução de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, já os valores positivos sugerem alcalose metabólica (GOMEZ; KELLUM, 2015). Dependendo da metodologia utilizada para calcular o SBE, encontramos na literatura dois pontos de corte diferentes para identificar acidose metabólica (< -2 mEq/L ou < -5 mEq/L). Todavia, não existe uma definição concisa dessas questões (PARK, M. *et al.*, 2008). O diagnóstico de acidose metabólica usando o SBE parece ser clinicamente relevante em termos de prever o resultado clínico (PARK, M. *et al.*, 2008).

Em relação ao SBE, não foram registradas variações significativas entre grupos CTL e I/R. A existência de acidose metabólica moderada (SBE: -5 até -10 mmol/L) nos animais que ingeriram somente a solução de NH<sub>4</sub>Cl foi reforçada pela redução significativa dos valores de SBE (-6,83 ± 2,37 mmol/L) (KELLUM; SONG; VENKATARAMAN, 2004). Tal achado está diretamente correlacionado às reduções observadas em ambos os parâmetros, pH e pBic. Considerando que o déficit de bases varia conforme a gravidade da acidose, verificou-se que a combinação da carga ácida e a lesão renal por I/R apresentou valores de SBE (-23,8 ± 1,5 mmol/L), compatíveis com acidose metabólica grave (SBE < -10 mmol/L) (KELLUM; SONG; VENKATARAMAN, 2004). Tomados em conjunto, os achados aqui relatados demonstram o agravamento da acidose metabólica encontrada nos animais submetidos à lesão renal por I/R.

A lesão renal por I/R é um dos modelos agudos mais utilizados para promover lesão renal e pode ser induzida por diferentes modelos experimentais, utilizando diversos mecanismos (SINGH *et al.*, 2012). No presente trabalho, o modelo de I/R renal foi obtido pelo clampeamento bilateral das artérias renais durante 45 minutos, seguido de 48 horas de reperfusão. O tempo de I/R renal empregado nesse estudo foi baseado em padronizações prévias realizadas em nosso laboratório, além de estudos que demonstravam a relação entre o tempo de isquemia e o aparecimento de lesão renal (WILLIAMS *et al.*, 1997; POMPERMAYER *et al.*, 2005; RAMALHO *et al.*, 2012). Como descrito por Singh *et al.* (2012) em rim

humano, a resposta hemodinâmica à agressão isquêmica é comparável à isquemia renal em ratos de aproximadamente 45 min seguidos de 24 h sob perfusão.

Classicamente, a determinação dos níveis plasmáticos de creatinina e ureia são consideradas marcadores funcionais de lesão renal, estabelecendo ótima correlação com RFG (BONVENTRE; WEINBERG, 2003; BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012; BELLOMO, KELLUM, RONCO, 2012). O modelo experimental de I/R renal utilizado no presente trabalho ocasionou redução significativa do *clearance* de creatinina, indicativo de declínio do RFG, bem como elevação da concentração plasmática de creatinina e ureia. Dano tubular também foi evidente quando levamos em conta o aumento significativo da excreção fracionada urinária de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Ao todo, os presentes achados corroboram com muitos outros estudos disponíveis na literatura (WILLIAMS *et al.*, 1997; CHATTERJEE *et al.*, 2004; POMPERMAYER *et al.*, 2005; DORAI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011; RAMALHO *et al.*, 2012) e são consistentes com uma lesão renal funcional.

Observou-se que a anestesia e a realização do procedimento cirúrgico (sem o clampeamento bilateral das artérias renais) nos animais CTL não comprometeu a função renal, considerando os marcadores renais descritos acima. Tais resultados corroboram com os achados de estudos anteriores (WILLIAMS *et al.*, 1997; CHATTERJEE *et al.*, 2004; POMPERMAYER *et al.*, 2005; DORAI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011; RAMALHO *et al.*, 2012). Não obstante, os animais do grupo AM apresentaram valores de parâmetros relacionados com a função renal dentro da faixa representada pelos animais CTL. Estudos mostraram que ingestão de solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,28 M durante 7 dias não afetou o RFG em ratos (RIZZO *et al.*, 2000).

A associação simultânea dos insultos, sobrecarga ácida e lesão renal por I/R culminou com os menores valores no RFG. Por outro lado, tiveram os maiores valores de eletrólitos plasmáticos, creatinina e ureia entre todos os grupos. Tais achados se encaixam bem com o estado extremamente debilitado desses animais, e traduzidos em elevado índice de mortalidade (50%), visto que os grupos CTL, AM e I/R corresponderam apenas 0%, 0% e 11%, respectivamente.

A acidose metabólica, induzida pela ingestão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , aumentou significativamente a concentração urinária de creatinina e ureia nos animais do grupo AM, a qual poderia provavelmente estar relacionado com a redução do fluxo urinário em função de menor consumo de líquidos pós-cirurgia. Além disso, a capacidade dos túbulos renais para excretar eletrólitos na urina permaneceu sem

alteração no grupo AM. Embora a ampla faixa dos efeitos provocados por um ambiente extracelular enriquecido de  $H^+$  possa depender das propriedades compensatórias renais, os nossos resultados corroboram com estudos anteriores que utilizaram abordagens similares (QUENTIN *et al.*, 2004; FAROQUI; SHERIFF; AMLAL, 2006; NOWIK *et al.*, 2010). Curiosamente, os ratos AM+I/R não conseguiram atingir o aumento dos níveis de creatinina urinária e ureia como observado nos animais do grupo AM. Tais descobertas podem resultar dos efeitos prejudiciais causados pela I/R no RFG, de modo a prejudicar a filtração destes compostos para o espaço de Bowman. Deve-se considerar que os animais do grupo AM+I/R tinham pronunciados níveis de creatinina e ureia no sangue, maior do que no grupo AM, embora produzissem níveis semelhantes de fluxo urinário. Tomados em conjunto, parece ser compreensível a incapacidade dos ratos AM+I/R em tornar creatinina e ureia urinárias tão concentradas como podem ser vistas na urina de ratos AM. Resultados semelhantes de aumento da excreção de ureia já foram descritos anteriormente para ratos tratados com  $NH_4Cl$  (LARDNER; O'DONOVAN, 1997).

A disfunção renal decorrente do insulto por I/R e a consequente lesão tubular constituem a principal razão do aumento da FE para  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e  $K^+$  no grupo I/R. É interessante que a acidose sistêmica pareceu piorar o dano tubular, uma vez que aumentou ainda mais a FE tanto para  $Na^+$  e  $Cl^-$ , mas não para o  $K^+$ , em ratos AM+I/R. É bem conhecido que a homeostase do  $K^+$  pode ser influenciada pelo estado ácido-base do organismo (LEE HAMM; HERING-SMITH; NAKHOUL, 2013). Uma vez estabelecida sobrecarga de  $H^+$ , os rins podem aumentar a secreção tubular de  $H^+$ , como maneira de reduzir o impacto da carga de  $H^+$  no pH sanguíneo (SILVA *et al.*, 2012). Nesta lógica, a redução do pH urinário suportaria a hipótese da ocorrência de aumento da secreção tubular de  $H^+$ , dependente em parte da reabsorção concomitante de  $K^+$  feito através do antiporte ativo  $H^+/K^+$ -ATPase no néfron distal (GIEBISCH, 1998). A clara tendência para redução do pH urinário e também  $FEK^+$  pode ser indicativo de que tal fenômeno possa estar presente em ratos do grupo AM, mas a diferença significativa não pôde ser confirmada, talvez devido ao tamanho da amostra. Se assim for, é provável que em animais AM+I/R este tipo de secreção de  $H^+$  esteja prejudicada, mas uma atividade residual deste antiporte parece capaz de neutralizar o aumento da  $FEK^+$  que não atingiu níveis tão



exacerbados como registrado para  $\text{FENa}^+$  e  $\text{FECl}^-$ , embora a acidificação da urina também não foi evidenciada.

A lesão tubular tem sido considerada um dos fatores que contribui substancialmente para disfunção tubular renal, e por isso, pode coexistir com a hemodinâmica glomerular alterada ou até mesmo um levar ao outro (SINGH *et al.*, 2012). A análise histológica dos tecidos renais confirmou a ocorrência de significativo dano tubular caracterizado pela perda da borda em escova, degeneração hidrópico-vacuolar, dilatação tubular, proteínas e acúmulo de detritos celulares em alguns túbulos e necrose das células epiteliais dos túbulos renais em ratos submetidos a I/R. Nossos achados corroboram com estudos anteriores que utilizaram abordagens similares (CHATTERJEE *et al.*, 2004; POMPERMAYER *et al.*, 2005; DORAI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011; RAMALHO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2012). As alterações histológicas induzidas pelo insulto isquêmico foram mais acentuadas quando combinada com carga ácida, o que sugere que a ingestão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é um fator agravante para o dano tubular. Tomados em conjunto, as alterações histológicas encontradas em nosso estudo confirmam a hipótese de que as diferenças estruturais podem determinar o comportamento funcional, pois se encaixam bem com os resultados funcionais descritos para o grupo AM+I/R.

As alterações causadas pelo insulto ácido e/ou isquêmico se estenderam para a expressão de proteínas importantes no tecido renal. Óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma enzima fundamentalmente envolvida no processo de lesão renal e induz inflamação e apoptose. A inibição da atividade da iNOS (ou a ausência da própria iNOS em camundongos nocaute) melhorou o dano renal por I/R *in vivo* (BETZ *et al.*, 2012). Outra isoforma da NOS, eNOS, tem efeitos protetores na lesão por I/R (SOUZA *et al.*, 2012). A expressão da eNOS no epitélio tubular tem sido relatada em vários segmentos do néfron como o túbulo proximal, o ramo ascendente espesso da alça de Henle, e os ductos coletores corticais e medulares internos (UJIIE *et al.*, 1994; EVANS; FITZGERALD, 2005). O presente estudo encontrou que eNOS foi significativamente menos expressa em células tubulares em resposta a carga ácida ou I/R, corroborando com estudos anteriores (DE ARAÚJO *et al.*, 2005; BETZ *et al.*, 2012). Embora estudos avaliando os efeitos do pH ácido sobre a expressão da eNOS nos túbulos sejam escassos, Giraldez *et al.* (1997) relataram que acidose induzida por I/R pode reduzir a expressão de eNOS em tecido cardíaco. No presente estudo, acidose sistêmica sozinha reduziu significativamente a

expressão da eNOS em túbulos renais. Com AM e I/R combinados, expressão de eNOS permaneceu comparável aos níveis reduzidos que foram observados apenas por carga ácida.

Suporte adicional para os dados descritos acima podem ser derivados dos efeitos relaxantes da acetilcolina em anéis de artéria renal. Embora a expressão da eNOS em tecido vascular não tenha sido abordada nesse estudo, avaliamos seu papel funcional na regulação do tônus vascular de células musculares lisas. É bem descrito que a resposta relaxante dependente do endotélio induzida pela acetilcolina é mediada pela liberação de NO através de uma ação excitatória sobre a eNOS (ARNAL, 1999). Dessa forma, no presente estudo, observou-se redução da capacidade da acetilcolina em induzir o relaxamento vascular dependente do endotélio, sendo significativamente mais evidente em vasos isolados obtidos de ratos I/R e AM+I/R. Esses dados revelam uma perda funcional da eNOS em células endoteliais de vasos renais obtidos de ratos I/R, e que a acidose *per se* não interfere com a responsividade da acetilcolina na artéria renal. De qualquer forma, nossos dados são consistentes com a característica perda da resposta vasorrelaxante observada em vasos renais isquêmicos. Estudos reportaram que a resposta vasorrelaxante derivada do endotélio vascular e a produção de NO em resposta à bradicinina foram inibidas na insuficiência renal isquêmica (BRODSKY *et al.*, 2002).

NF- $\kappa$ B é um importante mediador da inflamação aguda e crônica. É considerado essencial para a indução de lesão renal por I/R porque pode regular positivamente a expressão de genes pró-inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) (LAWRENCE, 2009). Nossos resultados estão de acordo com o esperado para esse fator, visto que, a expressão de NF- $\kappa$ B foi significativamente aumentada em células tubulares de ratos I/R. No presente estudo, a magnitude da *upregulation* de NF- $\kappa$ B em ratos acidóticos foi comparável aos animais sujeitos apenas a lesão renal por I/R, indicando que a acidose é uma condição capaz de induzir a expressão de NF- $\kappa$ B, embora a sua contribuição como causadora de processos inflamatórios seja controversa (KRAUT; KURTZ, 2005). Os ratos acidóticos que apresentaram lesão renal por I/R exibiram maior expressão de NF- $\kappa$ B do que os animais que foram submetidos apenas aos insultos isoladamente (I/R ou AM). Estudos mostram que acidose hipercápnica parece inibir a expressão de NF- $\kappa$ B nos pulmões sob condições de lesão por I/R (WU *et al.*, 2013). Outros autores

demonstraram relação positiva entre a acidose e NF- $\kappa$ B em células RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (KELLUM; SONG; LI, 2004). Jensen *et al.* (1990) demonstraram que a acidose altera a síntese de citocinas inflamatórias pela exposição de macrófagos ao ácido láctico. Nossos dados indicam que grave lesão por I/R combinado com AM está associada com maior expressão de NF- $\kappa$ B, sugerindo que outros fatores além apenas do pH podem influenciar na atividade do NF- $\kappa$ B.

O presente estudo também avaliou a expressão de HO-1, uma enzima expressa em níveis baixos em rins saudáveis (FERENBACH; KLUTH; HUGHES, 2010). Nossos resultados mostram que a expressão de HO-1 em células tubulares foi aumentada em resposta a lesão por I/R, como relatado anteriormente por outros estudos (GONÇALVES *et al.*, 2006; ZAGER; JOHNSON; BECKER, 2012; FOUAD *et al.*, 2013). Estudos também reportaram aumento da expressão de HO-1 sob condições de estresse oxidativo, fornecendo evidências de que os produtos finais da degradação do heme, incluindo biliverdina, bilirrubina, e monóxido de carbono, podem exercer atividades de proteção contra lesão renal induzida por I/R através de efeitos antioxidante, anti-inflamatório e citoprotetores (CORREA-COSTA; AMANO; CÂMARA, 2012). A carga ácida promoveu aumento na expressão de HO-1 em ratos do grupo AM. Curiosamente, o grupo AM+I/R exibiu um aumento na expressão de HO-1 em comparação com os animais I/R. Uma explicação plausível para essa expressão aumentada pode envolver uma suposta liberação do heme de proteínas em células lesionadas (MAINES *et al.*, 1993; SHIMIZU *et al.*, 2000). Quando livre, é extremamente pró-oxidante, levando à formação de espécies reativas de oxigênio e com isso promovendo vários danos celulares. Um dos mecanismos de proteção contra os potenciais danos causados pelo heme livre é a enzima HO-1, responsável por catalisar a degradação oxidativa do heme (MAINES *et al.*, 1993; SHIMIZU *et al.*, 2000). Dessa forma, o aumento na expressão de HO-1 no grupo AM+I/R parece ser uma tentativa de aliviar a lesão renal exacerbada por alterações inflamatórias e vasculares. Estudos relataram que a acidose hipercápnica promoveu *upregulation* da expressão de HO-1 e melhorou a lesão pulmonar induzida por I/R (WU *et al.*, 2013).

Frente aos resultados obtidos com a realização deste estudo, podemos concluir que a maioria dos efeitos prejudiciais causados pelos estímulos lesivos

posteriores à lesão renal induzida por I/R foram agravados pela presença de um cenário ácido, sugerindo que a combinação de I/R e acidose podem levar a um dano renal mais proeminente sob estas circunstâncias.

Este estudo possui várias limitações. Em primeiro lugar, não avaliamos os efeitos de diferentes intensidades de acidose metabólica bem como os tipos, o que é inteiramente possível que diferentes tipos e graus de acidose metabólica possam produzir efeitos diferentes. Em segundo lugar, não podemos extrapolar nossos achados para a acidose láctica, uma etiologia comum de acidose metabólica em ambiente clínico. Em terceiro, não avaliamos a participação de citocinas inflamatórias para complementar os dados obtidos com NF- $\kappa$ B. Quarto, embora tenhamos utilizado dois modelos experimentais, acidose metabólica e lesão renal por I/R, existem diferenças importantes quando comparados ao quadro clínico em humanos, além disso, diferenças entre as espécies e modelos também devem ser consideradas. Como são duas condições clínicas frequentes em ambiente hospitalar, principalmente UTI, geralmente esses pacientes fazem uso de antibióticos e terapias de suporte tais como, ventilação mecânica e reanimação com líquidos. No nosso estudo, por uma razão importante optamos por não tratar os animais com antibióticos após o procedimento cirúrgico, haja vista, que essas terapias alteram a resposta inflamatória e poderiam mascarar os nossos resultados. Entretanto, reconhecemos que essa é claramente uma limitação destes tipos de estudos experimentais. Finalmente, a presente abordagem experimental não contemplou o estudo da participação de outras vias (por exemplo, o estresse oxidativo) que estão envolvidas no estabelecimento de acidose metabólica e podem piorar lesão renal aguda induzida por I/R, e esta questão merece uma investigação mais aprofundada.

CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

- A associação de acidose metabólica e insulto por I/R renal contribuíram positivamente para um significativo aumento da taxa de mortalidade;
- A I/R renal não ocasionou alterações nos gases sanguíneos e no pH enquanto que os animais que ingeriram solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  desenvolveram acidose metabólica. A combinação de ambos os insultos (acidose metabólica e I/R renal) intensificou o distúrbio metabólico;
- Os ratos submetidos à lesão renal por I/R apresentaram comprometimento da função tubular com repercussão em parâmetros da função renal. A presença prévia de acidose metabólica nesse contexto agravou ainda mais esses parâmetros;
- A análise histopatológica revelou que a I/R renal ocasionou dano nas células dos túbulos renais e esse cenário foi agravado na presença de acidose metabólica;
- A lesão renal por I/R provocou diminuição na expressão da eNOS em tecido renal, fenômeno não intensificado quando ambos os insultos (acidose metabólica e I/R renal) estavam presentes juntos;
- Em artérias renais, a I/R renal interferiu na resposta vasodilatadora produzida por acetilcolina, e essa alteração na função vascular não foi agravada pela presença de acidose metabólica;
- O NF- $\kappa$ B apresentou maior expressão em túbulos renais de ratos submetidos a I/R renal. Este aumento foi intensificado quando combinado com acidose metabólica. Condição semelhante ocorreu com a expressão da proteína HO-1.
- Por fim, respondendo à nossa hipótese, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a acidose metabólica exacerbou a lesão renal induzida por I/R.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em razão de sua relevância, o presente estudo oferece inúmeras possibilidades de abordagens que visam aprofundar e ampliar o entendimento da relação entre lesão renal aguda e o processo de manutenção do equilíbrio metabólico do organismo humano. Os resultados e as conclusões descritas nesse estudo permitem citar algumas sugestões para a elaboração de futuras abordagens. Por exemplo, existem três tipos básicos de modelos animais para o estudo de lesão renal aguda: isquemia/reperfusão; toxinas e modelos de sepse (BELLOMO *et al.*, 2004). Experimentalmente, um modelo comumente utilizado para mimetizar a LRA causada por septicemia é o de sepse induzida pela ligadura e punção do ceco (LPC), devido o conteúdo fecal se dispersar no peritônio e conseqüentemente ocasionar bacteremia e sepse, seguida de lesão renal (DOI *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2012). Esse modelo caracteriza-se por apresentar um perfil de citocinas inflamatórias similar ao que ocorre na LRA induzida por septicemia em humanos (DOI *et al.*, 2009). Dessa forma, seria interessante estudar a relação entre acidose metabólica e sepse, de forma a estabelecer uma possível correlação de resultados com o modelo de isquemia/reperfusão renal, já que a acidose metabólica também é frequentemente encontrada em pacientes com sepse grave e choque séptico (NORITOMI *et al.*, 2009). Além disso, a sepse é considerada a principal causa de LRA, principalmente, no ambiente de terapia intensiva (DOI *et al.*, 2009).

Igualmente pertinente seria avaliar o efeito do tratamento com álcalis (bicarbonato de sódio) para melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos prejudiciais da acidose metabólica sobre a função renal. Embora o valor da administração de bicarbonato nos distúrbios ácido-base e os critérios para a administração de bicarbonato possa variar amplamente, estudos sugerem que o tratamento com álcalis reduz a gravidade da lesão renal e diminui taxa de declínio do RFG em pacientes com RFG já reduzido, com ou sem acidose metabólica (KRAUT; KURTZ, 2005; KRAUT; MADIAS, 2010). Além disso, estudos realizados em ratos revelam que a acidose metabólica está associada com o desenvolvimento ou exacerbação de proteinúria, exacerbação da lesão tubulo-intersticial, e aceleração da progressão da insuficiência renal, eventos potencialmente revertidos pela normalização dos parâmetros ácido-base com bicarbonato de sódio ou citrato de sódio (KRAUT; KURTZ, 2005).

Consideramos também importante aprofundar os estudos relacionados à participação do componente inflamatório, de forma a acompanhar as alterações funcionais da maior ou menor expressão dos fatores aqui descritos com o agravamento ou com proteção das funções renais, como pode ser pensado para o perfil esperado em relação ao NF- $\kappa$ B e HO-1, respectivamente. Sendo essa associação possível de demonstração, é provável que a interferência nesses parâmetros possa resultar num perfil de menor mortalidade nos animais sujeitos simultaneamente aos insultos.



## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

AKSOY, N.; DOGAN, Y.; IRIADAM, M.; BITIREN, M.; UZER, E.; OZGONUL, A.; AKSOY, S. Protective and therapeutic effects of licorice in rats with acute tubular necrosis. **J Ren Nutr.**, v. 22, n. 3, p. 336-43, 2012.

ALLEYNE, G. A.; SCULLARD, G. H. Renal metabolic response to acid base changes. I. Enzymatic control of ammoniagenesis in the rat. **J Clin Invest.**, v. 48, n. 2, p. 364-370, 1969.

AMLAL, H.; CHEN, Q.; GREELEY, T.; PAVELIC, L.; SOLEIMANI, M. Coordinated down-regulation of NBC-1 and NHE-3 in sodium and bicarbonate loading. **Kidney Int.**, v. 60, n. 5, p. 1824-36, 2001.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; and OLIVEIRA, R. S., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. Disponível em: < <http://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>>. Acesso em: 04 dezembro 2015.

ARMANDO, I.; VOLPI, S.; AGUILERA, G.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. **Brain Res.**, v. 1142, p. 92-99, 2007.

ARNAL, J. F.; DINH-XUAN, A. T.; PUEYO, M.; DARBLADE, B.; RAMI, J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. **Cell Mol Life Sci.**, v. 55, p. 1078-87, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CENTROS DE DIÁLISE E TRANSPLANTE. **Imprensa nacional dá destaque ao dia mundial do rim.** Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.abcdt.org.br/saude-em-destaque/noticias/saude-em-destaque/dia-mundial-do-rim-2.html>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

AUGUSTINSSON, O.; FORSLID, A. Aldosterone secretion during acute respiratory acidosis and NH<sub>4</sub>Cl-induced metabolic acidosis in the goat. **Acta Physiol Scand.**, v. 136, p. 339–345, 1989.

BAE, E. H.; LEE, K. S.; LEE, J.; MA, S. K.; KIM, N. H.; CHOI, K. C.; FRØKIAER, J.; NIELSEN, S.; KIM, S. Y.; KIM, S. Z.; KIM, S. H.; KIM, S. W. Effects of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 294, n. 1, p. F272-80, 2008.

BASILE, D. P.; ANDERSON, M. D.; SUTTON, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. **Compr Physiol.**, v. 2, p.1303-53, 2012.

BELLOCQ, A.; SUBERVILLE, S.; PHILIPPE, C.; BERTRAND, F.; PEREZ, J.; FOUQUERAY, B.; CHERQUI, G.; BAUD, L. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. **J Biol Chem.**, v. 273, n. 9, p. 5086-92, 1998.

BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **Lancet.**, v. 380, p. 756-766, 2012.

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A.; MEHTA, R. L.; PALEVSKY, P. AND THE ADQI WORKGROUP. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R204-R212, 2004.

BENTO, L. M.; FAGIAN, M. M.; VERCESI, A. E.; GONTIJO, J. A. Effects of NH<sub>4</sub>Cl-induced systemic metabolic acidosis on kidney mitochondrial coupling and calcium transport in rats. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 22, n. 10, p. 2817-2823, 2007.

BETZ, B.; SCHNEIDER, R.; KRESS, T.; SCHICK, M. A.; WANNER, C.; SAUVANT, C. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. **PPAR Res.**, v. 2012, p. 219319, 2012.

BONVENTRE, J. V. Mediators of ischemic renal injury. **Annu Rev Med.**, v. 39, p. 531-44, 1988.

BONVENTRE, J. V.; WEINBERG, J. M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **J Am Soc Nephrol.**, v. 14, n. 8, p. 2199-210, 2003.

BRADY, H. R.; SINGER, G. G. Acute renal failure. **Lancet**, v. 346, p. 1533-1540, 1995.

BRODSKY, S. V.; YAMAMOTO, T.; TADA, T.; KIM, B.; CHEN, J.; KAJIYA, F.; GOLIGORSKY, M. S. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 282, n. 6, p. F1140-9, 2002.

BUCKALEW JR, V. M.; MCCURDY, D. K.; LUDWIG, G. D.; CHAYKIN, L. B.; ELKINTON, J. R. Incomplete renal tubular acidosis. Physiologic studies in three patients with a defect in lowering urine pH. **Am J Med.**, v. 45, v. 1, p. 32-42, 1968.

CHATTERJEE, P. K.; PATEL, N. S.; CUZZOCREA, S.; BROWN, P. A.; STEWART, K. N.; MOTA-FILIPPE, H.; BRITTI, D.; EBERHARDT, W.; PFEILSCHIFTER, J.; THIEMERMANN, C. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta (12,14)-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. **Cardiovasc Res.**, v. 61, p. 630-43, 2004.

CHAWLA, L. S.; AMDUR, R. L.; AMODEO, S.; KIMMEL, P. L.; PALANT, C.E. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. **Kidney Int.**, v. 79, n. 12, p. 1361-1369, 2011.

CHRISTOU, H.; BAILEY, N.; KLUGER, M. S.; MITSIALIS, S. A.; KOUREMBANAS, S. Extracellular acidosis induces heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 288, n. 6, p. H2647-52, 2005.

CHOWDHURY, A. H.; COX, E. F.; FRANCIS, S. T.; LOBO, D. N. A randomized, controlled, double-blind crossover study on the effects of 2-L infusions of 0.9% saline and plasma-lyte® 148 on renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers. **Ann Surg.**, v. 256, p. 18-24, 2012.

CHU, C.; HE, W.; KUANG, Y.; REN, K.; GOU, X. Celastrol protects kidney against ischemia-reperfusion-induced injury in rats. **J Surg Res.**, v. 186, p. 398-407, 2014.

CONG, G.; CUI, L.; ZANG, M.; HAO, L. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by a polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides*. **Int J Biol Macromol.**, v. 56C, p. 14-19, 2012.

CORREA-COSTA, M.; AMANO, M. T.; CÂMARA, N. O. Cytoprotection behind heme oxygenase-1 in renal diseases. **World J Nephrol.**, v. 1, p. 4-11, 2012.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000, 1251p.

COYLE, E. F.; GONZÁLEZ-ALONSO, J. Cardiovascular drift during prolonged exercise: new perspectives. **Exerc Sport Sci Rev.**, v. 29, n. 2, p. 88-92, 2001.

DE ARAUJO, M.; ANDRADE, L.; COIMBRA, T. M.; RODRIGUES JR, A. C.; SEGURO, A. C. Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure. **J Am Soc Nephrol.**, v. 16, p. 3339-49, 2005.

DE BRITO-ASHURST, I.; VARAGUNAM, M.; RAFTERY, M. J.; YAQOOB, M. M. Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. **J Am Soc Nephrol.**, v. 20, n. 9, p. 2075-2084, 2009.

DEVARAJAN, P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. **J Am Soc Nephrol.**, v. 17, p. 1503–1520, 2006.

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S.; STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **J Clin Invest.**, v. 119, n. 10, p. 2868-78, 2009.

DONNAHOO, K. K.; MELDRUM, D. R.; SHENKAR, R.; CHUNG, C. S.; ABRAHAM, E.; HARKEN, A. H. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFkappaB and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney. **J Urol.**, v. 163, p. 1328-32, 2000.

DORAI, T.; FISHMAN, A. I.; DING, C.; BATINIC-HABERLE, I.; GOLDFARB, D. S.; GRASSO, M. Amelioration of renal ischemia-reperfusion injury with a novel protective cocktail. **J Urol.**, v. 186, n. 6, p. 2448-2454, 2011.

EL ETER, E. A.; ALDREES, A. Inhibition of proinflammatory cytokines by SCH79797, a selective protease-activated receptor 1 antagonist, protects rat kidney against ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 37, n. 6, p. 639-644, 2012.

EL SABBAHY, M.; VAIDYA, V. S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.**, v. 3, n. 5, p. 606-18, 2011.

ELKINTON, J. R.; HUTH, E. J.; WEBSTER JR, G. D.; MCCANCE, R. A. The renal excretion of hydrogen ion in renal tubular acidosis. I. Quantitative assessment of the response to ammonium chloride as an acid load. **Am J Med.**, v. 29, p. 544-75, 1960.

EVANS, R. G.; FITZGERALD, S. M. Nitric oxide and superoxide in the renal medulla: a delicate balancing act. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 14, n. 1, p. 9-15, 2005.

ÉVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arq Bras Cardiol.**, v. 66, n. 4, p. 239-245, 1996.

ÉVORA, P. R. B.; REIS, C. L.; FEREZ, M. A.; CONTE, D. A.; GARCIA, L. V. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio ácido básico: Uma revisão prática. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 32, p. 451-469, 1999.

FAN, Y. Y.; SHEN, Z.; HE, P.; JIANG, L.; HOU, W. W.; SHEN, Y.; ZHANG, X. N.; HU, W. W.; CHEN, Z. A novel neuroprotective strategy for ischemic stroke: transient mild acidosis treatment by CO<sub>2</sub> inhalation at reperfusion. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 34, p. 275-83, 2014.

FAROQUI, S.; SHERIFF, S.; AMLAL, H. Metabolic acidosis has dual effects on sodium handling by rat kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 291, p. F322–F331, 2006.

FELDMAN, G. M. Effect of chronic metabolic acidosis on net electrolyte transport in rat colon. **Am J Physiol.**, v. 256, n. 6, p. G1036-G1040, 1989.

FERENBACH, D. A.; KLUTH, D. C.; HUGHES J. Hemeoxygenase-1 and renal ischaemia-reperfusion injury. **Nephron Exp Nephrol.**, v. 115, p. e33-7, 2010.

FOGLIENI, C.; FULGENZI, A.; TICOZZI, P.; PELLEGATTA, F.; SCIORATI, C.; BELLONI, D.; FERRERO, E.; FERRERO, M. E. Protective effect of EDTA preadministration on renal ischemia. **BMC Nephrol.**, v. 7, p. 5, 2006.

FOUAD, A. A.; AL-MULHIM, A. S.; JRESAT, I.; MORSY, M. A. Protective effects of captopril in diabetic rats exposed to ischemia/reperfusion renal injury. **J Pharm Pharmacol.**, v. 65, p. 243-52, 2013.

GAO, W.; LIU, D.; LI, D.; CHE, X.; CUI, G. Effects of hypercapnia on T cells in lung ischemia/reperfusion injury after lung transplantation. **Exp Biol Med.**, v. 239, p. 1597-605, 2014.

GIEBISCH, G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. **Am J Physiol.**, v. 274, p. F817-33, 1998.

GIRALDEZ, R. R.; PANDA, A.; XIA, Y.; SANDERS, S. P.; ZWEIER, J. L. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. **J Biol Chem.**, v. 272, p. 21420-6, 1997.

GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Understanding Acid Base Disorders. **Crit Care Clin.**, v. 31, n. 4, p. 849-60, 2015.

GONÇALVES, G. M.; CENEDEZE, M. A.; FEITOZA, C. Q.; WANG, P. M.; BERTOCCHI, A. P.; DAMIÃO, M. J.; PINHEIRO, H. S.; ANTUNES TEIXEIRA, V. P.; DOS REIS, M. A.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. The role of heme

oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury. **Kidney Int.**, v. 70, p. 1742-9, 2006.

GRENZ, A.; ECKLE, T.; ZHANG, H.; HUANG, D. Y.; WEHRMANN, M.; KÖHLE, C.; UNERTL, K.; OSSWALD, H.; ELTZSCHIG, H. K. Use of a hanging-weight system for isolated renal artery occlusion during ischemic preconditioning in mice. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.292, n. 1, p. F475–F485, 2007.

GUELER, F.; GWINNER, W.; SCHWARZ, A.; HALLER, H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. **Kidney Int.**, v.66, n. 2, p. 523-527, 2004.

HALDANE, J. B. Experiments on the regulation of the blood's alkalinity: II. **J Physiol.**, v. 55, p. 265-275, 1921.

HAMM, L. L.; NAKHOUL, N.; HERING-SMITH, K. S. Acid-Base Homeostasis. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 10, n. 12, p. 2232-42, 2015.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biology and clinical of rabbits and rodents**. 3 ed. São Paulo: Roca, 1993, 238p.

HEYMAN, S. N.; ROSENBERGER, C.; ROSEN, S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths-the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. **Kidney Int.**, v. 77, n. 1, p. 9-16, 2010.

HO, P. W.; PANG, W. F.; SZETO, C. C. Remote ischemic pre-conditioning for the prevention of acute kidney injury. **Nephrology (Carlton)**, 2015. doi: 10.1111/nep.12614.

HOOPER, L.; BUNN, D.; JIMOH, F. O.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Water-loss dehydration and aging. **Mech Ageing Dev.**, v. 136, n. 137, p. 50-8, 2014.

HOSTE, E. A.; DE CORTE, W. Clinical consequences of acute kidney injury. **Contrib. Nephrol.**, v. 174, p. 56-64, 2011.

HUSSEIN, A. A.; EL-DKEN, Z. H.; BARAKAT, N.; ABOL-ENEIN, H. Renal ischaemia/reperfusion injury: possible role of aquaporins. **Acta Physiol. (Oxf)**, v. 204, p. 308-316, 2012.

JENSEN, J. C.; BURESH, C.; NORTON, J. A. Lactic acidosis increases tumor necrosis factor secretion and transcription in vitro. **J Surg Res.**, v. 49, p. 350–353, 1990.

JIANG, W.; PROKOPENKO, O.; WONG, L.; INOUE, M.; MIROCHNITCHENKO, O. IRIP, a new ischemia/reperfusion-inducible protein that participates in the regulation of transporter activity. **Mol Cell Biol.**, v. 25, n. 15, p. 6496-6508, 2005.

JUNG, H. Y.; KIM, D. W.; YIM, H. S.; YOO, D. Y.; KIM, J. W.; WON, M. H.; YOON, Y. S.; CHOI, S. Y.; HWANG, I. K. Heme Oxygenase-1 Protects Neurons from Ischemic Damage by Upregulating Expression of Cu, Zn-Superoxide Dismutase, Catalase, and Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Rabbit Spinal Cord. **Neurochem Res.**, p. 1-11, 2015.

KELLUM, J. A.; SONG, M.; ALMASRI, E. Hyperchloremic acidosis increases circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. **Chest**, v. 130, p. 962-7, 2006.

KELLUM, J. A.; SONG, M.; VENKATARAMAN, R. Effects of hyperchloremic acidosis on arterial pressure and circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. **Chest**, v. 125, n. 1, p. 243-8, 2004.

KELLUM, J. A.; SONG, M.; LI, J. Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS- stimulated RAW 264.7 cells. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, p. R686– R692, 2004.

KINSEY, G. R.; LI, L.; OKUSA, M. D. Inflammation in acute kidney injury. **Nephron Exp Nephrol**, v.109, n. 4, p. e102-e107, 2008.

KOÇ, M.; KUMRAL, Z. N.; ÖZKAN, N.; MEMİ, G.; KAÇAR, Ö.; BİLSEL, S.; ÇETİNEL, Ş.; YEĞEN, B. Ç. Obestatin improves ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats via its antioxidant and anti-apoptotic effects: role of the nitric oxide. **Peptides**, v. 60, p. 23-31, 2014.

KOMURAI, M.; ISHII, Y.; MATSUOKA, F.; TOYAMA, K.; OMINATO, M.; SATO, T.; MAEBA, T.; KIMURA, K.; OWADA, S. Role of nitric oxide synthase activity in experimental ischemic acute renal failure in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 244, n. 1-2, p. 129-33, 2003.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. **Can J Surg**, v. 56, n. 1, p. 6-14, 2013.

KRAUT, J. A. Effect of metabolic acidosis on progression of chronic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 300, n. 4, p. F828-829, 2011.

KRAUT, J. A.; KURTZ, I. Metabolic acidosis of CKD: Diagnosis, clinical characteristics, and treatment. **Am J Kidney Dis**, v. 45, p. 978–993, 2005.

KRAUT, J. A.; MADIAS, N. E. Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. **Nat Rev Nephrol**, v. 6, n. 5, p. 274-285, 2010.

KRAUT, J. A.; MADIAS, N. E. Consequences and therapy of the metabolic acidosis of chronic kidney disease. **Pediatr Nephrol**, v. 26, p. 19–28, 2011.

LARDNER, A. L.; O'DONOVAN, D. J. The effect of ammonium chloride on hepatic and renal metabolism in the rat. **Kidney Blood Press Res**, v. 20, n. 1, p. 57-61, 1997.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.

LEE HAMM, L.; HERING-SMITH, K. S.; NAKHOUL, N. L. Acid-base and potassium homeostasis. **Semin Nephrol**, v. 33, p. 257-64, 2013.

LIAMIS, G.; MILIONIS, H. J.; ELISAF, M. Pharmacologically-induced metabolic acidosis: a review. **Drug Saf**, v. 33, n. 5, p. 371-391, 2010.

LIBÓRIO, A. B.; LEITE, T. T.; NEVES, F. M.; TELES, F.; BEZERRA, C. T. AKI complications in critically ill patients: association with mortality rates and RRT. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 10, n. 1, p. 21-8, 2015.

LIEBERTHAL, W.; NIGAM, S. K. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 278, n. 1, p. F1-F12, 2000.

MAINES, M. D.; MAYER, R. D.; EWING, J. F.; MCCOUBREY, W. K. JR. Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 264, p. 457-62, 1993.

MÁRQUEZ-GONZÁLEZ, H.; PÁMANES-GONZÁLEZ, J.; MÁRQUEZ-FLORES, H.; GÓMEZ-NEGRET, A.; MUÑOZ-RAMÍREZ, M. C.; VILLA-ROMERO, A. R. What you should know of the arterial blood gases during the watch. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc.**, v. 50, n. 4, p. 389-96, 2012.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPAVA-STITZER, S. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis in the rat. **J Physiol.**, v. 280, p. 487-97, 1978.

MEHTA, R. L.; KELLUM J. A.; SHAH, S. V.; MOLITORIS, B. A.; RONCO, C.; WARNOCK, D. G.; LEVIN, A. AND THE ACUTE KIDNEY INJURY NETWORK. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Critical Care**, v. 11, n. 2, R31, 2007.

MICHEL, F. S.; MAN, R. Y.; VANHOUTTE, P. M. Increased spontaneous tone in renal arteries of spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 293, n. 3, p. H1673-81, 2007.

MITTERBAUER, C.; SCHWARZ, C.; HAUSER, P.; STEININGER, R.; REGELE, H. M.; ROSENKRANZ, A.; OBERBAUER, R. Impaired tubule interstitial expression of endothelin-1 and nitric oxide isoforms in donor kidney biopsies with postischemic acute renal failure. **Transplantation**, v. 76, n. 4, p. 715-20, 2003.

MORIMOTO, K.; OHTA, K.; YACHIE, A.; YANG, Y.; SHIMIZU, M.; GOTO, C.; TOMA, T.; KASAHARA, Y.; YOKOYAMA, H.; MIYATA, T.; SEKI, H.; KOIZUMI, S. Cytoprotective role of heme oxygenase (HO)-1 in human kidney with various renal diseases. **Kidney Int.**, v. 60, n. 5, p. 1858-66, 2001.

MUNSHI, R.; HSU, C.; HIMMELFARB, J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. **BMC Med.**, v. 9, p. 11, 2011.

NAGY, T. R.; KRZYWANSKI, D.; LI, J.; MELETH, S.; DESMOND, R. Effect of group vs. single housing on phenotypic variance in C57BL/6J mice. **Obes Res.**, v. 10, n. 5, p. 412-5, 2002.

NATH, K. A. The role of renal research in demonstrating the protective properties of heme oxygenase-1. **Kidney International**, v. 83, p. 1-4, 2013.



NATH, K. A.; HOSTETTER, M. K.; HOSTETTER, T. H. Pathophysiology of chronic tubule interstitial disease in rats. Interactions of dietary acid load, ammonia, and complement component C3. **J Clin Invest.**, v. 76, p. 667–675, 1985.

NOWIK, M.; KAMPIK, N. B.; MIHAILOVA, M.; ELADARI, D.; WAGNER, C. A. Induction of metabolic acidosis with ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) in mice and rats—species differences and technical considerations. **Cell Physiol Biochem.**, v. 26, n. 6, p. 1059-1072, 2010.

NORITOMI, D. T.; SORIANO, F. G.; KELLUM, J. A.; CAPPI, S. B.; BISELLI, P. J.; LIBÓRIO, A. B.; PARK, M. Metabolic acidosis in patients with severe sepsis and septic shock: a longitudinal quantitative study. **Crit Care Med.**, v. 37, n. 10, p. 2733-2739, 2009.

NUNES, D. C. S.; FAVALI, C. B. F.; SOUZA-FILHO, A. A.; DA SILVA, A. C. M.; FILGUEIRAS, T. M.; SILVA LIMA, M. G. Evaluation of cellular profile and main constituents of the rat and mouse blood from the animal house of the Federal University of Ceará, Brasil. **Rev. Med. UFC**, v. 34, n. 1-2, 1994.

O'DELL, E.; TIBBY, S. M.; DURWARD, A.; MURDOCH, I. A. Hyperchloremia is the dominant cause of metabolic acidosis in the postresuscitation phase of pediatric meningococcal sepsis. **Crit Care Med.**, v. 35, n. 10, p. 2390-2394, 2007.

ORTIZ, P. A.; GARVIN, J. L. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 282, n. 5, p. 777-84, 2002.

OSTER, J. R.; HOTCHKISS, J. L.; CARBON, M.; FARMER, M.; VAAMONDE, C. A. A short duration renal acidification test using calcium chloride. **Nephron.**, v. 14, p. 281-92, 1975.

PARK, Y.; HIROSE, R.; DANG, K.; XU, F.; BEHRENDT, M.; TAN, V.; ROBERTS, J. P.; NIEMANN, C. U. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. **Surgery**, v. 143, n. 2, p. 243-51, 2008.

PARK, M.; TANIGUCHI, L. U.; NORITOMI, D. T.; LIBÓRIO, A. B.; MACIEL, A. T.; CRUZ-NETO, L. M. Clinical utility of standard base excess in the diagnosis and interpretation of metabolic acidosis in critically ill patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 241-249, 2008.

PEDOTO, A.; NANDI, J.; OLER, A.; CAMPORESI, E. M.; HAKIM, T. S.; LEVINE, R. A. Role of nitric oxide in acidosis-induced intestinal injury in anesthetized rats. **J Lab Clin Med.**, v. 138, p. 270-276, 2001.

PEPPICELLI, S.; BIANCHINI, F.; CONTENNA, C.; TOMBACCINI, D.; CALORINI, L. Acidic pH via NF-κB favours VEGF-C expression in human melanoma cells, **Clin Exp Metastasis**, v. 30, p. 957-67, 2013.

PEREIRA, B. J.; CASTRO I.; BURDMANN, E. A.; MALHEIROS, D. M. A.; YU, L. Effects of sirolimus alone or in combination with cyclosporine A on renal ischemia/reperfusion injury. **Braz J Med Biol Res.**, v. 43, p. 737-744, 2010.

PHISITKUL, S.; HACKER, C.; SIMONI, J.; TRAN, R. M.; WESSON, D. E. Dietary protein causes a decline in the glomerular filtration rate of the remnant kidney mediated by metabolic acidosis and endothelin receptors. **Kidney Int.**, v. 73, p. 192–199, 2008.

POMPERMAYER, K.; SOUZA, D. G.; LARA, G. G.; SILVEIRA, K. D.; CASSALI, G. D.; ANDRADE, A. A.; BONJARDIM, C. A.; PASSAGLIO, K. T.; ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; VIEIRA, M. A.; TEIXEIRA, M. M. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Kidney Int.**, v. 67, p. 1785-96, 2005.

PONCE, D.; ZORZENON, C. P. F.; SANTOS, N. Y. D.; TEIXEIRA, U. A.; BALBI, A. L. Injúria renal aguda em unidade de terapia intensiva: Estudo prospectivo sobre a incidência, fatores de risco e mortalidade. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 321-326, 2011.

POUKKANEN, M.; WILKMAN, E.; VAARA, S. T.; PETTILÄ, V.; KAUKONEN, K. M.; KORHONEN, A. M.; UUSARO, A.; HOVILEHTO, S.; INKINEN, O.; LARU-SOMPA, R.; HAUTAMÄKI, R.; KUITUNEN, A.; KARLSSON, S. Hemodynamic variables and progression of acute kidney injury in critically ill patients with severe sepsis: data from the prospective observational FINNAKI study. **Crit Care**, v. 17, n. 6, p. R295, 2013.

POWERS JR, W. J. **Renal Toxicology: Renal Function Parameters for Adult Fischer-344, Sprague-Dawley, and Wistar Rats.** In: DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. A. Handbook of Toxicology. Capítulo 10, 2 ed. Florida: CRC Press LLC, 2002.

QUENTIN, F.; CHAMBREY, R.; TRINH-TRANG-TAN, M. M.; FYSEKIDIS, M.; CAMBILLAU, M.; PAILLARD, M.; ARONSON, P. S.; ELADARI, D. The Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 287, p. 1179-1188, 2004.

RAMALHO, R. J.; DE OLIVEIRA, P. S.; CAVAGLIERI, R. C.; SILVA, C.; MEDEIROS, P. R.; FILHO, D. M.; POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F.; NORONHA, I. L. Hyperbaric oxygen therapy induces kidney protection in an ischemia/reperfusion model in rats. **Transplant Proc.**, v. 44, p. 2333-6, 2012.

RIELLA, M. C.; PACHALY, M. A. **Metabolismo da água.** In: **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 9, pag. 100-31, 2003.

RIZZO, M.; CAPASSO, G.; BLEICH, M.; PICA, A.; GRIMALDI, D.; BINDELS, R. J.; GREGER, R. Effect of chronic metabolic acidosis on calbindin expression along the rat distal tubule. **J Am Soc Nephrol.**, v. 11, p. 203–210, 2000.

ROCCO, J. R. Diagnóstico dos distúrbios do metabolismo ácido-base. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 15, n. 4, p. 184-192, 2003.

ROCKTAESCHEL, J.; MORIMATSU, H.; UCHINO, S.; GOLDSMITH, D.; POUSTIE, S.; STORY, D.; GUTTERIDGE, G.; BELLOMO, R. Acid-base status of critically ill patients with acute renal failure: analysis based on Stewart-Figge methodology. **Crit Care**, v. 7, n. 4, p. R60, 2003.

RODRÍGUEZ-SINOVAS, A.; CABESTRERO, A.; GARCÍA DEL BLANCO, B.; INSERTE, J.; GARCÍA, A.; GARCÍA-DORADO, D. Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs. **Basic Res Cardiol.**, v. 104, p. 761-71, 2009.

SANCHO-MARTÍNEZ, S. M.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. **Clin Kidney J.**, v. 8, n. 5, p. 548-59, 2015.

SANTOS, M. R. V.; SOUZA, V. H.; MENEZES, I. A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO, A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L. J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, 2010.

SCANNELL, G. Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions. **New Horiz.**, v. 4, n. 2, p. 179-183, 1996.

SCHLICHTIG, R.; GROGONO, A. W.; SEVERINGHAUS, J. W. Human PaCO<sub>2</sub> and standard base excess compensation for acid-base imbalance. **Crit Care Med.**, v. 26, n. 7, p. 1173-9, 1998.

SCHREIJER, A. J.; REITSMA, P. H.; CANNEGIETER, S. C. High hematocrit as a risk factor for venous thrombosis. Cause or innocent bystander? **Haematologica**, v. 95, n. 2, p. 182-4, 2010.

SCHWILK, B.; WIEDECK, H.; STEIN, B.; REINELT, H.; TREIBER, H.; BOTHNER, U. Epidemiology of acute renal failure and outcome of haemodiafiltration in intensive care. **Intensive Care Med.**, v. 23, n. 12, p. 1204-1211, 1997.

SESSO, R. C. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; WATANABE, Y.; DOS SANTOS, D. R. Diálise Crônica no Brasil - Relatório do Censo Brasileiro de Diálise 2011. **J Bras Nefrol.**, v. 34, n. 3, p. 272-277, 2012.

SESSO, R. C. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; WATANABE, Y.; DOS SANTOS, D. R. Diálise Crônica no Brasil - Relatório do Censo Brasileiro de Diálise 2012. **J Bras Nefrol.**, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2014.

SHIMIZU, H.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; YAMASAKI, A.; FUJIWARA, T.; ODAKA, Y.; HIRAKAWA, M.; FUJITA, H.; AKAGI, R. Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. **Crit Care Med.**, v. 28, p. 809-17, 2000.

SILVA, P. H.; GIRARDI, A. C.; NERI, E. A.; REBOUÇAS, N. A. Distinct mechanisms underlie adaptation of proximal tubule Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 in response to chronic metabolic and respiratory acidosis. **Pflugers Arch.**, v. 463, p. 703-14, 2012.

SINGBARTL, K.; KELLUM, J. A. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. **Kidney Int.**, v. 81, p. 819-825, 2012.

SINGH, A. P.; MUTHURAMAN, A.; JAGGI, A. S.; SINGH, N.; GROVER, K.; HAWAN, R. Animal models of acute renal failure. **Pharmacol Rep.**, v. 64, p. 31-44, 2012.

SKRYPNYK, N. I.; HARRIS, R. C.; DE CAESTECKER, M. P. Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice. **J Vis Exp.**, v. 78, 2013.

SOUZA, A. C.; VOLPINI, R. A.; SHIMIZU, M. H.; SANCHES, T. R.; CAMARA, N. O.; SEMEDO, P.; RODRIGUES, C. E.; SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- $\kappa$ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 302, p. f1045-54, 2012.

SRISAWAT, N.; KELLUM, J. A. Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. **Current Opinion in Critical Care**, v. 17, p. 548–555, 2011.

SUTTON, T. A.; FISHER, C. J.; MOLITORIS, B. A. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 62, p. 1539-1549, 2002.

TAMASHIRO, K. L.; NGUYEN, M. M.; OSTRANDER, M. M.; GARDNER, S. R.; MA, L. Y.; WOODS, S. C.; SAKAI, R. R. Social stress and recovery: implications for body weight and body composition. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 293, p. R1864-74, 2007.

TULAFU, M.; MITAKA, C.; HNIN SI, M. K.; ABE, S.; KITAGAWA, M.; IKEDA, S.; EISHI, Y.; KURATA, S.; TOMITA, M. Atrial natriuretic peptide attenuates kidney-lung crosstalk in kidney injury. **J Surg Res.**, v. 186, n. 1, p. 217-25, 2014.

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

UJIE, K.; YUEN, J.; HOGARTH, L.; DANZIGER, R.; STAR, R. A. Localization and regulation of endothelial no synthase mRNA expression in rat kidney. **Am J Physiol.**, v. 267, p. F296-302, 1994.

WANG, F.; YU, G.; LIU, S. Y.; LI, J. B.; WANG, J. F.; BO, L. L.; QIAN, L. R.; SUN, X. J.; DENG, X. M. Hydrogen-rich saline protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **J Surg Res.**, v. 167, n. 2, p. e339-344, 2011.

WANG, H. H.; ZHOU, H. Y.; CHEN, C. C.; ZHANG, X. L.; CHENG, G. Propofol attenuation of renal ischemia/reperfusion injury involves heme oxygenase-1. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 28, n. 8, p. 1175-80, 2007.

WANG, Y. P.; LI, G.; MA, L. L.; ZHENG, Y.; ZHANG, S. D.; ZHANG, H. X.; QIU, M.; MA, X. Penethyclidine hydrochloride ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. **J Surg Res.**, v. 186, p. 390-7, 2014.

WEVER, K. E.; WAGENER, F. A. D. T. G.; FRIELINK, C.; BOERMAN, O. C.; SCHEFFER, G. J.; ALLISON, A.; MASEREEUW, R.; RONGEN, G. A. Diannexin Protects against Renal Ischemia Reperfusion Injury and Targets Phosphatidylserines in Ischemic Tissue. **PLoS One**, v. 6, n. 8, e24276, 2011.

WILLIAMS, P.; LOPEZ, H.; BRITT, D.; CHAN, C.; EZRIN, A.; HOTTENDORF, R. Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 37, n. 1, p. 1–7, 1997.

WOOD, C. E.; CHEN, H. G. Acidemia stimulates ACTH, vasopressin, and heart rate responses in fetal sheep. **Am J Physiol.**, v. 257, p. R344–R349, 1989.

WU, S. Y.; LI, M. H.; KO, F. C.; WU, G. C.; HUANG, K. L.; CHU, S. J. Protective effect of hypercapnic acidosis in ischemia-reperfusion lung injury is attributable to upregulation of heme oxygenase-1. **PLoS One**, v. 8, p. e74742, 2013.

XU, Y. F.; LIU, M.; PENG, B.; CHE, J. P.; ZHANG, H. M.; YAN, Y.; WANG, G. C.; WU, Y. C.; ZHENG, J. H. Protective effects of SP600125 on renal ischemia-reperfusion injury in rats. **J Surg Res.**, v. 169, p. e77-84, 2011.

YAMASHITA, J.; OGATA, M.; ITOH, M.; YAMASOWA, H.; SHIMEDA, Y.; TAKAOKA, M.; MATSUMURA, Y. Role of nitric oxide in the renal protective effects of ischemic preconditioning. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 42, n. 3, p. 419-27, 2003.

YAMASOWA, H.; SHIMIZU, S.; INOUE, T.; TAKAOKA, M.; MATSUMURA, Y. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 312, n. 1, p. 153-9, 2005.

YOSHIDA, M.; HONMA, S. Regeneration of Injured Renal Tubules. **J Pharmacol Sci.**, v. 124, n. 2, p. 117–22, 2014.

YUNOS, N. M.; BELLOMO, R.; HEGARTY, C.; STORY, D.; HO, L.; BAILEY, M. Association between a chloride-liberal vs chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. **JAMA**, v. 308, p. 1566-72, 2012.

ZAGER, R. A.; JOHNSON, A. C.; BECKER, K. Plasma and urinary heme oxygenase-1 in AKI. **J Am Soc Nephrol.**, v. 23, n. 6, p. 1048-1057, 2012.

ZENG, X.; MCMAHON, G. M.; BRUNELLI, S. M.; BATES, D. W.; WAIKAR, S. S. Incidence, outcomes, and comparisons across definitions of AKI in hospitalized individuals. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 9, n. 1, p. 12-20, 2014.

ZHENG, C. M.; LIU, W. C.; ZHENG, J. Q.; LIAO, M. T.; MA, W. Y.; HUNG, K. C.; LU, C. L.; WU, C. C.; LU, K. C. Metabolic acidosis and strong ion gap in critically ill patients with acute kidney injury. **Biomed Res Int.**, v. 2014, p. 819528, 2014.

ZHOU, J.; LIU, Y.; TANG, Y.; LIU, F.; ZHANG, L.; ZENG, X.; FENG, Y.; TAO, Y.; YANG, L.; FU, P. A comparison of RIFLE, AKIN, KDIGO, and Cys-C criteria for the definition of acute kidney injury in critically ill patients. **Int Urol Nephrol.**, v. 11, 2015.

# APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: METABOLIC ACIDOSIS AGGRAVATES EXPERIMENTAL ACUTE KIDNEY INJURY

Life Sciences 146 (2016) 58–65



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lifescie](http://www.elsevier.com/locate/lifescie)

## Metabolic acidosis aggravates experimental acute kidney injury



Patrícia Andréa da Fonseca Magalhães<sup>a</sup>, Teresinha Silva de Brito<sup>b</sup>, Rosemayre Souza Freire<sup>c</sup>,  
Moisés Tolentino Bento da Silva<sup>b</sup>, Armênio Aguiar dos Santos<sup>b</sup>, Mariana Lima Vale<sup>b</sup>,  
Dalgimar Beserra de Menezes<sup>d</sup>, Alice Maria Costa Martins<sup>e</sup>, Alexandre Braga Libório<sup>f,g</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil<sup>b</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil<sup>c</sup> Analytic Centre, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil<sup>d</sup> Department of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil<sup>e</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil<sup>f</sup> Department of Clinical Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil<sup>g</sup> Universidade de Fortaleza, UNIFOR, Fortaleza, CE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 August 2015

Received in revised form 30 November 2015

Accepted 6 January 2016

Available online 7 January 2016

#### Keywords:

Metabolic acidosis

Renal injury

Heme-oxygenase 1

Nuclear factor  $\kappa$ B

Acute kidney injury

### ABSTRACT

**Aims:** Ischemia/reperfusion (I/R) injury and metabolic acidosis (MA) are two critical conditions that may simultaneously occur in clinical practice. The result of this combination can be harmful to the kidneys, but this issue has not been thoroughly investigated. The present study evaluated the influence of low systemic pH on various parameters of kidney function in rats that were subjected to an experimental model of renal I/R injury.

**Main methods:** Metabolic acidosis was induced in male Wistar rats by ingesting ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) in tap water, beginning 2 days before ischemic insult and maintained during the entire study. Ischemia/reperfusion was induced by clamping both renal arteries for 45 min, followed by 48 h of reperfusion. Four groups were studied: control (subjected to sham surgery,  $n = 8$ ), I/R ( $n = 8$ ), metabolic acidosis (MA; 0.28 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution and sham surgery,  $n = 6$ ), and MA + I/R (0.28 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution plus I/R,  $n = 9$ ).

**Key findings:** Compared with I/R rats, MA + I/R rats exhibited higher mortality (50 vs. 11%,  $p = 0.03$ ), significant reductions of blood pH, plasma bicarbonate (pBic), and standard base excess (SBE), with a severe decline in the glomerular filtration rate and tubular function. Microscopic tubular injury signals were detected. Immunofluorescence revealed that the combination of MA and I/R markedly increased nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and heme-oxygenase 1 (HO-1), but it did not interfere with the decrease in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression that was caused by I/R injury.

**Significance:** Acute ischemic kidney injury is exacerbated by acidic conditions.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Acute kidney injury (AKI) remains a tremendous problem in clinical practice, affecting approximately 20% of hospitalized patients and half of critically ill patients who are admitted to intensive care units [1,2,3]. It is also a recurrent condition in allograft survival in patients who undergo kidney transplantation [4]. The pathophysiology of renal injury that is induced by ischemia/reperfusion (I/R) includes myriad events that are not limited to changes in renal hemodynamics and also include tubular damage, the recruitment of inflammatory mediators, and the release of reactive oxygen species [5,6,7]. Because of its multifactorial nature, a better understanding of the underlying mechanisms of AKI and definitive therapeutic approaches to this important clinical situation remain challenging.

Metabolic acidosis (MA) is a frequently encountered acid–base disturbance in critically ill patients [8]. The etiology of MA includes many factors, including lactic acidosis, ketoacidosis, rapid volume expansion with saline, renal failure, and others. Metabolic acidosis can be present in many patients who experience renal injury. Metabolic acidosis

increases the presence of inflammatory molecules in experimental sepsis [9]. Moreover, MA can reduce renal blood flow in healthy human volunteers [10] and increase nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) DNA binding and inflammatory mediator release [11]. However, to the best of our knowledge, no study has evaluated the impact of MA on the severity of ischemic AKI. To investigate this issue, the present study examined the impact of MA on renal I/R injury. We hypothesized that MA that is induced by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  will increase the severity of I/R injury. In order to elucidate the detrimental effects of MA on rat renal tissues under ischemic AKI, we evaluated the tubular injury and the expression of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), NF- $\kappa$ B and heme-oxygenase 1 (HO-1).

### 2. Material and methods

#### 2.1. Animals

Male Wistar rats, weighing 270–320 g, were obtained from the central animal facility of the Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará,

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.007>

0024-3205/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.



Brazil. Before any procedure, the animals were maintained under standard laboratory conditions (12 h/12 h light/dark cycle) at 22–25 °C with free access to standard chow (Biotec) and tap water. Animals were cared for in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH Publication 85-23, revised 1996). The study was approved by our Institutional Ethics Committee for Animal Research (CEUA-UFC protocol no. 32/13).

## 2.2. Metabolic acidosis induction

Metabolic acidosis was induced based on well-established protocols to produce moderate acidosis in response to standard 0.28 M ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) in drinking water [12]. The animals were individually maintained in metabolic cages for 5 consecutive days. The first 3 days were dedicated to acclimatization. Beginning on the second day, the animals began to drink a solution with 0.28 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). After 48 h of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ingestion, the rats were subjected to surgical procedures to induce renal ischemia (described below). After surgical recovery, the animals were placed again in individual metabolic cages, and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ingestion was maintained for an additional 2 days. Control animals ingested only tap water for 5 days and underwent the same surgical procedures, with the exception of renal ischemia induction (see below). All of the animals were provided standard chow *ad libitum* during the first 4 days of experimentation, with the exception of the 12 h period before the renal I/R surgical procedures. On the last day, the animals were fasted. Fluid intake and urine output were measured every 24 h.

## 2.3. Surgical procedures for induction of renal ischemia/reperfusion

Forty-eight hours after the induction of MA, each rat was weighed and anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). A midline laparotomy incision was made, and ischemic renal failure was induced by clamping both renal arteries with a non-traumatic clamp for 45 min, followed by reperfusion. The procedure was performed on a heated pad to maintain body temperature at 37 °C. After 48 h, mean arterial pressure was measured through a catheter that was inserted in the carotid artery, and the animals were sacrificed to obtain blood samples for the biochemical tests. Heart rate was estimated based on pulse-pressure traces. The left kidneys were collected for histological and immunofluorescent evaluation.

## 2.4. Experimental groups

The rats were randomly divided into the following groups: control (CTL;  $n = 8$ ; free access to tap water and subjected to sham surgical procedures without bilateral clamping of the renal arteries), MA ( $n = 6$ ; free access to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution instead of tap water for 48 h before and after the surgical procedures and subjected to sham surgical procedures without bilateral clamping of the renal arteries), I/R ( $n = 8$ ; free access to tap water and subjected to bilateral clamping of the renal arteries for 45 min, followed by reperfusion), MA + I/R ( $n = 9$ ; free access to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution instead of tap water for 48 h before and after the surgical procedures and subjected to bilateral clamping of the renal arteries for 45 min, followed by reperfusion).

## 2.5. Measurement of biochemical parameters

Immediately after collection, blood samples were analyzed using a gasometer device (COBAS B 121, Roche, Mannheim, Germany) to determine arterial blood gas, hematocrit, and osmolality. The blood samples were centrifuged at 3500 rotations per minute (rpm) for 10 min at 4 °C to obtain plasma, which was maintained at  $-80$  °C for subsequent creatinine (Cr), urea (BUN), and electrolyte ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$ ) determination. Twenty-four-hour urine samples were collected in light-

protected bottles under mineral oil at room temperature (22–25 °C). After removing the oil phase, the urine samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 min at room temperature and pH was measured immediately using pHmeter (Marte, MD-10, São Paulo, Brazil). Subsequently, the resulting supernatant was maintained at  $-80$  °C until further analysis (creatinine, urea and electrolytes). Plasma and urine Cr and BUN levels were determined by colorimetry using a spectrophotometer (Bio Plus, Bio 200, São Paulo, Brazil) and commercial kits (Labtest Diagnostics, Minas Gerais, Brazil). Plasma and urine  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$  levels were determined using ion-selective electrodes (Model 9180, Roche, Mannheim, Germany). These values allowed us to estimate creatinine clearance ( $\text{CrCl}$ ), which is used as an indicator of the glomerular filtration rate (GFR) and fractional excretion of sodium ( $\text{FE}_{\text{Na}^+}$ ), potassium ( $\text{FE}_{\text{K}^+}$ ), and chloride ( $\text{FE}_{\text{Cl}^-}$ ). All assessments were blinded.

## 2.6. Histological analysis

Renal tissue was fixed in 10% buffered formalin for 24 h and then maintained in 70% alcohol for subsequent processing in paraffin for the histological and immunofluorescence studies. Slices (4  $\mu\text{m}$  thick) were obtained and stained with hematoxylin and eosin. The sections were observed by light microscopy (400 $\times$  magnification) to assess the presence of tubular cell necrosis, tubular dilation, inflammatory cell infiltration, and cellular edema in the tubular interstitium from 10 non-overlapping fields that were randomly selected in the renal cortex and outer medulla for each animal in a blinded manner. Tissue damage is expressed as a percentage of affected kidney samples using a semiquantitative scale: 1 (mild lesions that affected <10% of kidney samples), 2 (lesions that affected 10–25% of kidney samples), 3 (lesions that affected 26–50% of kidney samples), 4 (lesions that affected 51–75% of kidney samples), and 5 (lesions that affected more than 75% of kidney samples).

## 2.7. Expression of eNOS, NF- $\kappa$ B, and HO-1

Deparaffinized kidney sections (4  $\mu\text{m}$  thick) were incubated with primary antibodies (endothelial nitric oxide synthase [eNOS; rabbit polyclonal; sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; diluted 1:200], NF- $\kappa$ B [rabbit polyclonal; sc-114, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; diluted 1:200], and HO-1 [goat polyclonal; sc-1796, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; diluted 1:200]) overnight at 4 °C. The sections were then incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 568 conjugated to anti-rabbit IgG antibody [1:400, Invitrogen, A10042] or Alexa Fluor 594 conjugated to anti-goat IgG antibody [1:400, Invitrogen, A11058]) for 90 min at room temperature in a darkened humidified chamber. Finally, the sections were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), mounted on slides, and observed in a confocal laser scanning microscope (LSM 710 Zeiss, Munich, Germany). Negative controls were processed as described above but incubated with 5% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline instead of the primary antibody, and no specific staining was performed. Ten non-overlapping fields were randomly selected for each animal in the corticomedullary region (400 $\times$  magnification). Fluorescence intensity was analyzed using Fiji-Image J software, and the number of pixels in the selected area was estimated from the total number of pixels in the entire image.

## 2.8. Force measurement in isolated renal artery

In a set of animals, the left renal artery was removed to record endothelium-dependent vasorelaxant effects that were induced by acetylcholine (ACh, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Ring-like segments (~1.5 mm length) were mounted on a myograph system (610 M-DMT, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) under 5 mN resting tension. The nutrient medium was Krebs–Henseleit solution (37 °C, 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , pH 7.4). Concentration–response curves were

**Table 1**  
Acid–base and hemodynamic variables according to experimental group.

	CTL	I/R	MA	MA + I/R
Number of animals	8	8	6	9
Body weight, g				
Day 0	287 ± 4	282 ± 3	288 ± 9	294 ± 6
Day 5	257 ± 5 <sup>d</sup>	256 ± 6 <sup>d</sup>	251 ± 7 <sup>d</sup>	258 ± 4 <sup>d</sup>
Blood				
pH	7.39 ± 0.01	7.35 ± 0.03	7.27 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.00 ± 0.04 <sup>a,hc</sup>
pBic, mmol/l	23.4 ± 0.4	21.4 ± 0.9	19.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	9.0 ± 1.4 <sup>a,hc</sup>
SBE, mmol/l	−0.8 ± 0.5	−2.7 ± 0.9	−6.8 ± 2.4 <sup>a</sup>	−23.8 ± 1.5 <sup>a,hc</sup>
Hematocrit, %	43.0 ± 0.8	40.1 ± 0.8	45.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	42.3 ± 1.7
Osmolality, mosm/kg H <sub>2</sub> O	281.5 ± 0.7	277.7 ± 1.8	282.3 ± 0.9	290.6 ± 5.1 <sup>b</sup>
Hemodynamic indices				
MAP, mm Hg	109 ± 6	100 ± 5	91 ± 4	95 ± 7
HR, beats/min	400 ± 9	363 ± 11	400 ± 9	364 ± 13

CTL, control (subjected to sham surgery); I/R, ischemia/reperfusion injury (tap water and subjected to bilateral renal ischemia for 45 min); MA, metabolic acidosis (0.28 M NH<sub>4</sub>Cl solution and sham surgery), and MA + I/R, metabolic acidosis plus ischemia/reperfusion (0.28 M NH<sub>4</sub>Cl solution and subjected to bilateral renal ischemia for 45 min). The data are expressed as the mean ± SEM on the last day of the experiment. pBic, plasma bicarbonate; SBE, standard base excess; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate.

<sup>a</sup> *p* 0.05, vs. CTL.

<sup>b</sup> *p* 0.05, vs. I/R.

<sup>c</sup> *p* 0.05, vs. MA.

<sup>d</sup> *p* 0.05, vs. Day 0 (Student's paired *t*-test).

constructed for 0.01–30 μM ACh using steady-state contractions that were elicited by 1 μM phenylephrine (PE, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

### 2.9. Statistical analysis

All of the data are expressed as mean ± SEM. Comparisons among groups were performed using Student's paired *t*-test and one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls or Holm–Sidak *post hoc* test as appropriate. Values of *p* < 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Mortality

During experimental procedures, a total number of 10 rats died (1 from the I/R group [11% of mortality] and 9 from the MA + I/R group [50% of mortality], *p* = 0.03) during the experimental period (between 12 and 24 h after the surgical procedures). Data collected from these animals were not included in the analyzed data. CTL and MA groups showed no mortality under our experimental condition.

### 3.2. Metabolic acidosis and hemodynamic parameters

Table 1 summarizes the functional parameters of rats that were subjected to MA induction with or without I/R. Although all of the animals presented a significant reduction of body weight during the experimental period, no significant differences in weight loss were observed between groups. As expected, the MA group had lower blood pH, plasma bicarbonate (pBic), and standard base excess (SBE) compared with the CTL group, and the degree of MA was more severe in the MA + I/R group. No significant differences in pH, pBic, or SBE were found between the CTL and I/R groups. No differences in mean arterial pressure or heart rate were found between groups.

### 3.3. Metabolic acidosis worsened I/R-induced functional impairment

Animals that were subjected to I/R injury exhibited increases in the plasma levels of Cr (2.9 ± 0.7 vs. 0.6 ± 0.03 mg/dl, *p* < 0.05) and urea (176.4 ± 22.9 vs. 36.5 ± 1.6 mg/dl, *p* < 0.05), reflecting a marked reduction of CrCl (0.14 ± 0.03 vs. 0.35 ± 0.02 ml/min/100 g, *p* < 0.05) compared with the CTL group. This reduction of CrCl was associated with high Na<sup>+</sup> excretion (2.36 ± 0.72% vs. 0.26 ± 0.04%, *p* < 0.05). The animals that received NH<sub>4</sub>Cl solution without I/R (MA group) exhibited

**Table 2**  
Parameters of renal function in rats subjected to NH<sub>4</sub>Cl-induced metabolic acidosis and renal ischemia/reperfusion.

	CTL	I/R	MA	MA + I/R
Plasma				
Creatinine, mg/dl	0.6 ± 0.03	2.9 ± 0.70 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.02 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.9 <sup>a,hc</sup>
Urea, mg/dl	36.5 ± 1.6	176.4 ± 22.9 <sup>a</sup>	50.5 ± 1.7 <sup>b</sup>	355.2 ± 61.4 <sup>a,hc</sup>
[Na <sup>+</sup> ], mmol/l	136.9 ± 1.0	136.6 ± 1.5	137.5 ± 0.7	146.0 ± 2.4 <sup>a,hc</sup>
[K <sup>+</sup> ], mmol/l	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	7.0 ± 0.5 <sup>a,hc</sup>
[Cl <sup>−</sup> ], mmol/l	105.8 ± 0.5	103.3 ± 1.1	111.3 ± 2.3 <sup>b</sup>	120.8 ± 2.6 <sup>a,hc</sup>
CrCl, ml/min/100 g	0.35 ± 0.02	0.14 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>a,hc</sup>
Urine				
pH	6.83 ± 0.08	6.26 ± 0.35	5.69 ± 0.11	6.65 ± 0.31
FE <sub>Na</sub> <sup>+</sup> , %	0.26 ± 0.04	2.36 ± 0.72 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.05 <sup>b</sup>	7.17 ± 1.82 <sup>a,hc</sup>
FE <sub>K</sub> <sup>+</sup> , %	22.67 ± 2.17	101.19 ± 31.28 <sup>a</sup>	15.81 ± 0.68 <sup>b</sup>	99.41 ± 13.08 <sup>a,c</sup>
FE <sub>Cl</sub> <sup>−</sup> , %	0.59 ± 0.08	4.52 ± 1.60 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.14 <sup>b</sup>	16.77 ± 5.11 <sup>a,hc</sup>

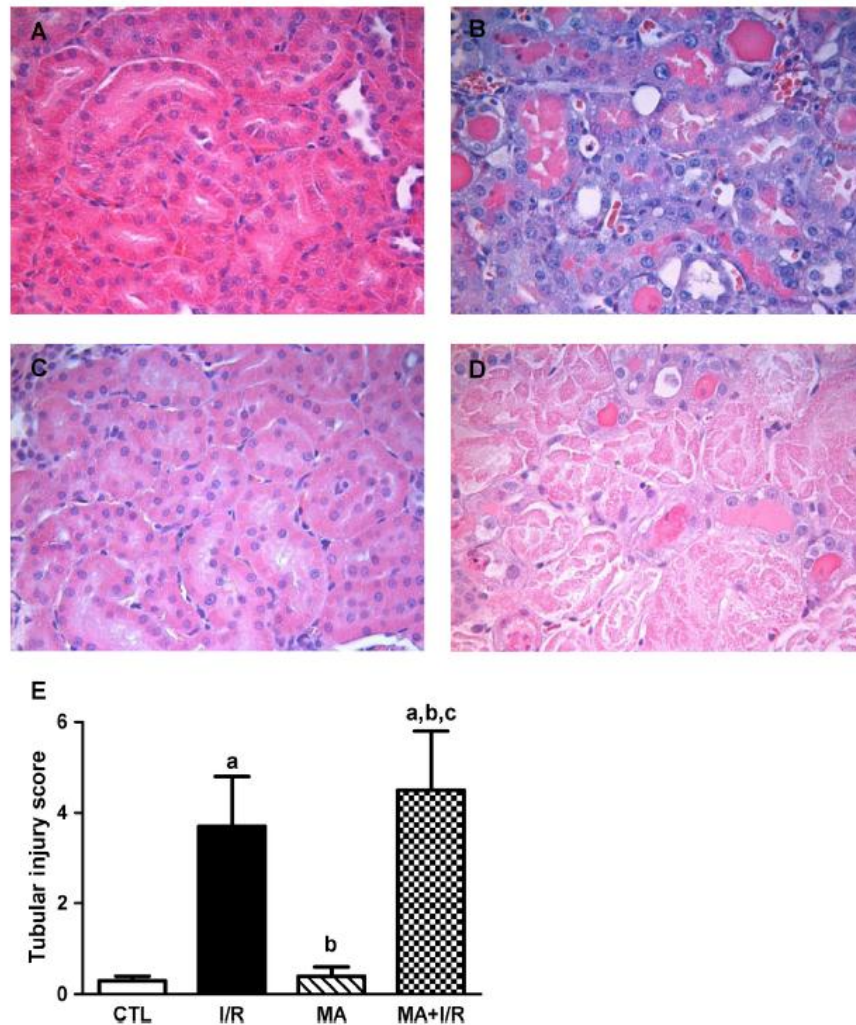
CTL, control (subjected to sham surgery); I/R, ischemia/reperfusion injury (tap water and subjected to bilateral renal ischemia for 45 min); MA, metabolic acidosis (0.28 M NH<sub>4</sub>Cl solution and sham surgery), and MA + I/R, metabolic acidosis plus ischemia/reperfusion (0.28 M NH<sub>4</sub>Cl solution and subjected to bilateral renal ischemia for 45 min). The data are expressed as the mean ± SEM on the last day of the experiment. CrCl, creatinine clearance; FE<sub>Na</sub><sup>+</sup>, FE<sub>K</sub><sup>+</sup>, and FE<sub>Cl</sub><sup>−</sup>, fractional excretion of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Cl<sup>−</sup>, respectively.

<sup>a</sup> *p* 0.05, vs. CTL.

<sup>b</sup> *p* 0.05, vs. I/R.

<sup>c</sup> *p* 0.05, vs. MA.





**Fig. 1.** Morphological changes in rat kidneys subjected to MA and I/R injury. Photomicrographs of kidney tissues obtained from rats in the (A) control group, (B) ischemia/reperfusion (I/R) injury group, (C) NH<sub>4</sub>Cl-induced metabolic acidosis (MA) group, and (D) NH<sub>4</sub>Cl-induced metabolic acidosis plus I/R injury (MA + I/R) group. In A, the tissue presented a preserved renal structure, whereas the kidney in C presented mild tubular dilatation and vacuolation in the renal epithelia. In B, necrotic renal tubules with a hyaline cast inside the lumen of the renal tubule can be seen. In D, one can see intense tubular necrosis (hematoxylin and eosin staining, 400× magnification). (E) Tubular injury score. The data are expressed as mean ± SEM. <sup>a</sup>*p* 0.05, vs. CTL; <sup>b</sup>*p* 0.05, vs. I/R; <sup>c</sup>*p* 0.05, vs. MA.

no alterations in these parameters compared with the control group, and MA induction worsened the functional alterations that were induced by I/R injury. The MA + I/R group had higher Cr and urea compared with the I/R group. A significant reduction of CrCl was observed in the MA + I/R group compared with the I/R group ( $0.05 \pm 0.02$  vs.  $0.14 \pm 0.03$  ml/min/100 g,  $p < 0.05$ ). This severe functional impairment was reflected by a substantial increment of the fractional excretion of Na<sup>+</sup> (Table 2).

#### 3.4. Metabolic acidosis aggravated histological injury

The histological analysis of the kidney samples in the CTL and MA groups showed only mild alterations in tubules, whereas rats that were subjected to I/R injury exhibited tubular necrosis, tubular dilation, inflammatory cell infiltration, and cellular edema in the tubular interstitium of the renal cortex and outer medulla. These conditions were worsened in the MA + I/R group. Representative photographs and the

semiquantitative analysis of renal damage in each experimental group are shown in Fig. 1.

#### 3.5. Metabolic acidosis did not affect the ischemia/reperfusion-induced downregulation of eNOS or responsiveness of renal artery to acetylcholine

Forty-eight hours after the surgical procedures, the I/R group exhibited markedly lower eNOS protein expression compared with the CTL group ( $p < 0.05$ ). Animals that were subjected only to MA had similar eNOS expression as animals in the I/R group. In animals that were subjected to both MA and I/R, the reduction of eNOS expression was not significantly different from the I/R group ( $p > 0.05$ ; Fig. 2, accompanied by a representative image of confocal fluorescence microscopy).

Functional studies in isolated rings of the renal artery revealed that MA did not influence the relaxant action of ACh ( $0.01$ – $30$  μM) against PE-induced contractions (Fig. 3). In contrast, cholinergic relaxation significantly decreased in the renal arteries in rats that were subjected to I/

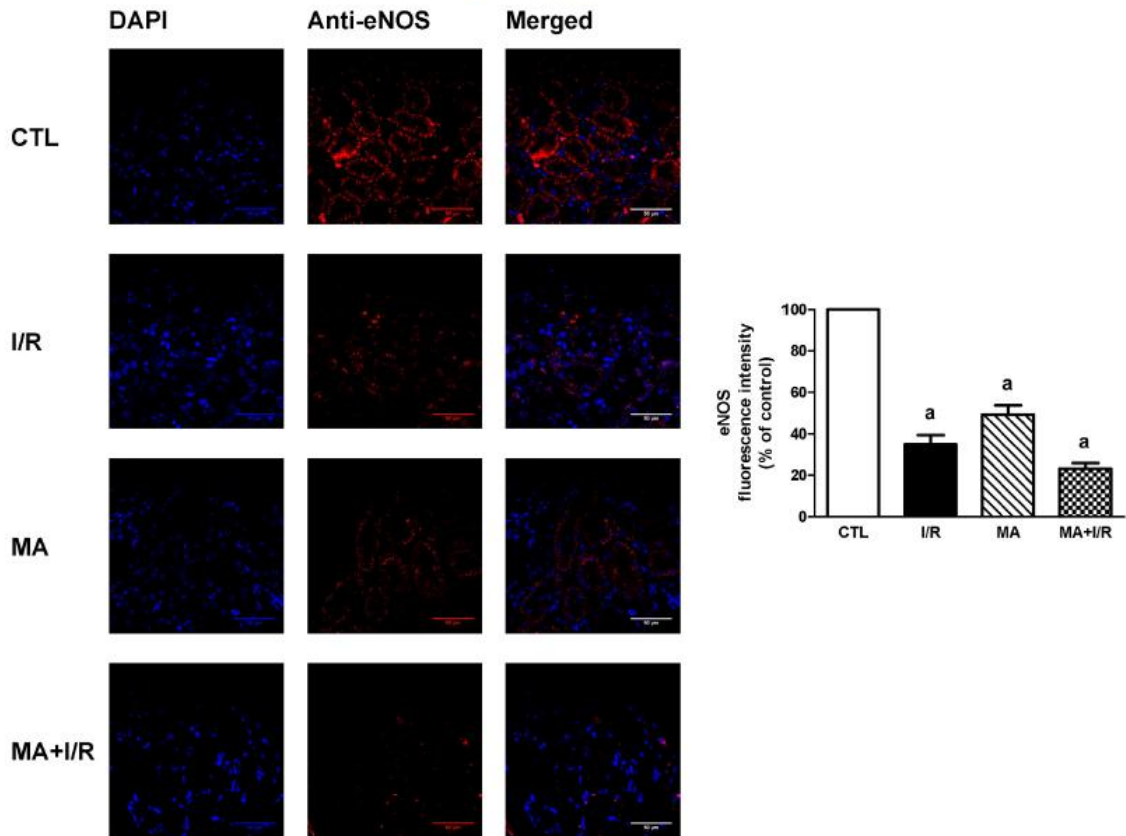


Fig. 2. Effect of MA and I/R on eNOS expression. The images reveal significantly less immunofluorescence related to eNOS in tubular cells in response to acid load or I/R, a phenomenon that did not increase when both insults (MA and I/R) were present together. Scale bar = 50 μm. The data are mean ± SEM (n = 6) expressed as percentage of the values obtained to CTL group. <sup>a</sup>p < 0.05, vs. CTL.

R. Acetylcholine reduced PE-induced contractions to only  $68.8 \pm 3.4\%$  and  $67.5 \pm 9.1\%$  of control values in the I/R and MA + I/R groups, respectively. These values were significantly different from the CTL group ( $28.8 \pm 4.3\%$  p < 0.05).

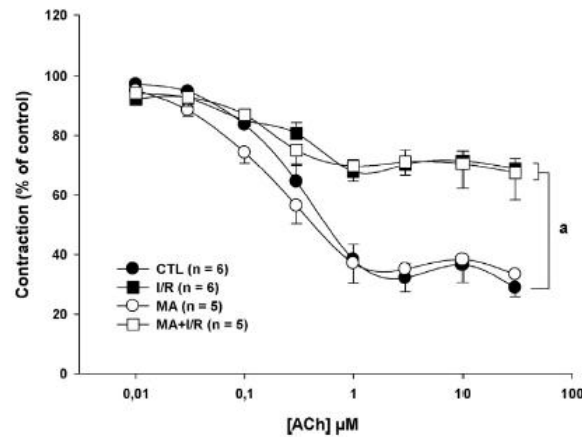


Fig. 3. Vasorelaxation induced by ACh in the renal artery in rats subjected to MA and I/R. Isolated vessels were precontracted with 1 μM phenylephrine (PE). Acetylcholine-induced relaxation was significantly attenuated in vessels from I/R (□) and MA + I/R rats (□) but not in MA rats (○) compared with control (CTL, ●) tissues. The data are expressed as mean ± SEM. The number of rats is shown in parentheses. <sup>a</sup>p < 0.05, vs. CTL.

### 3.6. Metabolic acidosis augmented the ischemia/reperfusion-associated up-regulation of NF-κB

Animals that were subjected only to MA or I/R had similar NF-κB expression, although NF-κB expression increased in both groups compared with the CTL group (p < 0.05). When combined with I/R, MA further increased NF-κB expression compared with the I/R group (p < 0.05; Fig. 4).

### 3.7. Metabolic acidosis augmented the ischemia/reperfusion-induced up-regulation of HO-1

As shown in Fig. 5, a significant increase in HO-1 expression was observed in the MA group compared with the CTL group (p < 0.05). This increase was similar to the I/R group (p < 0.05). Animals in the MA + I/R group had even higher levels of HO-1 expression than the I/R group (p < 0.05).

## 4. Discussion

In the present study, we found that prior MA worsened renal I/R injury, reflected by a greater increase in NF-κB expression but no additive effect on eNOS protein expression, which was decreased by I/R and occurred even under greater expression of HO-1, a known mechanism of protection against I/R injury. Also, MA increased the mortality early (12–24 h) after I/R procedure in comparison with animals submitted only to I/R.



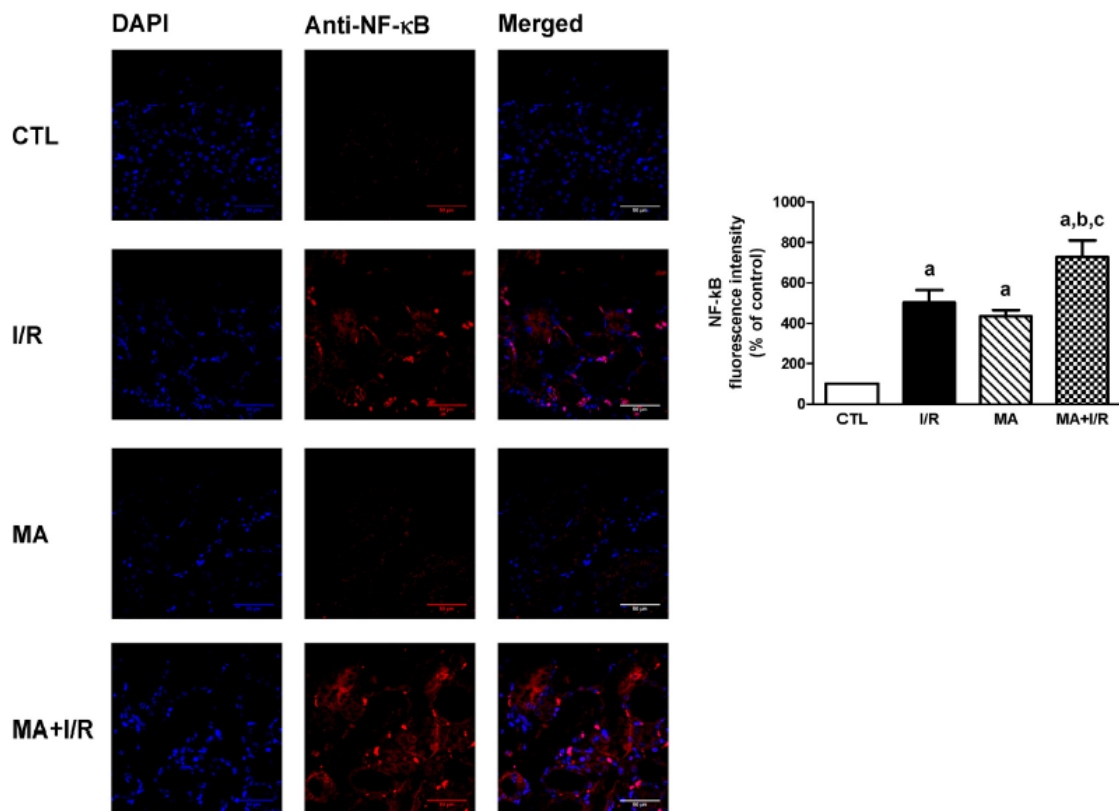


Fig. 4. Effect of MA and I/R on NF- $\kappa$ B expression. Compared with CTL rats, the intensity of NF- $\kappa$ B fluorescence significantly increased in the I/R and MA groups. This increase was intensified when MA occurred simultaneously with I/R-induced renal injury. Scale bar = 50  $\mu$ m. The data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) expressed as percentage of the values obtained to CTL group. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , vs. CTL; <sup>b</sup> $p < 0.05$ , vs. I/R; <sup>c</sup> $p < 0.05$ , vs. MA.

Acute kidney injury has a complex pathogenesis and different stages that can include endothelial damage and inflammation, which can culminate in organ failure [13]. Metabolic acidosis can have deleterious effects on the kidneys and involves similar processes, including inflammation and changes in renal blood flow. Although MA is a known consequence of severe kidney impairment, many critically ill patients have MA from other causes (e.g., lactic acidosis and hyperchloremic acidosis due to volume expansion), even before AKI is initiated. Although our data cannot be extrapolated to lactic acidosis, we can suggest that hyperchloremic acidosis developing in critically ill patients can be harmful, favoring the use of balanced solutions in volume expansion [14]. It is difficult to ascertain that acidosis treatment with alkali therapy can arrest the detrimental effect of metabolic acidosis but this must be considered.

In the present study, we subjected a group of animals to MA 48 h before I/R injury. Using this approach, the animals in the MA group developed a moderate degree of MA. The induction of MA with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  can slightly induce dehydration in experimental rats [15], and this was one major caveat that we considered in our study. However, dehydration was unlikely because both the CTL and experimental animals presented similar decreases in body weight at the end of the experimental procedures. The observed decrease in body weight of control and experimental animals can be attributed to acclimatization period in metabolic cage. The reduction in animal body weight in single metabolic cage may be due to increased levels of circulating corticosterone [16].

Additionally, mean arterial pressure and heart rate did not differ from CTL rats. Thus, damage to renal structures appeared to be attributable to the systemic influence of acid-base status and not macro-hemodynamic parameters.

Although MA-induced exacerbation of the inflammatory response is already known, no consensus has been reached regarding the effects of such acid-base imbalance in I/R organ injury. Some studies have even suggested a protective effect of milder forms of acidosis (metabolic or hypercapnic) in other organs, such as the lungs, heart, and brain [17, 18,19]. In the present study, the animals developed moderate MA before applying the I/R procedure, and MA became more severe 48 h after I/R injury. Nevertheless, the possibility that less severe acidosis can produce an opposite effect under other conditions cannot be discarded.

Inducible NOS (iNOS) is fundamentally involved in the process of renal damage and induces inflammation and apoptosis. The inhibition of iNOS activity (or the absence of iNOS itself in knockout mice) improves renal I/R damage *in vivo*. Another isoform of NOS, eNOS, has protective effects on I/R injury [20]. The present study found significantly lower eNOS expression in response to renal I/R, which is supported by previous studies [21,22]. Although studies on the effects of acidic pH on tubular eNOS expression are still scarce, Giraldez et al. [23] reported that I/R-induced acidosis can reduce eNOS expression in heart tissue. In the present study, systemic acidosis alone significantly reduced tubular eNOS expression. With MA and I/R combined, eNOS expression remained comparable to the reduced levels that were induced solely by acid-load.

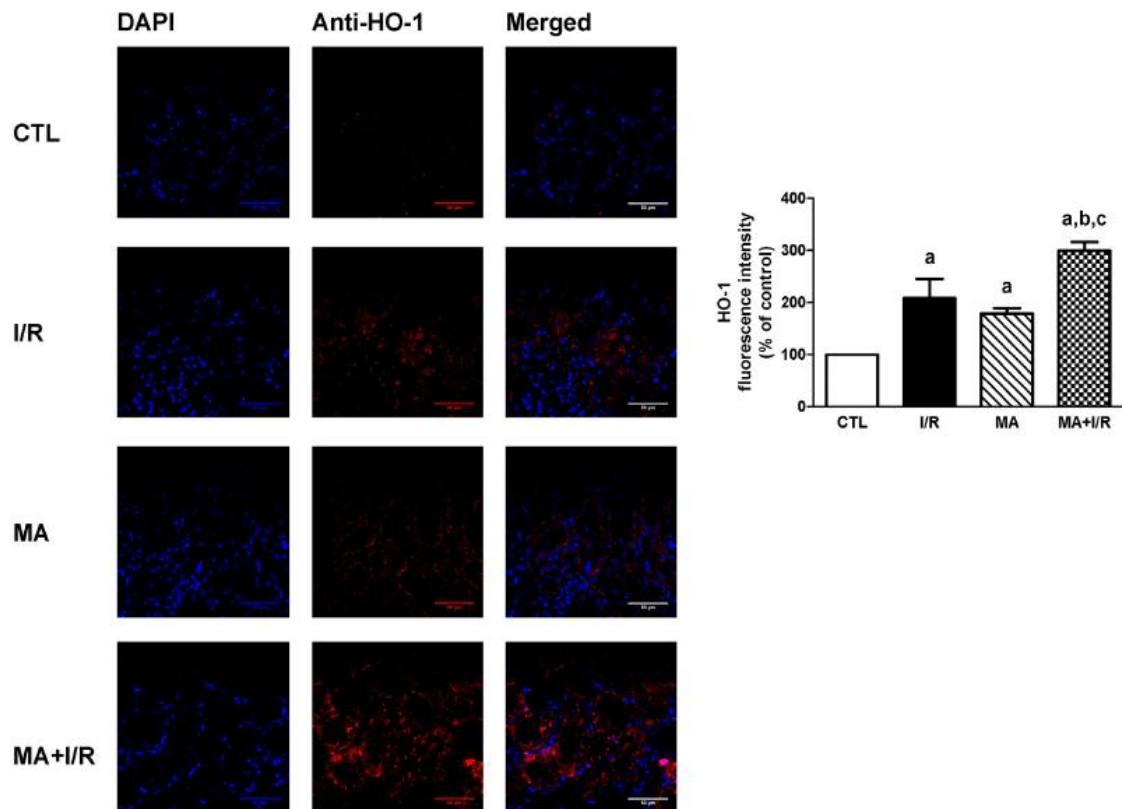


Fig. 5. Effect of MA and I/R on HO-1 expression. Microphotographs revealed that immunofluorescence related to HO-1 increased in tubular cells from I/R and MA rats compared with controls, with a further significant increase in fluorescence in the MA + I/R group. Scale bar = 50  $\mu$ m. The data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) expressed as percentage of the values obtained to CTL group. \* $p < 0.05$ , vs. CTL;  $^b p < 0.05$ , vs. I/R;  $^c p < 0.05$ , vs. MA.

Additional support for these data may be derived from the vasorelaxant effects of ACh in renal artery rings. The endothelium-dependent relaxant response to ACh is known to be mediated by NO release through an excitatory action on eNOS [24]. Thus, in the present study, we observed a reduction of the ability of ACh to induce endothelium-dependent vasorelaxation, which was significantly more evident in isolated vessels that were obtained from I/R and MA + I/R rats. In renal vessels that were isolated from I/R rats, eNOS underwent a functional loss in endothelial cells, although acidosis did not interfere *per se* with the responsiveness of the renal arteries to ACh.

NF- $\kappa$ B is a key mediator of acute and chronic inflammation. It is considered essential in the induction of I/R injury because it can upregulate proinflammatory gene expression [25]. In the present study, the magnitude of NF- $\kappa$ B upregulation in acidotic rats was comparable to animals that were subjected solely to I/R injury. In contrast, acidotic rats that presented I/R injury exhibited greater NF- $\kappa$ B expression than animals that were subjected only to isolated renal insult (I/R or MA). Hypercapnic acidosis appears to inhibit NF- $\kappa$ B expression in the lungs under conditions of I/R injury [26]. Our data indicate that severe I/R injury combined with MA is associated with high NF- $\kappa$ B expression, suggesting that other factors beyond solely pH can influence NF- $\kappa$ B activity.

Investigators have recently reported enhanced HO-1 expression under conditions of oxidative stress, providing evidence that the end products of heme degradation, including biliverdin, bilirubin, and carbon monoxide, can exert protective actions against renal I/R injury through antioxidant, antiinflammatory, and cytoprotective effects [27].

Rats in the MA group exhibited an increase in HO-1 expression. Interestingly, the MA + I/R group exhibited an increase in HO-1 expression compared with I/R animals. A plausible explanation for this augmented expression may involve the putative release of free heme from destabilized heme proteins in injured cells [28,29]. The increase in HO-1 expression appears to be an attempt to alleviate renal injury that is exacerbated by inflammatory and vascular alterations. Additionally, hypercapnic acidosis upregulated HO-1 expression in lung I/R injury [30].

The present study has several limitations. First, we did not evaluate the effects of different intensities of MA, which could have revealed whether milder acidosis produces different effects. Second, we cannot extrapolate our findings to lactic acidosis, a common etiology of metabolic acidosis in clinical setting. Also, it is possible the MA can also affect the cardiovascular function, which may exacerbate the renal injury, in addition to its direct effect. Finally, the present experimental approach cannot elucidate whether other pathways (e.g., oxidative stress) that are involved in establishing MA can worsen renal I/R injury, and this issue deserves further investigation.

## 5. Conclusion

The present results showed that MA exacerbates renal injury that is induced by I/R, a phenomenon that was associated with high NF- $\kappa$ B expression. This detrimental event occurred even when protection afforded by HO-1 was maintained.



## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

This study received financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (470589/2014-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) (304538/2012-4), Instituto Nacional de Biomedicina do Semiárido (INCT-IBISAB-CNPq) (448707/2014-4), and Edital MCT/CNPq no. 014/2010 – Universal. The authors thank Ms. Maria Silvândira França Pinheiro and Mr. Haroldo Pinheiro from the Department of Physiology and Pharmacology and Ms. Maria do Socorro França Monte from the Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil, for technical assistance.

## References

- [1] S. Uchino, J.A. Kellum, R. Bellomo, G.S. Doig, H. Morimatsu, S. Morgera, M. Schetz, I. Tan, C. Bouman, E. Macedo, N. Gibney, A. Tolwani, C. Ronco, Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study, *JAMA* 294 (2005) 813–818.
- [2] M. Poukkanen, E. Wilkman, S.T. Vaara, V. Pettilä, K.M. Kaukonen, A.M. Korhonen, A. Uusaro, S. Hovilehto, O. Inkinen, R. Laru-Sompa, R. Hautamäki, A. Kuitunen, S. Karlsson, Hemodynamic variables and progression of acute kidney injury in critically ill patients with severe sepsis: data from the prospective observational FINNAKI study, *Crit. Care* 17 (2013) R295.
- [3] X. Zeng, G.M. McMahon, S.M. Brunelli, D.W. Bates, S.S. Waikar, Incidence, outcomes, and comparisons across definitions of AKI in hospitalized individuals, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (2014) 12–20.
- [4] F. Wang, G. Yu, S.Y. Liu, J.B. Li, J.F. Wang, L.L. Bo, L.R. Qian, X.J. Sun, X.M. Deng, Hydrogen-rich saline protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats, *J. Surg. Res.* 167 (2011) e339–e344.
- [5] P.K. Chatterjee, Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia–reperfusion injury: a comprehensive review, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 376 (2007) 1–43.
- [6] C. Chu, W. He, Y. Kuang, K. Ren, X. Gou, Celastrol protects kidney against ischemia–reperfusion-induced injury in rats, *J. Surg. Res.* 186 (2014) 398–407.
- [7] Y.P. Wang, G. Li, L.L. Ma, Y. Zheng, S.D. Zhang, H.X. Zhang, M. Qiu, X. Ma, Penicillin hydrochloride ameliorates renal ischemia–reperfusion injury in rats, *J. Surg. Res.* 186 (2014) 390–397.
- [8] M. Al-Jaghbeer, J.A. Kellum, Acid–base disturbances in intensive care patients: etiology, pathophysiology and treatment, *Nephrol. Dial. Transplant.* 30 (2015) 1104–1111.
- [9] J.A. Kellum, M. Song, E. Almasri, Hyperchloremic acidosis increases circulating inflammatory molecules in experimental sepsis, *Chest* 130 (2006) 962–967.
- [10] A.H. Chowdhury, E.F. Cox, S.T. Francis, D.N. Lobo, A randomized, controlled, double-blind crossover study on the effects of 2-L infusions of 0.9% saline and plasma-lyte® 148 on renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers, *Ann. Surg.* 256 (2012) 18–24.
- [11] S. Peppicelli, F. Bianchini, C. Contena, D. Tombaccini, L. Calorini, Acidic pH via NF- $\kappa$ B favours VEGF-C expression in human melanoma cells, *Clin. Exp. Metastasis* 30 (2013) 957–967.
- [12] H. Amlal, Q. Chen, T. Greeley, L. Pavelic, M. Soleimani, Coordinated down-regulation of NBC-1 and NHE-3 in sodium and bicarbonate loading, *Kidney Int.* 60 (2001) 1824–1836.
- [13] D.P. Basile, M.D. Anderson, T.A. Sutton, Pathophysiology of acute kidney injury, *Comput. Phys.* 2 (2012) 1303–1353.
- [14] N.M. Yunus, R. Bellomo, C. Hegarty, D. Story, L. Ho, M. Bailey, Association between a chloride-liberal vs chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults, *JAMA* 308 (2012) 1566–1572.
- [15] M. Nowik, N.B. Kampik, M. Mihailova, D. Eladari, C.A. Wagner, Induction of metabolic acidosis with ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) in mice and rats: species differences and technical considerations, *Cell. Physiol. Biochem.* 26 (2010) 1059–1072.
- [16] K.L. Tamashiro, M.M. Nguyen, M.M. Ostrander, S.R. Gardner, L.Y. Ma, S.C. Woods, R.R. Sakai, Social stress and recovery: implications for body weight and body composition, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293 (2007) R1864–R1874.
- [17] A. Rodríguez-Sinovas, A. Cabestrero, B. García del Blanco, J. Inserte, A. García, D. García-Dorado, Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic post-conditioning in pigs, *Basic Res. Cardiol.* 104 (2009) 761–771.
- [18] Y.Y. Fan, Z. Shen, P. He, L. Jiang, W.W. Hou, Y. Shen, X.N. Zhang, W.W. Hu, Z. Chen, A novel neuroprotective strategy for ischemic stroke: transient mild acidosis treatment by CO<sub>2</sub> inhalation at reperfusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34 (2014) 275–283.
- [19] W. Gao, D. Liu, D. Li, X. Che, G. Cui, Effects of hypercapnia on T cells in lung ischemia/reperfusion injury after lung transplantation, *Exp. Biol. Med.* 239 (2014) 1597–1605.
- [20] A.C. Souza, R.A. Volpini, M.H. Shimizu, T.R. Sanches, N.O. Camara, P. Smedo, C.E. Rodrigues, A.C. Seguro, L. Andrade, Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- $\kappa$ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 302 (2012) F1045–F1054.
- [21] M. de Araujo, L. Andrade, T.M. Coimbra, A.C. Rodrigues Jr., A.C. Seguro, Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2005) 3339–3349.
- [22] B. Betz, R. Schneider, T. Kress, M.A. Schick, C. Wanner, C. Sauvant, Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury, *PPAR Res.* 2012 (2012) 219319.
- [23] R.R. Giraldez, A. Panda, Y. Xia, S.P. Sanders, J.L. Zweier, Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21420–21426.
- [24] J.F. Arnal, A.T. Dinh-Xuan, M. Pueyo, B. Darblade, J. Rami, Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology, *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1078–1087.
- [25] T. Lawrence, The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1 (2009) a001651.
- [26] K. Takeshita, Y. Suzuki, K. Nishio, O. Takeuchi, K. Toda, H. Kudo, N. Miyao, M. Ishii, N. Sato, K. Naoki, T. Aoki, K. Suzuki, R. Hiraoka, K. Yamaguchi, Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29 (2003) 124–132.
- [27] M. Correa-Costa, M.T. Amano, N.O. Câmara, Cytoprotection behind heme oxygenase-1 in renal diseases, *World J. Nephrol.* 1 (2012) 4–11.
- [28] M.D. Maines, R.D. Mayer, J.F. Ewing, W.K. McCoubrey Jr., Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promoter of tissue damage and regulator of HSP32, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264 (1993) 457–462.
- [29] H. Shimizu, T. Takahashi, T. Suzuki, A. Yamasaki, T. Fujiwara, Y. Odaka, M. Hiraoka, H. Fujita, R. Akagi, Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure, *Crit. Care Med.* 28 (2000) 809–817.
- [30] S.Y. Wu, M.H. Li, F.C. Ko, G.C. Wu, K.L. Huang, S.J. Chu, Protective effect of hypercapnic acidosis in ischemia–reperfusion lung injury is attributable to upregulation of heme oxygenase-1, *PLoS One* 8 (2013), e74742.

**ANEXO A – DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
(CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.**



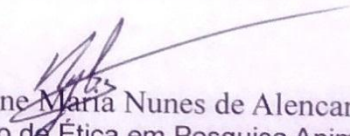
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 32/2013, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS DA ACIDOSE METABÓLICA NO ESTABELECIMENTO DA LESÃO RENAL AGUDA ISQUÊMICA EM RATOS”**, de responsabilidade de Patricia Andréa da Fonseca Magalhães e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de julho de 2013.

Fortaleza, 03 de setembro de 2013

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

**Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar**  
Coordenadora da CEPA/DEFF/FAMED/UFC  
MAT. SIAPE 2166369