

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO DA CLORPROMAZINA EM RINS DE CÃES SUBMETIDOS À ISQUEMIA
E REPERFUSÃO**

Liliana Borges de Menezes
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2008

LILIANA BORGES DE MENEZES

**AÇÃO DA CLORPROMAZINA EM RINS DE CÃES SUBMETIDOS À ISQUEMIA
E REPERFUSÃO**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo - EV/UFG

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Maria Clorinda Soares Fioravanti -
EV/UFG

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito- EV/UFG

GOIÂNIA

2008

Dedico este trabalho aos meus pais Theobaldo e Juraci, e minha irmã Luciana que sempre foram fonte constante de amor e apoio emocional sem os quais eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a graça de me interessar pelos animais, pela pesquisa e pela docência, além de permitir ter tantos amigos.

Aos meus padrinhos Jose Reinaldo Fioravanti e Levita de Menezes Soares Fioravanti, e minhas tias Irany Menezes e Maria das Graças dos Santos Moreira, por sempre acreditarem e contribuírem para a realização dos meus ideais.

Ao Prof. Eugênio Gonçalves de Araújo pela credibilidade e confiança em meu trabalho, permitindo que eu caminhasse sozinha, embora estivesse sempre presente.

Aos meus co-orientadores Maria Clorinda Soares Fioravanti e Luiz Augusto Batista Brito pela paciência, amizade, apoio incondicional e orientação permanente.

As professoras Naida Cristina Borges e Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura que facilitaram e apoiaram a execução deste trabalho.

Ao Antônio Souza do Laboratório de Patologia Animal (EV/UFG) e Helton Freires Oliveira do Laboratório de Patologia Clínica (HV/UFG) pela boa vontade demonstrada em me auxiliar quando preciso.

A amiga Marina Pacheco Miguel que neste experimento esteve comigo, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença (dos animais), mas sempre me ajudando no que fosse preciso, mesmo que não soubesse nada.

Ao Marcelo Seixo de Brito e Silva, um grande cirurgião e principalmente amigo, que permaneceu efetivamente ao meu lado em todas as ocasiões, suportando até mesmo meus momentos de *stress*, que não é fácil.

A minha amiga desde a graduação Ediane Batista da Silva que sempre me apoiou e que permanecerá “guardada debaixo de sete chaves, dentro do coração... mesmo que o tempo e a distância dizem não.”

A Andréia Vitor Couto do Amaral pela grande amizade que sempre demonstrou e que persiste desde o mestrado.

Ao Leandro Guimarães Franco por ser um grande profissional e agora amigo.

Às “minhas fiotinhas” Tatyane Penha Sales, Aline Moraes, Mariana Moreira Andrascho e Natália Menezes que prestaram uma imensa colaboração abrindo

mão, na maioria das vezes, de seus momentos de estudo e descanso, inclusive finais de semana, feriados e férias.

As colegas Joyce Rodrigues Lôbo, Mayara Fernanda Maggioli pela boa vontade demonstrada em auxiliar nas análises laboratoriais.

A colega Rosana Moraes (*in memoriam*) que me permitiu ter o primeiro contato com a pesquisa como estagiária, de onde eu aprendi a importância da responsabilidade e do trabalho em equipe durante a condução de um projeto.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário por estarem sempre dispostos a me ajudar e que nunca deixaram de me convidar para as confraternizações, em especial Sheila de Almeida de Sousa e Wilda Maria Reis que também contribuíram na execução deste trabalho.

Ao Carlos Pereira Ramos, o Carlito, pela grande contribuição na limpeza das baias.

A professora Neusa Margarida Paulo que me deu a oportunidade de trabalhar como pesquisadora em uma nova equipe e com grandes profissionais.

Otávio Cavalcante Barros por auxiliar com a confecção das lâminas.

À Escola de Veterinária, que me acolheu por 10 anos, e ao programa de pós-graduação em Ciência Animal, que juntos permitiram a realização de mais um trabalho.

A Janaína Valadares Guimarães e Flávia Aparecida de Oliveira que me receberam muito bem como nova colega no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (UFG) mesmo sem me conhecer e, que me apoiaram para finalização deste trabalho.

Aos professores Geovanni Dantas Cassali, Júlio César Cambraia Veado e Adilson Donizeti Damasceno por aceitarem colaborar com a qualidade desta tese participando da banca de defesa.

Em especial a todos os animais que fizeram parte deste trabalho, que iniciaram este experimento receosos sobre o fim que teriam.

Aos meus animais de estimação.

Meus sinceros agradecimentos

"... O mais altruísta dos amigos que um homem pode ter neste mundo egoísta, aquele que nunca o abandona e nunca mostra ingratidão ou deslealdade, é um cão".

George G. Vest

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1.1 Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão.....	2
1.1.1 Cálcio Intracelular.....	3
1.1.2 Radical livre.....	4
1.1.3 Lesão de isquemia-reperfusão e disfunção endotelial	6
1.1.4 Lesão de reperfusão causada por leucócitos	7
1.2 Insuficiência renal aguda isquêmica (IRAi).....	7
1.3 Junção de aderência	10
1.4 Avaliação da função renal	13
1.5 Pré-condicionamento isquêmico e ação da clorpromazina	14
4 REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 – Avaliação do efeito da clorpromazina sobre a função renal de cães submetidos à isquemia e reperfusão.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Animais e delineamento experimental.....	26
Procedimento cirúrgico e pós-operatório.....	26
Avaliações laboratoriais	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 3 – Avaliação histológica e expressão da E-caderina e β -catenina em rim de cães submetidos à isquemia e reperfusão após a aplicação da clorpromazina.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
Animais de experimentação	44
Procedimento cirúrgico e pós-operatório.....	44
Amostras	45
Exame histológico	45
Imunoistoquímica	47
RESULTADOS	48
Histologia renal.....	48
Análise imunoistoquímica com anticorpo β -catenina.....	51
Análise imunoistoquímica com anticorpo E-caderina	54
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
ANEXOS DO CAPÍTULO 2	63

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a função renal e a expressão da E-caderina e β -catenina de cães submetidos à isquemia e reperfusão após a aplicação de clorpromazina. Para tais objetivos, foram utilizados 12 cães distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis indivíduos: grupo A com isquemia e reperfusão sem tratamento por clorpromazina e o grupo B com isquemia e reperfusão tratados por clorpromazina. Foi realizada uma incisão paracostal esquerda para identificação e isolamento do rim esquerdo e da artéria renal esquerda, que foi isolada e ocluída nos animais de todos os grupos. Os animais do grupo B receberam clorpromazina via endovenosa, na dose de 5 mg/kg, 15 min antes da clampagem do vaso, que durou 1 h. Após este período, as artérias renais foram desobstruídas e os órgãos foram avaliados por 2h após reperfusão. Avaliações da função renal foram feitas por urinálise, concentração sérica de uréia e creatinina e determinação da GGT urinária. Em cada grupo foram extraídas seis amostras de parênquima renal, para avaliação histológica e marcação com anticorpos anti-E-caderina e anti- β -catenina. Foi possível concluir que, a avaliação da relação PU/CU e atividade da GGT urinária são exames mais sensíveis para detectar lesão tubular aguda que o exame de urina de rotina. Não sendo possível verificar a ação protetora da clorpromazina. A E-caderina e β -catenina foram diferencialmente expressas em segmentos do córtex e da medula em rim de cães e o uso da clorpromazina não alterou a expressão das duas proteínas.

Palavras-chave: caderina, catenina, necrose tubular aguda, urinálise

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Isquemia é a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial de um tecido, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos, incluindo a glicose (COTRAN et al., 2000). Reperusão é o termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia (EVORA et al., 1996).

A isquemia tem papel fundamental em muitas situações clínicas. Apesar da revascularização sangüínea a um órgão isquêmico ser essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, a reperusão pode agravar as lesões produzidas na fase isquêmica isolada. O dano celular induzido após perfusão de um órgão isquêmico é denominado de lesão de isquemia-reperusão (I/R).

As lesões decorrentes de isquemia e reperusão têm sido demonstradas em estudos clínicos e experimentais em uma variedade de modelos, como intestino (FALEIROS et al., 1998), rins (NETTO et al., 2001; RHODEN et al., 2001), músculo esquelético (MORENO et al., 2002), fígado (SILVA Jr. et al., 2002; FONDEVILA et al., 2003) e cérebro (TARDINI & YOSHIDA, 2003).

Um dos modelos de isquemia/reperusão mais estudados é a oclusão temporária da artéria renal (NETTO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; TUCCI Jr. et al., 2008). Os danos causados pela hipóxia nas células tubulares representam o primeiro evento em casos de falência renal aguda. Além da perda da polaridade celular, há ainda produção de radicais livres, entrada de cálcio e ativação de genes para proteção ou regeneração celular (BREZIS & EPSTEIN, 1993).

Um entendimento dos mecanismos envolvidos nos danos da isquemia/reperusão é essencial para projetar estratégias terapêuticas e minimizar suas conseqüências. A reação ao oxigênio após a reoxigenação implica em danos teciduais e inicia uma cascata de respostas celulares deletérias precedendo a inflamação, morte celular, e por último, falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003).

1.1 Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão

Sabe-se que as conseqüências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração e que muitas das lesões são desenvolvidas durante o estágio de reoxigenação decorrente da reperfusão tecidual (SILVA Jr. et al., 2002).

Diversos mecanismos encontram-se envolvidos na fisiopatogênese da lesão secundária à isquemia e reperfusão (I/R). São exemplos dos mesmos a formação de radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica da membrana, ativação de células inflamatórias e produção de citocinas, disfunção mitocondrial e aumento do cálcio intracelular. A I/R foi associada ao aumento no número de leucócitos aderidos e emigrados, aumento no extravasamento de albumina, formação de agregados de plaquetas e leucócitos dentro de vênulas pós-capilares e degranulação dos mastócitos ao redor dos microvasos (KUROSE et al., 1994).

A interrupção do fluxo sangüíneo, dependendo do tempo e da intensidade, ou ainda da natureza do órgão e da temperatura a que o tecido está submetido, poderá determinar os mais variados graus de lesão celular. Estas lesões são decorrentes da depleção das reservas energéticas de ATP (adenosina trifosfato, tipo de fosfato de alta energia) e glicose, que gera a produção de lactato, desenvolvimento de acidose e ativação de proteases intracelulares (LIMA, 2004).

O primeiro processo afetado pela hipóxia é a respiração aeróbia celular. À medida que a tensão do oxigênio dentro da célula diminui, há perda da fosforilação oxidativa e diminuição da geração de ATP, exercendo efeitos difusos sobre muitos sistemas dentro da célula (COTRAN et al., 2000). A diminuição do aporte de oxigênio para o tecido acometido levaria à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção de trifosfato de adenosina. O consumo do estoque de ATP continuaria, e seria degradado à adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, à adenosina, inosina e hipoxantina (SILVA Jr. et al., 2002; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

De acordo com COTRAN et al. (2000) e TARDINI & YOSHIDA (2003), a falta de energia celular causaria a falência da bomba de sódio-potássio

(Na^+/K^+), levando ao maior acúmulo de Na^+ intracelular e perda de K^+ para fora da célula, com conseqüente degeneração hidrópica. Concomitantemente, estaria ocorrendo influxo de Ca^{2+} e de cloreto para o meio intracelular.

1.1.1 Cálcio Intracelular

Conforme COTRAN et al. (2000), o cálcio livre no citosol é mantido em concentrações baixíssimas em comparação aos níveis extracelulares e a maior parte do cálcio intracelular está seqüestrada nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Durante a isquemia, há um aumento inicial da concentração citosólica de cálcio devido ao influxo líquido através da membrana plasmática e a sua liberação das mitocôndrias e retículo endoplasmático. Elevações continuadas do cálcio resultam em aumentos inespecíficos da permeabilidade da membrana. O Ca^{2+} elevado ativa uma série de enzimas, com efeitos potencialmente deletérios, tais como fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases.

Durante a reperfusão, há influxo maciço de cálcio para dentro da célula, provavelmente por alteração da permeabilidade da membrana (EVORA et al., 1996). O cálcio é captado pelas mitocôndrias após a reoxigenação, envenenando-as de maneira permanente, levando à inibição das enzimas celulares, desnaturando proteínas e causando as alterações celulares típicas de necrose de coagulação (COTRAN et al., 2000).

O cálcio citosólico aumenta para aproximadamente 3mM depois de 15min de isquemia global. Qualquer intervenção que atenuie o aumento de Ca^{2+} citosólico reduz a disfunção e morte de miócitos. O aumento do Ca^{2+} citosólico durante isquemia é dependente do aumento intracelular de Na^+ , sugerindo um papel na troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (COTRAN et al., 2000; MURPHY et al., 2002). Segundo KARMAZYN (1998), KARMAZYN (1999), XIAO & ALLEN (2000) e KARMAZYN et al. (2001), a bomba Na^+/H^+ é o maior regulador do pH intracelular durante o processo fisiológico. Entretanto, há evidências de que essa troca Na-H, durante a isquemia e reperfusão tem contribuído para danos celulares. Conforme KARMAZYN (1999), durante a isquemia, a síntese de ATP (adenosina trifosfato) inibida limita a saída de Na^+ intracelular resultando em uma elevação da

concentração intracelular de Na^+ . O efeito posterior seria o aumento intracelular de cálcio através de troca $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$.

1.1.2 Radical livre

Radical livre é o termo utilizado para caracterizar moléculas que contém elétron não pareado na última camada, sendo por esse motivo reativas o suficiente para causar lesão em estruturas biológicas (EVORA et al., 1996, COTRAN et al., 2000, FREITAS et al., 2002; BERTUGLIA & GIUSTI 2003; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

O mecanismo de lesão celular, na presença de espécies reativas de oxigênio, parece estar ligado à peroxidação de lipídeos da membrana celular (FREITAS et al., 2002).

O acúmulo de cálcio no citosol provocaria a ativação da protease calpaína, que promoveria a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase, levando à formação da enzima xantina oxidase. A xantina oxidase necessita de oxigênio para realizar a conversão de hipoxantina em xantina. Na fase de isquemia, portanto, ocorreria acúmulo dessas duas substâncias. Com a reperfusão, a hipoxantina seria oxidada em xantina e esta em ácido úrico, tendo como subproduto dessa reação a formação do ânion superóxido (Figura 1 e 2) (SILVA Jr. et al., 2002; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

O superóxido é um oxidante fraco e sua ação tóxica ocorreria em função dos produtos de sua redução, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila e o radical hidroxila (EVORA et al., 1996; TARDINI & YOSHIDA, 2003). Contudo, segundo EVORA et al. (1996), COTRAN et al. (2000) e TARDINI & YOSHIDA (2003) há vários sistemas não enzimáticos e enzimáticos que contribuem para a inativação das reações de radicais livres, que incluem:

- ✓ Antioxidantes que bloqueiam o desencadeamento da formação de radicais livres ou inativam e detêm a lesão por radicais, como vitaminas E e A;
- ✓ Catalase, presente nos peroxissomas ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$);

- ✓ Superóxido-dismutase ($2\text{O}_2^- + 2\text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)
- ✓ Glutationa-peroxidase: age catalizando a degradação de radicais livres ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$, ou $2\text{HO}^- + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$)

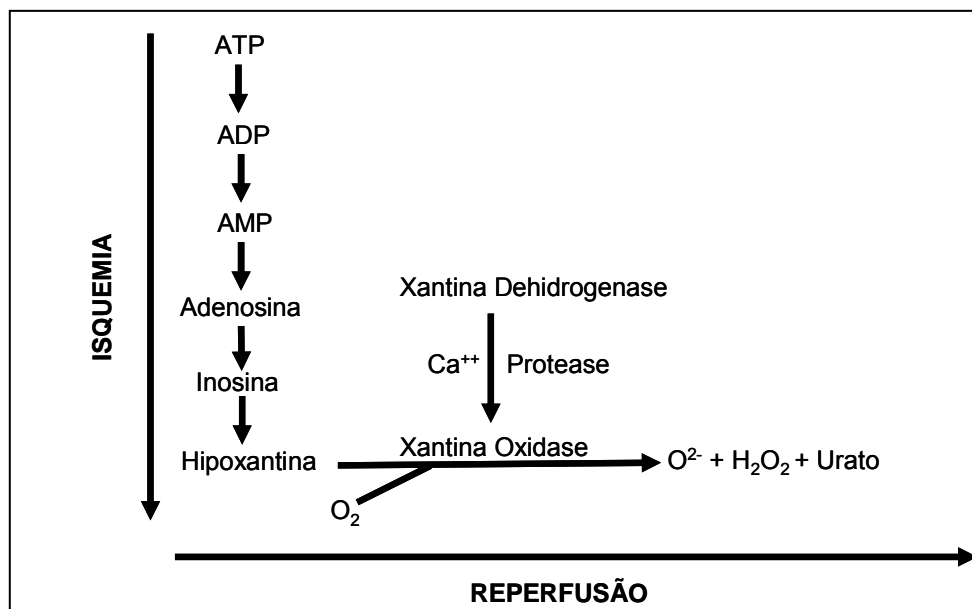


FIGURA 1 - Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio após períodos de isquemia e reperfusão.
Fonte: SILVA Jr. et al. (2002).

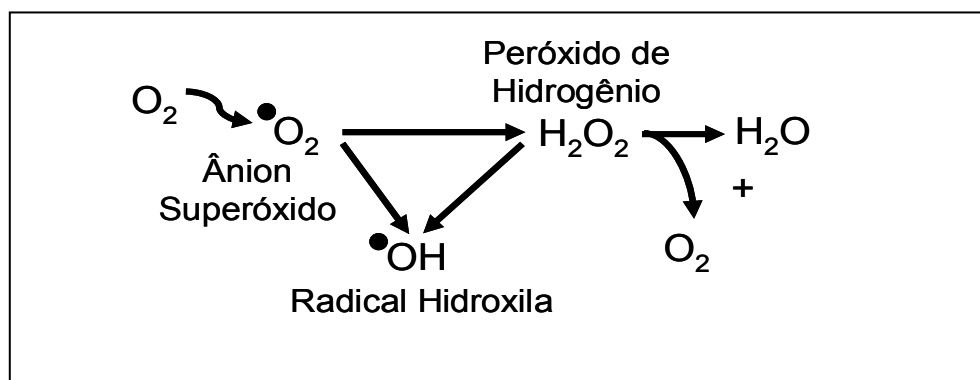


FIGURA 2 - Formação dos radicais livres do oxigênio. O oxigênio molecular (O_2) pode ser convertido no ânion superóxido (O_2^-) por fotólise ou pela ação de várias enzimas celulares como a xantina oxidase. O ânion superóxido liga-se espontaneamente a prótons para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical hidroxil altamente oxidante (OH^\bullet) pode ser gerado de cada peróxido de hidrogênio ou ânion superóxido.
Fonte: EVORA et al. (1996).

Segundo PERES et al. (2005), as espécies reativas de oxigênio são capazes de causar danos nas células renais pela peroxidação lipídica, oxidação da cadeia lateral de aminoácidos, formação de ligações cruzadas entre proteínas, fragmentação proteica pela oxidação do seu esqueleto peptídico e danos no DNA incluindo a quebra de fitas.

ANDRADE et al. (2004) relataram que o mecanismo oxidativo de lesão celular renal é duplo, pois de um lado há a geração direta de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da reperfusão via xantina oxidase, e de outro pela alteração do evento inflamatório com migração leucocitária para o sítio isquêmico após reperfusão e a síntese de EROs por estas células. Além disso, verificaram o efeito protetor do uso de antioxidantes após obstrução bilateral de pedículos renais por 30min.

1.1.3 Lesão de isquemia-reperfusão e disfunção endotelial

Trabalhos experimentais realizados no início dos anos 90 associaram a lesão induzida por isquemia global seguida de reperfusão à disfunção endotelial e agregação plaquetária. Utilizando cães e metodologias específicas para o estudo da função endotelial, evidenciou-se prejuízo da liberação do óxido nítrico, secundário a produtos plaquetários. Estes experimentos mostraram também que tal dano afetava seletivamente a liberação de NO mediada por receptores, mas que a habilidade da célula endotelial em produzi-lo, bem como a função da musculatura lisa, pareciam inalteradas. A disfunção seria uma consequência direta do comprometimento específico na transdução do sinal por G-proteínas (PEARSON et al., 1992; EVORA, 1994).

A disfunção endotelial após reperfusão seria caracterizada, conforme PAGLIARO et al. (2003), por uma redução endotelial da liberação de NO e por um aumento na liberação de EROs e endotelina. A redução da disponibilidade do NO induz adesão de neutrófilos no endotélio vascular, agregação de plaquetas e, com a contribuição da endotelina, vasoconstrição. A adesão de neutrófilos é seguida pela liberação de ânion superóxido pelos neutrófilos e células endoteliais.

1.1.4 Lesão de reperfusão causada por leucócitos

A lesão induzida por I/R é o principal fator etiológico da insuficiência renal aguda de rins nativos e de rins transplantados onde contribui para o surgimento de rejeição aguda na nefropatia crônica do enxerto. A I/R especialmente a fase de reperfusão desencadeia uma resposta inflamatória que contribui para alteração funcional vista nos órgãos pós-isquêmicos (PINHEIRO, 2001).

O neutrófilo tem sido considerado como um mediador central da lesão tissular em todo sistema orgânico susceptível à lesão de reperfusão. Uma vez ligados à superfície endotelial, os neutrófilos aceleram a disfunção destas células e destruição tissular através de uma variedade de mecanismos citotóxicos. Além disso, podem ocluir capilares e pequenas arteríolas e os neutrófilos ativados liberam uma série de substâncias, incluindo radicais livres do oxigênio, enzimas citotóxicas e citocinas. Muitas dessas substâncias também recrutam leucócitos adicionais e aumentam a sua adesividade ao endotélio vascular. Estes eventos não são restritos à superfície endotelial; com o agravamento da lesão, os neutrófilos infiltram-se no tecido, onde enzimas e radicais do oxigênio podem causar lesão tecidual (EVORA et al., 1996, COTRAN et al., 2000).

As perturbações metabólicas e da membrana que ocorrem nos leucócitos durante a quimiotaxia, ativação e fagocitose resultam na liberação de produtos não apenas dentro do fagossoma, mas também potencialmente no espaço extracelular. As mais importantes dessas substâncias nos neutrófilos são: (1) enzimas lisossômicas, presentes nos grânulos; (2) metabólitos ativos derivados do oxigênio; e (3) produtos do metabolismo do ácido araquidônico, incluindo as prostaglandinas e leucotrienos. Esses produtos são mediadores potentes da lesão endotelial e tecidual e amplificam os efeitos do estímulo inflamatório inicial (COTRAN et al., 2000).

1.2 Insuficiência renal aguda isquêmica (IRAi)

A isquemia renal é uma consequência da oclusão arterial, choque e transplante e é uma das causas mais comuns de insuficiência renal aguda (IRA),

iniciando uma complexa e inter-relacionada seqüência de eventos, resultando em lesão e eventual morte de células renais, no qual as células dos túbulos contorcidos proximais são particularmente susceptíveis (KARAMAN et al., 2006).

A insuficiência renal aguda é caracterizada por uma redução abrupta da função renal, que se mantém por períodos variáveis, resultando na incapacidade dos rins em exercer suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostase hidroeletrolítica do organismo. Um dos eventos mais precoces resultantes da isquemia é a redução dos níveis intracelulares de ATP, expondo as porções do néfron que possuem alta taxa de reabsorção tubular com gasto de energia, como o túbulo contorcido proximal e a alça ascendente espessa de Henle, que são particularmente mais susceptíveis à isquemia por apresentarem elevado consumo de ATP. A depleção de ATP desencadeia, por sua vez, uma série de eventos, dentre eles a produção de EROs, altamente tóxicas para a célula (ANDRADE et al., 2004).

O mecanismo oxidativo decorrente do processo isquemia-reperfusão contribui para os danos celulares e funcionais observados após a instalação da síndrome. A produção intensificada de EROs promove, entre outras alterações, a desestruturação do esqueleto celular, desarranjo da membrana com disfuncionalidade das bombas e ativação de enzimas oxidantes, além de alterações mitocondriais que limitam ainda mais a oferta de ATP para a célula. O evento inflamatório também está presente na IRAi, com migração leucocitária e polimorfonuclear, caracterizando disfunção também no endotélio vascular, que reduz a liberação de componentes vasoativos como o fator relaxante derivado do endotélio, ou NO, reconhecidamente envolvido na vasodilatação renal e, por tal motivo, considerado igualmente importante na instalação da síndrome (ANDRADE et al., 2004; KARAMAN et al., 2006).

A IRA produzida por isquemia e reperfusão é microscopicamente caracterizada pela perda da borda em escova dos túbulos proximais, desprendimento de células tubulares, debris celulares e áreas de regeneração celular. A necrose é imperceptível e restrita a regiões altamente sensíveis na parte mais externa da medular e a lesão glomerular é geralmente inexpressiva. Além disso, atenção importante é dirigida aos capilares peritubulares, que exibem

congestão vascular, danos endoteliais e acúmulo de leucócitos (DEVARAJAN, 2006, KARAMAN et al., 2006).

Deve-se acrescentar que a lesão renal pós isquêmica exhibe alterações regionais peculiares aos padrões do fluxo sanguíneo. Notavelmente, a marcada congestão e hipoperfusão da região mais externa da medula pode persistir ainda que haja melhora do fluxo sanguíneo durante a reperfusão. Mesmo sob condições normais, a região medular é mantida em níveis críticos de oxigenação, como um resultado do baixo fluxo sanguíneo e troca de oxigênio contracorrente, embora possua segmentos dos néfrons com necessidades energéticas muito elevadas (segmento S3 dos túbulos proximais). A característica da congestão pós-isquêmica piora a hipóxia relativa, levando a prolongada lesão celular e morte celular nestes segmentos tubulares mais predispostos (BOVENTRE & WEINBERG, 2003; DEVARAJAN, 2006). Contudo, as células tubulares proximais são mais susceptíveis à privação de ATP do que as células do túbulo distal e da alça ascendente de Henle (PERES et al. 2005).

Estudos experimentais indicam que as células epiteliais tubulares podem sofrer um dos três destinos distintos após lesão renal aguda isquêmica. A maioria das células pode permanecer viáveis, indicando que não foram lesadas ou foram acometidas de lesão subletal e recuperadas, ou as células podem morrer por necrose ou apoptose. A necrose é um processo caótico que se caracteriza pela perda da integridade da membrana, edema citoplasmático e fragmentação celular. A apoptose é caracterizada por condensação citoplasmático e nuclear, fragmentação do DNA, separação dos corpos apoptóticos que serão facilmente eliminados por fagocitose. Estas duas formas de morte celular podem coexistir. Após lesão renal isquêmica o tipo de morte celular vai depender essencialmente da gravidade do estímulo isquêmico e da resistência do tipo de célula. A necrose habitualmente ocorre após lesão mais grave e nos segmentos de néfrons mais suscetíveis, enquanto a apoptose predomina após lesões mais leves e especialmente nos segmentos distais dos néfrons (DEVARAJAN, 2006).

1.3 Junção de aderência

Tecidos epiteliais, como do rim e intestino, não funcionam somente como barreira física entre os compartimentos biológicos, mas mediam o transporte de íons, água e macromoléculas entre o sangue e o ambiente externo. Estas funções dependem da integridade das junções intercelulares que são: junções de aderência, junções tipo *gap*, e junções tipo *tight*, que são gravemente afetadas pela isquemia e reperfusão (BUSH et al. 2000).

Dos tipos de junções entre células vizinhas, as mais conhecidas ao nível molecular são as junções de aderência (JA), que mediam a adesão dependente de cálcio e ancoram a actina do citoesqueleto entre células vizinhas. As junções de aderência se estruturam em torno das caderinas, glicoproteínas transmembrânicas cujos domínios extra celulares interagem homologamente com caderinas de células vizinhas. Os diversos tipos de caderinas de vertebrados são expressas em uma grande variedade de células (KIRKPATRICK & PEIFER, 1995).

As caderinas são encontradas em tecidos diversos do organismo, e foram denominadas de acordo com o tecido aonde foram descobertas ou são mais abundantes. As chamadas caderinas clássicas são: E-caderina (E = epitelial), N-caderina (N = neuronal), P-caderina (P = placentária) e VE-caderina (VE = vascular endotelial). Apesar dos diversos tipos de caderina apresentarem semelhança estrutural entre si, suas distribuições no organismo animal são variáveis; por exemplo, a VE-caderina é exclusiva de endotélios, sendo utilizada inclusive como um marcador de endotélio (ARAÚJO, 2001).

As caderinas clássicas são proteínas transmembrânicas compostas por regiões citoplasmáticas altamente conservadas e um domínio extracelular com cinco subdomínios estruturais contendo motivos de ligação de cálcio (Figura 3). A atividade das caderinas clássicas envolve interações em ambos os lados da membrana. Pelo lado extracelular, o reconhecimento homofílico, específico a cada tipo de caderina, é provavelmente o resultado de seqüências localizadas dentro da primeira repetição, EC1. Essa seqüência inclui aminoácidos vizinhos à seqüência HAV (código de letra única para aminoácidos) que é conservada em muitas caderinas. O próprio motivo HAV está envolvido nas interações de adesão,

mas outros motivos que não possuem essa seqüência também podem estar envolvidos no processo de adesão. Do lado intracelular, a atividade das caderinas depende das seqüências que interagem com proteínas citoplasmáticas, as cateninas, que ligam as moléculas de caderina à actina do citoesqueleto (RANSCHT, 1994).

A estrutura molecular das caderinas foi descrita por TAKEICHI (1995). O domínio extracelular das caderinas pode ser dividido em cinco sub-domínios baseados em seqüência de aminoácidos, conhecido como EC1-5. O domínio extracelular das caderinas forma um dímero, no qual dois monômeros são arranjados em paralelo na membrana plasmática. Cada unidade do dímero interage com aquela do dímero correspondente na membrana oposta, formando um “dímero de adesão” na porção amino-terminal. Considerando-se a estrutura como um todo, foi proposto que os dímeros são arranjados como um zíper no espaço intercelular. Diferentes análises sugerem que o Ca^{2+} , um íon essencial para a função da caderina, está envolvido na ligação dos cinco sobre domínios sucessivos pra conferir a morfologia em forma de vara (Figura 3).

Associado ao domínio citoplasmático das caderinas, está organizado uma estrutura de proteínas periféricas à membrana, as cateninas, que são responsáveis pela ligação das caderinas à actina e por mediação de sinais intracelulares em resposta à adesão. A formação do complexo caderina-catenina é essencial para a adesão mediada por caderinas, sugerindo que as cateninas possuem influência sobre o domínio extracelular das caderinas (KIRKPATRICK & PEIFER, 1995).

Na formação do complexo caderina-catenina, a β -catenina possui um papel central de ligar a caderina à α -catenina, as quais não se ligam diretamente. A estrutura da β -catenina pode ser dividida em três domínios: uma região central de 12-13 cópias imperfeitas de repetições de 42 aminoácidos (repetições Arm), flanqueados por domínios amino e carboxi-terminais. As repetições Arm são um motivo de interação proteína-proteína observadas nesse grupo de proteínas celulares. As repetições Arm da β -catenina se ligam à caderina, e a região amino-terminal se liga à α -catenina. A γ -catenina também apresenta essa estrutura de três domínios e também se liga à α -catenina. Uma região de 30 aminoácidos do

domínio citoplasmático da caderina é requerido para a interação com a β -catenina. (KIRKPATRICK & PEIFER, 1995).

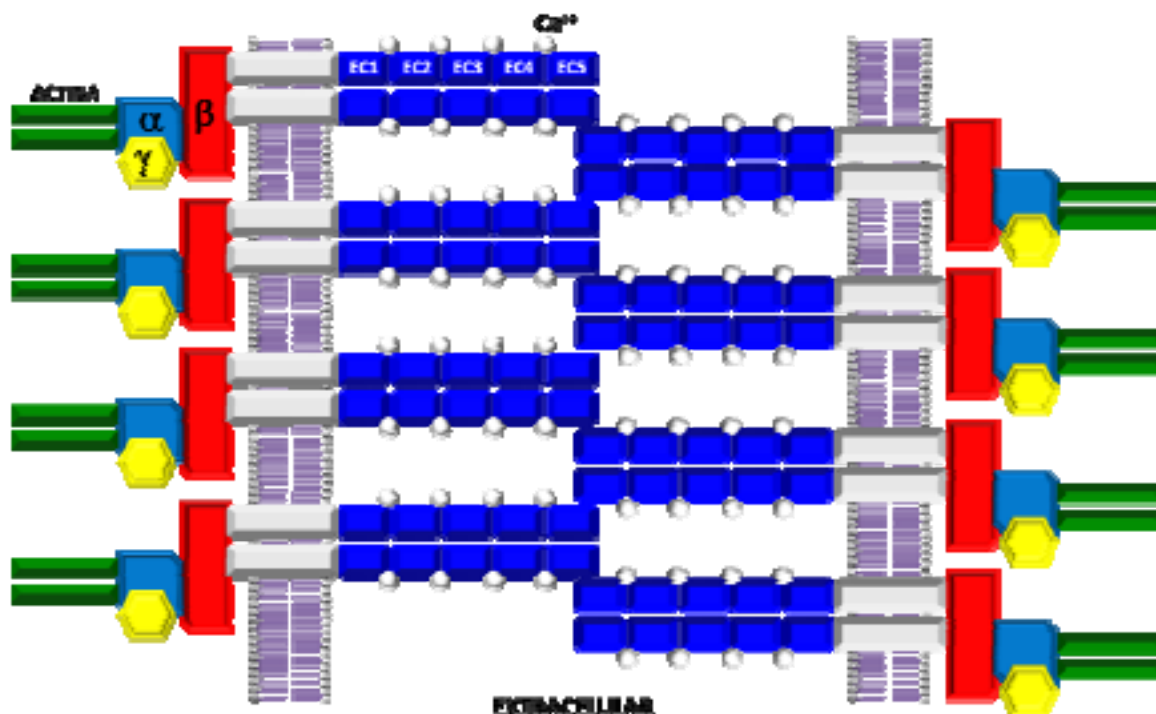


FIGURA 3 - Desenho esquemático da estrutura das junções de aderência entre duas células vizinhas e sua respectiva relação com o citoesqueleto (actina); α : α -catenina; β : β -catenina; γ : γ -catenina (placaglobina); EC1-5: subdomínios extracelulares constituintes da caderina ligadas entre si com auxílio do cálcio.

Fonte: DAMASCENO (2007).

A formação do complexo caderina/ β -catenina- γ -catenina/ α -catenina é um processo de etapas múltiplas. Imediatamente após a síntese no retículo endoplasmático, a caderina se associa à β ou à γ -catenina. O complexo é transportado até a membrana plasmática, e a α -catenina se adiciona concomitante à sua chegada (RANSCHT, 1994).

A depleção de ATP em cultura de células renais mostrou rápida internalização da E-caderina. Um estímulo prolongado conduz não só a interiorização da E-caderina, mas também à quebra proteolítica desta proteína em um sítio específico na interação caderina-catenina. Mas apesar da E-caderina ser clivada, seus ligantes citoplasmáticos, as cateninas permanecem perto do seu

estado de equilíbrio durante períodos prolongados de depleção de ATP (BUSH et al., 2000).

1.4 Avaliação da função renal

Dependendo do tempo de isquemia e do momento da reperfusão, pode haver desde simples alterações bioquímicas até necrose celular (SILVA Jr. et al., 2002). O extravasamento de enzimas intracelulares e outras proteínas através da membrana plasmática anormalmente permeável, tanto para o interstício quanto para o interior do plasma, fornecem parâmetros clínicos importantes de morte celular (COTRAN et al., 2000).

Uma ampla variedade de doenças renais, com lesões glomerulares, tubulares ou vasculares, podem causar aumento dos níveis de uréia no plasma. Entretanto, a uréia como indicador independente da função renal é limitada pela variabilidade de seus níveis no sangue, como resultado de fatores não-renais, tais como desidratação leve, muita proteína dietética no alimento, catabolismo protéico aumentado e depleção de massa muscular. Assim, a principal utilidade clínica da determinação da uréia no plasma assenta-se na sua determinação em conjunto com a dosagem de creatinina plasmática (WHELTON et al., 1998).

A creatinina não é amplamente influenciada pela dieta e sua produção diária a partir do metabolismo muscular é relativamente constante e não sofre tantos efeitos metabólicos. Em virtude de a creatinina ter produção endógena e ser liberada nos líquidos corporais uma taxa constante, e de seus níveis plasmáticos permanecerem dentro de limites estreitos, sua depuração pode ser determinada como um indicador da taxa de filtração glomerular (COLES, 1984; WHELTON et al., 1998).

Qualquer anormalidade que diminui a taxa de filtração glomerular irá resultar na elevação da concentração de creatinina. Como existem poucos fatores extra-renais que podem influenciar a concentração de creatinina, esta tem sido reputada como uma prova de maior especificidade para detecção de enfermidades renais. A elevação na concentração de creatinina pode indicar uma redução funcional ou orgânica da função do néfron, porém esse fato não é de

valor na indicação do grau de reversibilidade ou irreversibilidade do processo patológico subjacente, pois o conhecimento do nível de creatinina não permite o estabelecimento do diagnóstico (COLES, 1984).

A determinação das proteínas urinárias foram citadas no diagnóstico precoce da doença túbulo-intersticial, em que o método quantitativo mais adequado para a avaliação dos níveis de proteína na urina refere-se à determinação do conteúdo protéico de uma amostra de 24 horas (WHELTON et al., 1998). No entanto, os índices proteína urinária:creatinina urinária substituem com vantagens o volume total de 24 horas, já que a creatinina é produzida em uma taxa constante e filtrada livremente, desta forma ao aplicar-se o índice, o efeito do volume de urina sobre a concentração de proteína em uma única amostra é anulado (REGO et al., 2001).

De acordo com HENNEMANN et al. (1997), as enzimas urinárias foram citadas por uma variedade de autores como um sensível indicador de lesão renal, mas embora tenham sido estudadas uma ampla variedade de enzimas, poucas tem se destacado na prática clínica. É necessário o desenvolvimento de novos testes renais mais específicos visando o diagnóstico precoce e específico de lesão renal, uma vez que uma das características dos rins é sua capacidade compensatória ao prejuízo metabólico, onde se observa danos funcionais somente quando houver perda de 3/4 da capacidade funcional dos néfrons de ambos os rins.

A enzima γ -glutamiltransferase (GGT) está presente na borda em escova dos túbulos proximais renais e sua detecção na urina tem sido apontada como um bom método diagnóstico para lesão ou disfunção tubular renal (SANTIN et al., 2006). CLEMO (1998) mencionou que a elevação de GGT urinária mostrou-se superior aos métodos convencionais utilizados para avaliação da lesão renal como a urinálise e determinação das concentrações séricas de uréia e creatinina.

1.5 Pré-condicionamento isquêmico e ação da clorpromazina

A lesão isquêmica do rim é associada com alta morbidade e mortalidade, logo a melhora na capacidade deste órgão para tolerar esta lesão

isquêmica terá implicações clínicas importantes (VIANNA, 2006). A renoproteção é uma estratégia que visa interromper ou reverter este processo de lesão (PERICO et al., 2005).

Segundo HAWALESHKA & JACOBSON (1998) e VIANNA (2006), o grande potencial na proteção de órgãos por meio do pré-condicionamento isquêmico surgiu com a pesquisa de MURRY et al (1986), que consistia de quatro ciclos de 5 minutos, alternados entre isquemia/reperfusão da artéria coronária antes da oclusão coronariana pelo período de 40 minutos. O resultado foi a redução da área de infarto em 75% no grupo de cães que sofreram influência destes pequenos períodos de oclusões prévias e que passou a ser denominado pré-condicionamento.

O pré-condicionamento isquêmico é o fenômeno de adaptação dos tecidos vivos contra uma lesão celular irreversível no sentido de atenuá-la, por meio de mecanismos endógenos do organismo a partir de um estímulo também isquêmico programado e de menor duração. Em outras palavras, seria a resposta à aplicação de ciclos breves de I/R a um órgão, conferindo-lhe maior capacidade de suportar um período subsequente de isquemia mais longo, com dano tecidual menor, atuando como medida preventiva e promovendo uma resposta celular de provável adaptação contra a lesão isquêmica (LIMA, 2004).

De acordo com VIANNA (2006), é de interesse para anestesiologia o acúmulo de conhecimento acerca do mecanismo molecular atuando no pré-condicionamento, mostrando a possibilidade de modulação da isquemia/reperfusão via ação de fármacos, e, dentre estes, os anestésicos. Este pré-condicionamento passou a ser chamado de farmacológico.

A clorpromazina pertence ao grupo dos tranqüilizantes maiores e pode ser classificada, de acordo com sua estrutura química, como um derivado fenotiazínico (SPINOSA et al., 1999). Os tranqüilizantes maiores são absorvidos pelo trato gastrointestinal e por via parenteral. Uma vez absorvidos, são amplamente distribuídos pelos tecidos, principalmente fígado, pulmões e encéfalo, sofrendo diferentes processos de biotransformação (oxidação, hidroxilação, conjugação) e são eliminados pela urina e também pelas fezes (GILMAN et al., 1996; SPINOSA et al., 1999).

Os fenotiazínicos são utilizados principalmente como medicação pré-anestésica, potencializadores da analgesia (neuroleptoanalgesia) e como antieméticos. Como tranquilizantes maiores, possuem alto índice terapêutico, sendo portanto medicamentos bastantes seguros. A dose terapêutica indicada para aplicação intravenosa varia entre 1,0 e 3,0mg/kg para cães e gatos (VIANA, 2003).

ARAÚJO et al. (2002), utilizando ratos, observaram apenas um pequeno decréscimo na função renal do grupo submetido à isquemia e previamente tratado com clorpromazina, na dosagem de 3mg/kg via IV, mas que não foi estatisticamente significativo. Entretanto, ressaltam a importância de estudos futuros, preocupando principalmente com transplantes renais em seres humanos.

TUCCI Jr. et al. (2008) citaram que a clorpromazina conferiu proteção parcial na função renal aos rins de ratos submetidos a 60 minutos de isquemia, seguido de reperfusão após aplicação de 3mg/kg de clorpromazina intravenosa 15 minutos antes da isquemia renal.

É importante lembrar que os mecanismos de proteção podem ser esgotados quando a lesão celular é muito grave em intensidade ou extensão (por exemplo, nos casos em que tempo de isquemia é maior do que aquela suportável pelo tecido), impedindo qualquer resposta adaptativa uma vez que até os mecanismos de sobrevivência já foram superados (LIMA, 2004).

O estudo dos mecanismos de lesão conseqüente da isquemia e reperfusão renal tem aplicação importante na medicina. A elucidação dos processos bioquímicos envolvidos em situações clínicas como transplante renal e insuficiência renal aguda, em que a ruptura das junções de aderência é um mecanismo provável de lesão, deverá contribuir com o desenvolvimento de novas drogas para minimizar os efeitos deletérios sobre os órgãos afetados.

O objetivo deste trabalho foi descrever o efeito da clorpromazina na função renal e avaliar a hipótese de que existem alterações histológicas e estruturais das proteínas de junção de aderência de cães submetidos à isquemia e reperfusão.

4 REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, S. C.; DEZOTI, C.; SHIBUYA, C. A.; WATANABE, M.; VATTIMO, M. F. F. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do alopurinol e n-acetilcisteína como antioxidantes. **The International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.69-75, 2004.
2. ARAÚJO, E. G. **Perfil de ativação da via das MAP quinases ERK 1/2 e alterações das proteínas das junções de aderência em suínos submetidos á circulação extra-corpórea**. 2001a. 116 f. Tese (Doutorado em Biologia molecular) - Universidade de Brasília, UNB.
3. ARAUJO, W. M.; JUNIOR, S. T.; COSTA, R. S.; FERREIRA, R. A; POZZA, M. L.; MAZZETO, S. A.; ALVES, P.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A C. P. Animal model of ischemic injury, and chlorpromazina protector effect, evaluate by TC-99M-MAG3 dynamic renal scan. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, suppl.3, p.15-19, 2002.
4. BERTUGLIA, S.; GIUSTI, A. Microvascular oxygenation, oxidative stress, NO suppression and superoxide dismutase during postischemic reperfusion. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, California, v.285, n.3, p.1064-71, 2003.
5. BONVENTRE, J. V.; WEINBERG, J. M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure, **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v.14, p.2199–2210, 2003.
6. BUSH, K. T.; KELLER, S. H.; NIGAM, S. K. Genesis and reversal of the ischemic phenotype in epithelial cells. **The Journal Clinical Investigation**, Michigan, v.106, n.5, p.621–626, 2000.
7. CLEMO, F. S. S. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog, **Journal of Toxicologic Pathology**, Tokio, v.26, n.1, p.29-32, 1998.
8. COLES, E. H. Função renal. In: COLES, E. H. **Patologia clinica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. p.220-258.
9. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robins: Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000, 1251p.

10. DAMASCENO, A. D. **Perfil de ativação da via das MAP quinases ERK 1/2 e estudo das proteínas de junções de aderência em miocárdio de camundongos infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi***. 2007. 60f. (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
11. DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v.17, n.6, p.1503-1520, 2006.
12. EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SCHAFF, H. V. Impaired endothelium-dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. **The Annals Thoracic Surgery**, Boston, n.57, p.1550-6, 1994.
13. EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Atualização: Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.4, n.66, p.239, 1996.
14. FALEIROS, R. R.; ALVES, G. E. S.; SILVA, R. F.; OLIVEIRA, V. P.; SILVA, G. J. Isquemia arteriovenosa completa como modelo de injúria de isquemia/reperfusão no cólon menor de equinos. **Anais... CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA 3**. Belo Horizonte. 20 a 25 de setembro de 1998.
15. FONDEVILA, C.; BUSUTTIL, R. W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury: a fresh look. **Experimental and Molecular pathology**, New York, v.2, n.74, p.86-93, 2003.
16. FREITAS, F. A. S.; PICCIATO, C. E.; CAMPOS, A. D.; CHERRI, J. Estudo da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, suppl.3, p.74-78, 2002.
17. GILMAN, A. G.; RUDDON, M.; LIMBIRD, H. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. México: McGRAW-HILL. 1996. 1436p.
18. HAWALESHKA, A.; JACOBSON, E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. **Canadian Journal of Anesthesia**, Toronto, v.45, p.670-682, 1998.

19. HENNEMANN, C. R. A.; SILVA, C. F.; SCHOENAU, W.; KOMMERS, G. D.; POLYDORO, A. S.; LEITZKE, M. R. M. Atividade da gamma glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de uréia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeo em cães, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.2, p.237-244, 1997.
20. KARAMAN, A.; TURKMEN, E.; GURSUL, C.; TAS, E.; FADILLIOGLU, E. Prevention of renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats by leflunomide. **International Journal of Urology**, Osaka, v.13, p.1434-1441, 2006.
21. KARMAZYN, M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediating ischemic and reperfusion injury. **The Keio Journal of Medicine**, Tokyo, v.47, n.2, p.65-72, 1998.
22. KARMAZYN, M. Mechanisms of protection of the ischemic and reperfused myocardium by sodium-hydrogen exchange inhibition. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, Dordrecht, v.8, n.1, p.33-8, 1999.
23. KARMAZYN, M., SOSTARIC J. V.; GAN, X. T. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. **Drugs**, Ontario, v.61, n.3, p.375-89, 2001.
24. KIRKPATRICK, C.; PEIFER, M. Not just glue: cell-cell junctions as cellular signaling. **Current Opinion in Genetics and Development**, Bimonthly, v.5, p.56-65, 1995.
25. KUROSE, I.; WOLF, R.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. **Circulation Research**, Baltimore, n.74, p.376-82, 1994.
26. LIEBERTHAL, W.; NIGAM, S. Y. K. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. **American Journal Renal Physiology**, Bethesda, v.278, n.1, p.F1-F12, 2000.
27. LIMA, L. V. S. **Associação da ciclosporina "A" ao pré-condicionamento isquêmico em rim de ratos submetidos à isquemia normotérmica e reperfusão**. 2004. 70f. (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, São Paulo.
28. MORENO, J. B.; FRANCISCHETTI, I.; HAFNER, L. Lesões de isquemia-reperfusão em músculos esqueléticos: fisiopatologia e novas tendências de

- tratamento, com ênfase em reperfusão controlada. **Jornal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v.1, n.2, p.113-20, 2002.
29. MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Revista Brasileira de Cardiologia Vascular**, São Paulo, v.16, n.4, p.376-387, 2001.
30. MURPH, E.; CROSS, H. R.; STEENBERGEN, C. Is Na/Ca exchange during ischemia and reperfusion beneficial or detrimental?. **Annals of the New York Academic Sciences**, New York, v.976, p.421-30, 2002
31. MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation Journal**, Kyoto, v.74, p.1124-1136, 1986.
32. NETTO, J. M. B.; TUCCI Jr., S.; COLOGNA, A. J.; SUAID, H. J.; MARTINS, A. C. P.; MOLINA, C. A. F.; ROSELINO, J. E. S. Clorpromazina e função mitocondrial na isquemia-reperfusão renal. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.16, suppl.1, p.36-40, 2001.
33. PAGLIARO, P.; CHIRIBIRI, A.; MANCARDI, D.; RASTALDO, R.; GATTULLO, D.; LOSANO, G. Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion and its prevention by ischemic preconditioning. **Italian Heart Journal**, Roma, v.4, n.6, p.383-94, 2003.
34. PEARSON, P. J.; LIN, P. J.; SCHAFF, H. V. Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery: a possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**, St. Louis, n.103, p.1147-54, 1992.
35. PERES, L. A. B.; MOCELIN, A. J.; DELFINO, V. D. A. Injúria da Isquemia/Reperfusão: Implicações no Transplante Renal. **The International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v.27, n.4, p.207-214, 2005.
36. PERICO, N.; CODREANU, I.; SCHIEPPATI, A. REMUZZI, G. **The future of renoprotection. Kidney International**, Brussels, n.68, p.S95–S101, 2005.
37. PINHEIRO, H. S. **O papel do linfócito T CD4+ na lesão de isquemia/reperfusão renal num modelo experimental de insuficiência**

- renal aguda.** 2001. 217f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, USP.
38. RANSCHT, B. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v.6, p.740-746, 1994.
39. REGO, A. B. A. S.; KOGIKA, M. M.; SANTORO, M. L.; HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. S. Eletroforese das proteínas urinárias de cães normais e cães com doença renal em gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.7, n.2, p.65-72, 2001.
40. RHODEN, E. L.; TELÖKEN, C.; SOUTO, C. A. V.; RHODEN, C. R.; LUCAS, M. L.; BELLÓ-KLEIN, A. Effects of L-arginine and L-NAME on renal ischemia-reperfusion in rats. **The International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, n.27, p.78-83, 2001.
41. SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, suppl.3, p.96-100, 2002.
42. SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999, 646 p.
43. SANTIN, F.; MOUTINHO, F. Q.; AMARAL, A. S.; TAKAHIRA, R. K. Acompanhamento laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina B, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1816-23, 2006.
44. TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v.7, p.619-627, 1995.
45. TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v.2, n.2, p.119-28, 2003.
46. TUCCI JUNIOR, S.; CARVALHO, R. M.; CELINI, F. M. Renal ischemia and reperfusion injury: influence of chlorpromazine on renal function and lipid peroxidation. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.23, suppl.1, p.42-46, 2008.

47. VIANA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. Belo Horizonte: CEM, 2003. 324p.
48. VIANNA, PTG . Atualidade do pré-condicionamento e proteção renal. In: Ismar Lima Cavalcante; Fernando Antonio de Freitas Cantinho; Alexandra Resende Assad. (Org.). **Medicina Perioperatória**. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado de São Paulo, 2006, p. 579-582.
49. XIAO, X. H.; ALLEN, D. G. Activity of the Na⁺/H⁺ exchanger is critical to reperfusion damage and preconditioning the isolated rat heart, **Cardiovascular Research**, London, v.48, n.2, p.244-53, 2000.
50. WHELTON, A.; WATSON, A. J. ROCK, R. C. Metabólitos nitrogenados e função renal. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. D. (Ed.). **Fundamentos de química clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1998. p.552-574.

CAPÍTULO 2 – Avaliação do efeito da clorpromazina sobre a função renal de cães submetidos à isquemia e reperfusão

Evaluation of chlorpromazine effect at renal function in dogs submitted to ischemia and reperfusion

RESUMO

A isquemia renal está presente em diferentes situações como em cirurgias renais, vasculares e no transplante renal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a integridade e a função renal de cães submetidos à isquemia e reperfusão com ou sem aplicação de clorpromazina. Para tanto foram utilizados 12 cães distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis indivíduos: grupo A com isquemia e reperfusão sem tratamento por clorpromazina e o grupo B com isquemia e reperfusão tratados previamente com clorpromazina. De cada animal colheu-se sangue e urina antes da isquemia, no início da reperfusão, após 120 minutos de reperfusão e semanalmente até 28º dia pós-cirúrgico para verificar possíveis efeitos tardios da isquemia/reperfusão. Avaliações da integridade e função renal foram feitas por exame clínico, concentração sérica de uréia e creatinina e determinação da GGT urinária. A avaliação da relação proteína urinária/creatinina urinária (PU/CU) e atividade da GGT urinária são exames mais sensíveis para detectar lesão tubular aguda que o exame de urina de rotina, uma vez que estas variáveis apresentaram alteração mais precocemente. Não houve ação protetora da clorpromazina conforme constatado por meio da urinálise, dosagens séricas de uréia e creatinina, excreção urinária de GGT e relação PU/CU.

Palavras-chave: fenotiazínico, gama-glutamilttransferase, insuficiência renal

ABSTRACT

Renal ischemia is present in different situations such as vascular or kidney surgery and also in renal transplantation. The aim of this study was to evaluate the renal function in dogs submitted to ischemia and reperfusion after chlorpromazine application. Twelve adult mongrel dogs were distributed into two groups with six animals: group A - ischemia and reperfusion without previous administration of chlorpromazine; group B - ischemia and reperfusion treated previously with chlorpromazine. Blood and urine samples were harvested in four different times: before ischemia, at the beginning of reperfusion, 120 minutes after of reperfusion and every week until postsurgical day 28 in order to check the possible ischemia/reperfusion late effect. Renal function was evaluated by clinical examination, serum urea and creatinine levels and urinary GGT activity. PU/CU and urinary activity of GGT were more sensitive for detecting acute tubular injury then routine urine examination, because these variables showed earlier alterations. It was not possible to verify the chlorpromazine protective action through urinalysis, creatinine and urea serum levels, excretion of GGT urinary and urine protein:creatinine ratio.

Keywords: fenothiazinic, gamma-glutamyltransferase, acute renal failure

INTRODUÇÃO

Isquemia é a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial de um tecido, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos, incluindo a glicose (COTRAN et al., 2000). Reperusão é o termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia (EVORA et al., 1996). A isquemia, por si só, é bastante lesiva, mas a reperusão do tecido isquêmico pode levar a uma série de complicações, que podem aumentar as lesões teciduais e, associado às complicações sistêmicas, colocar em risco a vida do paciente (CALVERT et al., 2003).

O entendimento dos mecanismos envolvidos nos danos da isquemia/reperusão é essencial para definir estratégias terapêuticas e minimizar suas conseqüências. A reação ao oxigênio, após a reperusão, implica em danos teciduais e inicia uma cascata de respostas celulares deletérias precedendo a inflamação, morte celular e por último, falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003).

Um dos modelos de isquemia/reperusão mais estudados é a oclusão temporária da artéria renal (ARAÚJO et al., 2002). Os danos causados pela hipóxia nas células tubulares representam o primeiro evento em casos de falência renal aguda. Além da perda da polaridade celular, há ainda produção de radicais livres, entrada de cálcio e ativação de genes para proteção ou regeneração celular (BREZIS & EPSTEIN, 1993).

Segundo KERR (2003) e FORTERRE et al. (2004), os exames primários mais apropriados para o diagnóstico inicial de uma disfunção renal são uréia e creatinina séricas. Porém, ainda afirmaram que a uréia não é um indicador inteiramente específico de lesão renal, além de aumentar devido a efeitos pré-renais. Já a creatinina é mais específica e pouco influenciada por efeitos pré-renais. Entretanto, essas substâncias geralmente não aumentam até que mais de 60% dos néfrons estejam sem função, ou seja, trata-se de um marcador específico mas de baixa sensibilidade.

Não existem enzimas plasmáticas específicas para avaliar a função renal; entretanto a análise de enzimas urinárias, especialmente a γ -

glutamiltransferase (GGT) pode ser útil na identificação de nefrotoxicidade aguda. A enzima GGT está presente na borda em escova dos túbulos proximais renais e sua detecção na urina tem sido apontada como um bom método diagnóstico para lesão ou disfunção tubular renal (RIVERS et al., 1996). Esta localização única nas células renais pode demonstrar com facilidade os danos causados por uma injúria isquêmica (SANTIN et al, 2006).

DiBARTOLA (1997) descreveu que a quantificação da proteína na urina é uma avaliação da função glomerular e/ ou tubular. Para FORTERRE et al. (2004) e PRICE et al. (2005), a detecção de um aumento na excreção de proteínas tem tanto valor diagnóstico ou prognóstico na detecção inicial e confirmação de doença renal, e a quantificação da proteinúria pode ter valor considerável na avaliação da eficácia terapêutica e da progressão da doença.

Considerando-se a oscilação do volume urinário e da concentração de solutos em uma micção, sugere-se que a avaliação seja feita no volume urinário total de 24 horas (FINCO, 1995). No entanto, os índices proteína urinária/creatinina urinária (PU/CU) substituem com vantagens o volume urinário total de 24 horas, já que a creatinina é produzida em uma taxa constante e filtrada livremente. Assim, ao aplicar-se o índice, o efeito do volume de urina sobre a concentração de proteína em uma única amostra é anulado (REGO et al., 2001).

Em transplantes, embora a perfusão com solução própria seja possível e parcialmente eficaz, novos estudos são necessários para evitar a perda da função do órgão doado devido à danos isquêmicos. Intervenções farmacológicas nesses processos apresentam grande potencial de melhorar as condições clínicas em cirurgias que envolvam isquemia e reperfusão (JAESCHKE, 2003). Dentre as opções recentemente estudadas de pré-condicionamento farmacológico, tem-se à proteção conferida pela clorpromazina cuja ação protetora ainda não foi totalmente esclarecida (NETTO et al. 2001; ARAÚJO et al., 2002).

De acordo com CHIEN et al. (1977), sua ação protetora contra a lesão isquêmica só ocorre quando administrada previamente ao momento da parada de aporte sangüíneo ao tecido. O efeito protetor está associado à alteração do metabolismo do cálcio, recuperação de ATP e perda de fosfolípidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a integridade e a função renal de cães submetidos à isquemia e reperfusão após a aplicação de clorpromazina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 12 animais da espécie canina (*Canis familiaris*), adultos, sem raça definida, machos, com peso corpóreo entre 10 e 25kg, obtidos junto ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Goiânia e transferidos para o canil de Experimentação Científica da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

Previamente ao estudo experimental, os cães foram avaliados clinicamente para a identificação de enfermidades sistêmicas e renais que pudessem interferir nos resultados. Foi realizada ainda colheita de urina e sangue para hemograma e pesquisa de hematozoários, conforme rotina do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFG, para ratificação das condições de higiene orgânica. Durante o período experimental os animais foram mantidos em boxes individuais de alvenaria, acesso livre ao solário, água *ad libitum* e ração comercial com proteína bruta de 22% em duas porções diárias.

Os animais foram divididos em dois grupos de seis indivíduos:

Grupo A: cães submetidos a isquemia e reperfusão sem clorpromazina.

Grupo B: cães medicados com clorpromazina e submetidos à isquemia e reperfusão.

Procedimento cirúrgico e pós-operatório

Os animais foram submetidos a indução anestésica com aplicação de propofol intravenoso (Propovan, Cristália, São Paulo) e manutenção anestésica com halotano (Halotano, Hoechst do Brasil, São Paulo). A pressão arterial média foi aferida por meio da canulação da artéria femural e aferição direta em manômetro aneróide de acordo com a técnica proposta por REZENDE et al. (2002).

Foi realizada uma incisão paracostal esquerda para identificação e isolamento do rim e da artéria renal esquerdos. Após o isolamento da artéria, os animais de todos os grupos tiveram o vaso clampado com auxílio de uma pinça Satinsky. Os animais do grupo B receberam clorpromazina (Amplictil, Aventis Pharma, São Paulo) via intravenosa, na dose de 5 mg/kg, 15min antes da clampagem do vaso, que teve duração de 1h. Após este período, a artéria renal foi desobstruída e ao longo de 2h foram colhidas seis amostras de parênquima renal esquerdo, com utilização de agulha de biópsia para tecidos moles (*Tru-cut*[®]) para posterior avaliação histológica.

Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foi realizada a administração de cloridrato de tramadol na dose de 0,1mg/kg/SC duas vezes por dia durante três dias e cefalexina duas vezes ao dia, via oral, por 10 dias. Todos os cães foram doados ao final do experimento.

Avaliações laboratoriais

Foram realizadas sete colheitas de sangue e urina nos seguintes tempos: 5min antes da isquemia (I^0); após 1h de isquemia (I^{1h}); após 2h de reperfusão (R^{2h}) e prosseguiu aos 3 dias (R^{3d}), 7 dias (R^{7d}), 21 dias (R^{21d}) e 28 dias (R^{28d}), para verificar possíveis efeitos tardios da isquemia/reperfusão. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular e as amostras de urina foram colhidas por meio de micção espontânea ou sondagem uretral.

Para as provas bioquímicas séricas, 8mL de sangue foram colhidos em tubos à vácuo (Vacutainer[®], Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, São Paulo) sem anticoagulante. O soro foi obtido a partir da centrifugação do sangue total e submetido ao congelamento (-20°C) até o momento da realização dos exames. A determinação dos exames físicos e químicos foi realizada na urina recém colhida e posteriormente centrifugada por cinco minutos, para realização da sedimentoscopia.

A avaliação da integridade e da função renal foi realizada por meio de exame de urina, da determinação da concentração sérica de uréia e creatinina, do

estabelecimento da razão proteína e creatinina urinária e determinação da atividade da GGT urinária.

A dosagem sérica de uréia foi realizada por método enzimático-colorimétrico, por reação com a urease e a leitura feita utilizando-se um comprimento de onda de 610nm. A creatinina sérica e urinária foram determinados por método colorimétrico, por reação com o picrato alcalino, sendo realizada a leitura em um comprimento de onda de 510nm, sendo que a urina foi diluída em água destilada na proporção de 1:25 como citado por FERREIRA (2006). A determinação da concentração de proteína urinária foi feita utilizando-se método colorimétrico, por reação com o vermelho de pirogalol, a uma absorvância de 610nm (Sensiprot[®] Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O índice proteína urinária/creatinina urinária (PU/CU) foi calculado conforme citado por FINCO (1995), dividindo-se os valores da concentração de proteína urinária pelos de creatinina urinária, visando a verificação da lesão tubular renal.

A determinação da atividade da GGT urinária foi realizada logo após a colheita com a utilização de reagente comercial (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Desta forma, para a determinação da GGT urinária, DeSCHEPPER et al. (1989) utilizaram a densidade urinária de 1.025 como fator de correção para o fluxo urinário de uma única amostra coletada de cada animal, por meio da seguinte fórmula:

$$X = \frac{Y \times 25}{Z}$$

Onde: X é a atividade de GGT urinária calculada; Y é a atividade da GGT urinária da amostra e Z corresponde aos últimos dois dígitos da densidade urinária da amostra.

Os valores de referência utilizados estão listados a seguir (Quadro 1).

QUADRO 1 - Valores de referência de uréia e creatinina sérica, PU/CU e GGT urinária

Parâmetro	Valor de Referência	Referência Bibliográfica
Uréia	27,80-52,60mg/dL	FERREIRA (2006)*
Creatinina	0,98-1,36mg/dL	FERREIRA (2006)*
PU/CU	< 1,0	REGO et al. (2001)
GGT	13-92 UI/L	SANTIN et al. (2006).

* cães SRD alimentados com ração com 22% de proteína bruta

Para realizar correlações estatísticas, criou-se um índice que traduzia a gravidade da lesão renal observada no exame de urina de rotina. Foram utilizados valores atribuídos a cada componente do exame como está explicitado no quadro 2. O valor final dado a cada cão foi o somatório de pontos de cada item avaliado. Foram observadas hemácias, mas as mesmas não foram avaliadas, pois sua presença foi creditada às biópsias realizadas.

QUADRO 2 - Escore de gravidade da lesão renal observada no exame de urina de rotina

Urinálise		Escore
Proteína	+	1 ponto para cada +
Cilindros	Hialinos +	1 ponto para cada +
	Granulosos finos +	2 pontos para cada +
	Granulosos grossos +	3 pontos para cada +
Células	Pélvica +	1 ponto para cada +
	Descamativa +	1 pontos para cada +
	Renal +	2 pontos para cada +
Leucócitos	1-5	1 pontos
	6-10	2 pontos
	11-15	3 pontos

Após a realização da estatística descritiva para estabelecimento dos valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação (CV), procedeu-se o teste de Lilliefors para a determinação da distribuição e homogeneidade dos dados amostrais.

Foi feita a comparação entre os tratamentos e dentro dos tratamentos. Considerando-se que as variáveis não apresentaram normalidade e homogeneidade de variância simultaneamente, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e nas comparações múltiplas pareadas o procedimento de Dunn/Teste bilateral de acordo com SAMPAIO (1998). Foram utilizados os programas SAEG e XLSTAT 2008.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame físico da urina a cor era predominantemente amarelo citrino nos 5min antes do início da isquemia (I^0) e a partir de 3 dias (R^{3d}). As amostras obtidas durante o procedimento cirúrgico eram de cor vermelha, devido as biópsias seriadas que foram realizadas, alteração também foi citada por DiBARTOLA (1997) ao afirmar que muitos pacientes exibem hematúria microscópica durante as primeiras 48h após a biópsia. A densidade urinária permaneceu com valores dentro da faixa de normalidade citados pela literatura em todos os momentos avaliados, nos dois grupos experimentais.

O pH da urina permaneceu entre 6,5 e 8,0, não tendo sido observado a presença de corpos cetônicos, urobilinogênio ou bilirrubina. A proteína variou de traços, na maioria dos animais, mas foi possível encontrar 3+ em um animal do grupo A com 3 dias e 7 dias, diminuindo em seguida para 2+ nas coletas de 21 dias e 28 dias. Já no grupo B encontrou-se traços de proteínas e em três animais foram observadas 2+ em no máximo dois momentos da colheita. Esses achados indicam proteinúria significativa sugerindo lesão tubular, pois segundo KERR (2003), a urina normal ocasionalmente apresenta traços ou no máximo 1+ de proteína.

Foram encontradas em grande parte dos animais em ambos os grupos cilindros granulosos finos e grossos principalmente no terceiro dia, estendendo até a última colheita (R^{28d}). Para DiBARTOLA (1997), os cilindros grosseiramente granulares e finamente granulares representam a degeneração de células em outros cilindros ou a precipitação de proteínas plasmáticas filtradas, sendo sugestivos de lesão tubular renal isquêmica ou nefrotóxica. Neste estudo, a presença dos cilindros foi resultado da morte celular devido isquemia renal.

A presença de células descamativas foi constante na maioria dos momentos nos cães dos dois grupos. As células renais e pélvicas também foram observadas nos dois grupos, principalmente a partir 3 dias. De acordo com DiBARTOLA (1997), as células epiteliais podem ser encontradas no sedimento urinário mas possuem pouco significado diagnóstico, sendo comuns em amostras coletadas por jatos de urina ou por cateterismo. Já as células renais são pequenas células epiteliais oriundas dos túbulos renais, e sua origem renal pode ser determinada quando é observada em cilindros celulares, como no presente trabalho (Figura 1).

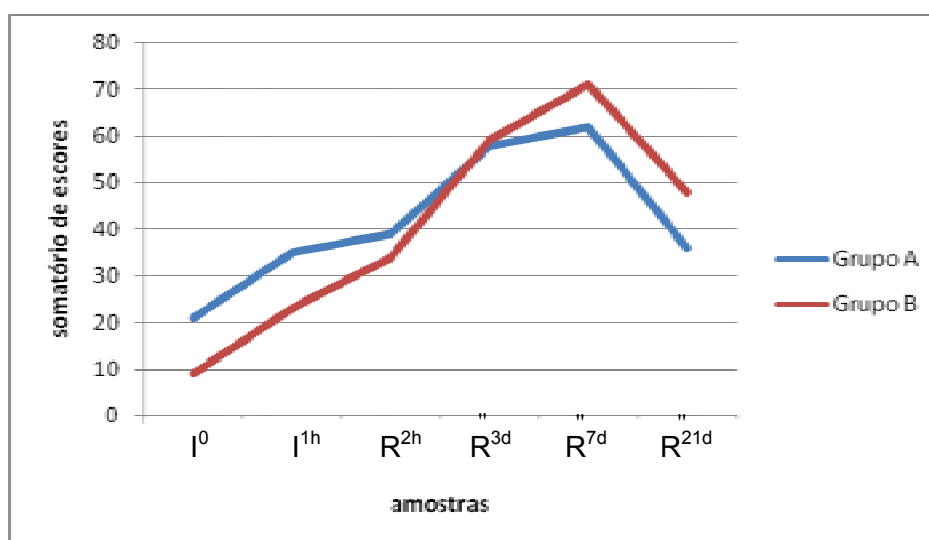


FIGURA 1 – Escores de gravidade da lesão renal diagnosticada no exame de urina de rotina

A média da creatinina sérica permaneceu dentro dos padrões de normalidade, em ambos os grupos ao longo de todo período (Tabela 1); isto pode ser justificado devido a atividade compensatória do rim direito, que não foi lesionado, uma vez que, conforme HENNEMANN et al. (1997), uma das características dos rins é sua capacidade compensatória ao prejuízo. Observam-se danos funcionais somente quando houver perda de 3/4 da capacidade funcional dos néfrons de ambos os rins. Foi evidenciado que não houve diminuição da taxa de filtração glomerular uma vez que os valores de creatinina permaneceram dentro da normalidade.

As concentrações séricas de uréia não tiveram diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$); porém, os valores médios a partir de 3 dias no grupo A e 7 dias no grupo B permaneceram acima dos valores normais. Este fato pode ser atribuído às alterações metabólicas decorrentes da alimentação (Tabela 2).

São vários os fatores que podem afetar a concentração sérica da uréia o que leva à necessidade de se fazer uma investigação de doença renal junto com os níveis séricos de creatinina na tentativa de obter o máximo de informações sobre a função dos rins. Entretanto, foi possível verificar que a lesão de isquemia e reperfusão em um rim não foi capaz de induzir a insuficiência renal nestes cães. Conforme KERR (2003), o hábito de mensurar uréia e creatinina juntas permite que o aumento da concentração de uréia pré-renal seja diferenciado dos quadros renais e efeitos metabólicos e circulatórios podendo ser reconhecidos sem ambigüidade.

TABELA 1 - Índices séricos de creatinina de cães submetidos à isquemia e reperfusão renal, tratados (Grupo A) ou não tratados (Grupo B) com clorpromazina, ao longo de 28 dias de avaliação, representados pelos valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação (CV), Goiânia, 2008

Grupos		Creatinina Sérica						
		I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{21d}	R ^{28d}
A	Mediana	0,80	0,85	0,90	1,20	1,00	1,05	0,95
	Média	0,82	0,90	0,94	1,17	1,08	1,10	1,02
	DP	0,08	0,21	0,23	0,29	0,29	0,33	0,53
	CV(%)	9	21	22	22	24	28	47
B	Mediana	1,00	1,00	1,20	1,25	1,25	1,15	1,15
	Média	1,04	1,10	1,18	1,25	1,27	1,23	1,17
	DP	0,21	0,25	0,26	0,24	0,33	0,30	0,27
	CV(%)	18	20	20	18	24	22	21

M0 - amostra antes do início da isquemia; M1 - 1 hora após isquemia; M2 - após 2 horas de reperfusão; M3 - três dias após o procedimento cirúrgico; M4 - sete dias após o procedimento cirúrgico; M5 - 21 dias após o procedimento cirúrgico; M6 - vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico. Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

TABELA 2 - Índices séricos de uréia de cães submetidos à isquemia e reperfusão renal, tratados (Grupo A) ou não tratados (Grupo B) com clorpromazina, ao longo de 28 dias de avaliação, representados pelos valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação (CV), Goiânia, 2008

Grupos		Uréia						
		I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{21d}	R ^{28d}
A	Mediana	46,70	41,55	46,50	62,70	67,40	53,60	61,75
	Média	46,18	42,90	49,10	68,02	72,15	58,22	59,32
	DP	7,96	9,54	14,87	18,09	26,74	11,05	12,00
	CV(%)	15	20	27	24	34	17	18
B	Mediana	45,40	46,55	52,20	42,35	55,30	56,45	61,95
	Média	44,94	46,52	52,64	43,35	54,18	56,32	61,08
	DP	24,21	16,00	21,02	17,60	15,91	16,21	10,23
	CV(%)	48	31	36	37	27	26	15

M0 - amostra antes do início da isquemia; M1 - 1 hora após isquemia; M2 – após 2 horas de reperfusão; M3 – três dias após o procedimento cirúrgico; M4 – sete dias após o procedimento cirúrgico; M5 – 21três dias após o procedimento cirúrgico; M6 – vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico. Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

O índice proteína/creatinina urinária foi utilizado para verificar a proteinúria nos animais, substituindo a necessidade de obter amostras do volume urinário total de 24 horas, conforme indicado por MARTINS et al. (2003) e FERREIRA (2006).

A relação proteína/creatinina urinária não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos, mas foi verificada diferença significativa ($p<0,05$) entre o terceiro e o sexto momentos em ambos os grupos (Tabela 3), estes achados podem estar relacionados com agravamento da lesão renal durante o período de reperfusão, uma vez que o aumento nesta relação é geralmente causada por redução na taxa de filtração glomerular e/ou por diminuição da capacidade de reabsorção tubular (YALÇIN & ÇETIN, 2004). Conforme LIMA (2004), a necrose tubular aguda é a lesão mais comum em casos de isquemia e reperfusão renal, e que pode ter levado à diminuição da reabsorção tubular de proteínas, aumentando a relação proteína/creatinina urinária neste estudo.

TABELA 3 – Valores da relação proteína/creatinina urinária de cães submetidos à isquemia e reperfusão renal, tratados (Grupo A) ou não tratados (Grupo B) com clorpromazina, ao longo de 28 dias de avaliação, representados pelos valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação (CV), Goiânia, 2008

Grupos		Proteína/creatinina urinária						
		I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{21d}	R ^{28d}
A	Mediana	0,70	2,52	4,20 ^a	0,65	0,30 ^b	0,30 ^b	0,40
	Média	0,63	2,90	4,55	1,20	0,65	0,38	0,75
	DP	0,24	2,35	2,07	1,14	0,90	0,22	0,97
	CV(%)	34	72	41	87	127	52	118
B	Mediana	0,31	0,52	2,53 ^a	0,50	0,26	0,19 ^b	0,18
	Média	0,41	1,03	3,34	0,74	0,83	0,60	0,80
	DP	0,26	1,37	2,63	0,74	1,34	1,06	1,01
	CV(%)	58	122	72	92	145	162	113

M0 - amostra antes do início da isquemia; M1 - 1 hora após isquemia; M2 – após 2 horas de reperfusão; M3 – três dias após o procedimento cirúrgico; M4 – sete dias após o procedimento cirúrgico; M5 – 21três dias após o procedimento cirúrgico; M6 – vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico.

^{ab} Médias seguidas por letras diferentes, dentro da mesma linha, diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

A isquemia provocou um ligeiro aumento na relação PU/CU e a reperfusão provocou aumento significativo quando comparado I^{1h} e R^{2h} nos grupos A e B (Figura 2).

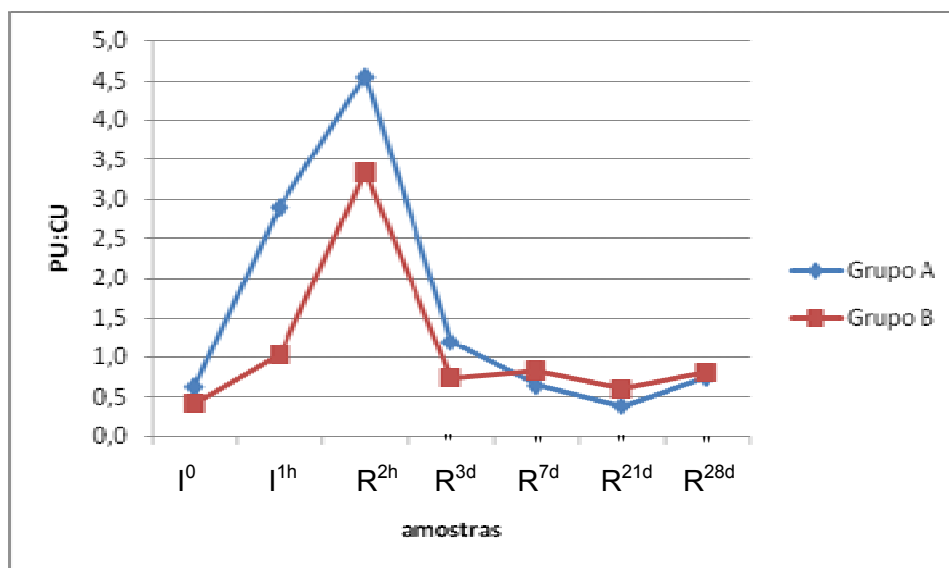


FIGURA 2 – Médias de proteína/creatinina urinária entre os dois grupos de animais, ao longo de 28 dias (Kruskal-Wallis, $p>0,05$).

Ocorreu um aumento das médias da atividade da GGT urinária, porém com elevada variação entre os indivíduos, este fato foi observado por SANTIN et al. (2006) ao realizarem acompanhamento laboratorial da função renal de cães saudáveis tratados com anfotericina B.

A isquemia não ocasionou aumento da atividade da GGT, somente a reperfusão, não sendo possível evidenciar diferença estatística ($p>0,05$) entre os dois grupos (Figura 3). Este resultado pode indicar um agravamento da lesão renal após o período de reperfusão, uma vez que, segundo EVORA et al. (1996), a isquemia tem papel fundamental em muitas situações clínicas. Apesar da reperfusão de um órgão isquêmico ser essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, a reperfusão pode agravar as lesões produzidas na fase isquêmica isolada, conforme constatado no presente trabalho.

A diferença estatística entre os momentos foi observada somente no grupo B, após 2h de reperfusão ($115,62 \pm 55,20$) e 28 dias após o procedimento ($27,52 \pm 14,50$), evidenciando a diminuição para os parâmetros normais de excreção da GGT (Tabela 4). ARAÚJO et al. (2002) utilizando ratos, observaram um discreto na função renal do grupo submetido à isquemia e previamente tratado com clorpromazina, na dosagem de 3mg/kg via IV, que não foi estatisticamente significativo.

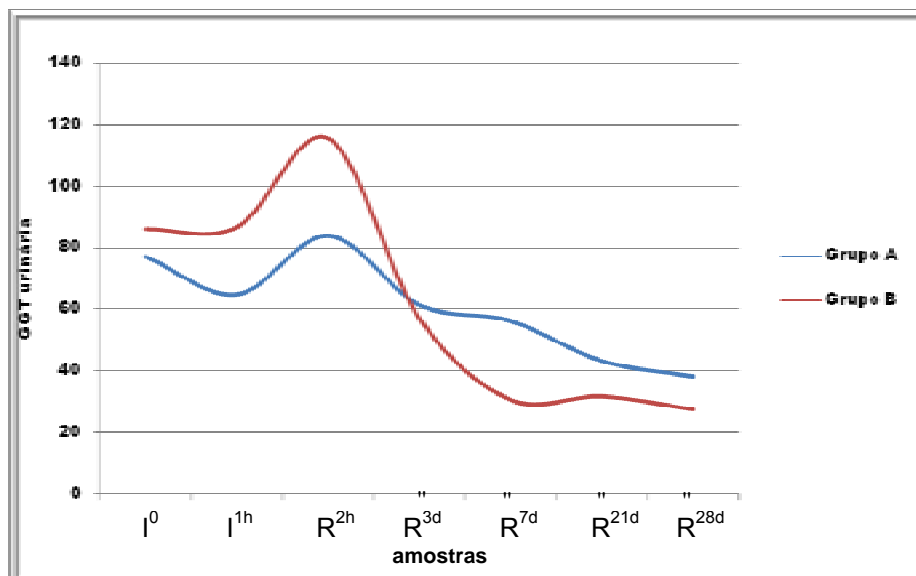


FIGURA 3 – Valores médios de GGT urinária entre os dois grupos de animais, ao longo de 28 dias (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Observou-se que os valores da atividade de GGT 5min antes do procedimento nos dois grupos foram mais altos que os encontrados na última amostra, apesar de permanecerem dentro dos limites normais considerados. Isto deveu-se possivelmente à hipotensão que ocorreu como consequência do procedimento anestésico e pela própria aplicação da clorpromazina, determinando menor fluxo sanguíneo que levou à liberação de GGT urinária nestes animais.

Os dois grupos comportaram-se de maneira semelhante ao elevar os valores da atividade de GGT urinária após 1h de isquemia e 2h de reperfusão. WARD (1975), utilizando cães como modelo experimental, observou que a GGT urinária apresentava aumento significativo após 5min de isquemia renal unilateral e um aumento ainda maior após 90min; o autor afirmou ainda que a GGT urinária foi utilizada para avaliar a injúria isquêmica associada a transplante renal em seres humanos, obtendo uma boa correlação entre o aumento da atividade enzimática e o diagnóstico clínico de rejeição a transplante.

O aumento da excreção de GGT urinária fornece o diagnóstico da lesão da membrana da borda em escova com perda da estrutura da microvilosidade e, de acordo com VIANNA (2006), a lesão dessa estrutura causa diminuição da reabsorção e aumento da excreção de proteínas. No presente experimento, o

aumento da atividade da GGT urinária evidenciou a lesão em células tubulares causada pelo processo de isquemia e reperfusão.

TABELA 4 - Índices excreção urinária de GGT de cães submetidos à isquemia e reperfusão renal, tratados (Grupo A) ou não tratados (Grupo B) com clorpromazina, ao longo de 28 dias de avaliação, representados pelos valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação (CV), Goiânia, 2008

Grupos		GGT urinária						
		I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{21d}	R ^{28d}
A	Mediana	74,00	50,90	69,90	50,45	47,70	34,95	38,10
	Média	77,08	64,76	83,86	61,33	56,13	43,20	38,12
	DP	37,80	40,18	63,42	32,93	19,48	36,34	22,41
	CV(%)	44	55	68	49	32	77	54
B	Mediana	38,10	73,10	95,40 ^a	38,10	31,75	28,60	22,20 ^b
	Média	86,18	86,78	115,62	57,10	30,63	31,77	27,52
	DP	70,40	41,50	55,20	41,5	12,30	12,20	14,50
	CV(%)	82	48	48	73	40	38	53

M0 - amostra antes do início da isquemia; M1 - 1 hora após isquemia; M2 - após 2 horas de reperfusão; M3 - três dias após o procedimento cirúrgico; M4 - sete dias após o procedimento cirúrgico; M5 - 21 dias após o procedimento cirúrgico; M6 - vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico.

^{ab} Médias seguidas por letras diferentes, dentro da mesma linha, diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

A atividade da GGT urinária e a relação PU/CU tiveram o mesmo comportamento. No fim do período trans-operatório de reperfusão (R^{2h}) houve aumento dos valores nos dois grupos seguindo para a resolução do quadro, em que a recuperação mostrou-se similar. Observando estas variáveis ficou evidente que a função renal retornou à normalidade, e pode ser explicado porque a resposta à lesão isquêmica pode ser dividida em períodos reversíveis ou irreversíveis, sendo que a reversibilidade segundo CHIEN et al. (1977) está relacionada com a integridade morfológica das células após a reperfusão, a habilidade de recuperar ATP e a sua capacidade de regular a concentração de cálcio intracelular. Assim, o registro da atividade da GGT urinária e a relação PU/CU constituíram-se em um eficiente indicador da recuperação da função renal após o episódio de isquemia e reperfusão e, portanto, estes testes podem ser aplicados para o prognóstico de situações clínicas similares, como por exemplo transplantes renais.

A dose escolhida de clorpromazina foi de 5mg/kg, sendo esta acima da dose terapêutica recomendada (1 a 3mg/kg), e o tempo de isquemia foi de uma hora uma vez que outros trabalhos citam alterações renais após este tempo. Na pesquisa realizada por NETTO et al. (2001) não foi possível verificar a proteção conferida pela clorpromazina, tendo os autores atribuído este fato à baixa dosagem da medicação (2mg/kg) e ao elevado período de isquemia fria (48h).

Porém, deve-se exercer cautela na escolha da dose de clorpromazina, uma vez que esta quando administrada em altas dosagens pode causar hipotensão grave.

O efeito dos fenotiazínicos na estrutura e função das membranas como bloqueador dos canais de cálcio já é conhecido em outros órgãos, entretanto não foi possível verificar o efeito protetor da clorpromazina mesmo aumentando o tempo de reperfusão e diminuindo o tempo de isquemia como foi sugerido por NETTO et al. (2001).

Trabalhos realizados em outra espécie como coelho, sugerem a eficácia da clorpromazina como agente protetor de lesão renal mesmo utilizando uma dose menor que 5mg/kg (DAHLANGER & BILDE, 1979), outros observaram o efeito protetor após isquemia e reperfusão hepática, sendo que foram utilizadas doses maiores (20mg/kg) em ratos e com um maior tempo de isquemia (3h) (CHIEN et al., 1977). Com isso é possível ressaltar que além da dose utilizada e da duração da isquemia/reperfusão, também deve ser levado em consideração o modelo experimental empregado, além dos métodos de avaliação da função renal, que podem não ser sensíveis para avaliar o efeito protetor conferido pela medicação e simplesmente evidenciar a lesão causada pelo processo de isquemia e reperfusão, como foi encontrado no presente trabalho.

CONCLUSÃO

Não foi evidenciada ação protetora da clorpromazina na isquemia renal e reperfusão renal nas condições do presente experimento. A avaliação da relação PU/CU e atividade da GGT urinária são provas mais sensíveis para detectar lesão tubular aguda que o exame de urina de rotina, uma vez que estas variáveis apresentaram alteração mais precocemente quando comparados aos resultados da uréia e creatinina séricas .

REFERÊNCIAS

1. ARAUJO, W. M.; JUNIOR, S. T.; COSTA, R. S.; FERREIRA, R. A.; POZZA, M. L.; MAZZETO, S. A.; ALVES, P.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. P. Animal model of ischemic injury, and chlorpromazina protector effect, evaluate by TC-99M-MAG3 dynamic renal scan. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, suppl.3, p.15-19, 2002.

2. BREZIS, M.; EPSTEIN, F. H. Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney. **Annual Review of Medicine**, Stanford, v.44, p.27-37, 1993.
3. CALVERT, J. W.; ZHOU, C.; NANDA, A.; ZHANG, J. H. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. **Journal of applied physiology**, Bethesda, v.95, n.5, p.2072-80, 2003.
4. CHIEN, K. R.; ABRAMS, J.; PFAU, R. G.; FARBER, J. L. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.88, n.3, p.539-553, 1977.
5. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robins: Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000, 1251p.
6. DAHLAGER, J. I.; BILDE, T. Renografic ecaluation of kidney preservation with chlorpromazine. **The Journal of Nuclear Medicine**, New York, v.20, p.18-25, 1979.
7. DeSCHEPPER, J.; DE COCK, I.; CAPIAU, E. Urinary gamma glutamil transferase and the degree of renal dysfunction in 75 bitches with pyometra. **Research in Veterinary Science**, London, v.46, p.396-400, 1989.
8. DiBARTOLA, S. P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da afecção renal. In: ETIINGER, S. J., FELDMAN, E. C. (Ed). **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. p.2355-73.
9. EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.;SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Atualização: Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.4, n.66, p.239, 1996.
- 10.FERREIRA, R. P. **Função renal de cães adultos sadios alimentados com diferentes teores de proteína bruta**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- 11.FINCO, D. R. Urinary protein loss. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. C. (Ed.) **Canine and feline nephrology and urology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. p.211-215.
- 12.FONDEVILA, C.; BUSUTTIL, R. W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury - a fresh look. **Experimental and molecular pathology**, New York, v.74, n.2, p. 86-93, abr. 2003.

13. FORTERRE, S.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.16, p.271–277, 2004.
14. HENNEMANN, C. R. A.; SILVA, C. F.; SCHOENAU, W.; KOMMERS, G. D.; POLYDORO, A. S.; LEITZKE, M. R. M. Atividade da gamma glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de uréia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeo em cães, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.2, p.237-244, 1667.
15. JOESCHKE, H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. **American Journal Physiological Gastrointestinal and Liver Physiology**, Stanford, v.284, n.1, p. 15-26, 2003.
16. KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003, 436p.
17. LIMA, L. V. S. **Associação da ciclosporina ao condicionamento isquêmico em rim de rato submetido a isquemia normotérmica e reperfusão**. 2004. 70f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
18. MARTINS, M. R.; DALECK, C. R.; CARVALHO, M. B.; CALADO, E. B.; ZILLOTTO, L.; FRANCISCO, M. M. S. Avaliação da função renal de cães sob dois protocolos para administração da cisplatina. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.4, p.314-319, 2003.
19. NETTO, J. M. B.; TUCCI Jr., S.; COLONGNA, A. J.; SUAD, H. J; MARTINS, A. C. P.; MOLINA, C. A. F.; ROSELINO, J. E. S. Chlorpromazine and mitochondrial function in kidney ischemia-reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.16, suppl.1, 2001.
20. PRICE, C. P.; NEWALL, R. G.; BOYD, J. C. Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic. **Clinical Chemistry**, Washington, v.51, n.9, p.1-11, 2005.
21. REGO, A. B. A. S.; KOGIKA, M. M.; SANTORO, M. L.; HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. S. Eletroforese das proteínas urinárias de cães normais e cães com doença renal em gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.7, n.2, p.65-72, 2001.

22. REZENDE, M. L.; NUNES, N.; SOUZA, A. P.; SANTOS, P. S. P. Monitoramento hemodinâmico invasivo em pequenos animais invasive hemodynamic monitoring in small animals. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 93-100, 2002.
23. RIVERS, B. J.; WALTER, P. A.; O'BRIEN, T. D.; KING, V. L.; POLZIN, D. J. Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a diagnostic tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Denver, v.32, p.323-336, 1996.
24. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMV, 1998, 221 p.
25. SANTIN, F.; MOUTINHO, F. Q.; AMARAL, A. S.; TAKAHIRA, R. K. Acompanhamento laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina B. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1816-23, 2006.
26. VIANNA, P. T. G. Marcadores biomoleculares da insuficiência renal. In: CAVALCANTE, I. L.; CANTINHO, F. A. F.; ASSAD, A (Ed). **Medicina perioperatória**. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do estado do Rio de Janeiro, 2006, p. 57-61.
27. WARD, J. P. Urinary gamma-glutamyl transpeptidase, an indicator of renal ischaemia injury and homograft rejection. **The Journal of Urology**, Philadelphia, v.47, n.7, p.765-70, 1975.
28. YALÇIN, A; ÇETIN, M. Electrophoretic separation of urine proteins of healthy dogs and dogs with nephropathy and detection of some urine proteins of dogs using immunoblotting. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 155, n.2, p.104-112, 2004.
29. ZHANG, T.; ZHANG, F.; ZHOU, Y. A.; WANG, Y. J.; LI, X. F.; CHEN, D. F. Effect of ischemic preconditioning on cytokines during lung ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Trauma Nursing**, St. Louis, v.55, n.2, p.241-7, 2003.

CAPÍTULO 3 – Avaliação histológica e expressão da E-caderina e β -catenina em rim de cães submetidos à isquemia e reperfusão após a aplicação da clorpromazina

Histologic evaluation and E-cadherin and β -catenin expression in dogs subjected to ischemia and reperfusion after chlorpromazine administration

RESUMO

A lesão renal isquêmica pode estar associada a procedimentos urológicos, tais como cirurgia renovascular, cirurgia renal extracorpórea ou transplante renal. Esta injúria muitas vezes é seguida de insuficiência renal aguda. O objetivo deste trabalho foi observar a localização da E-caderina e β -catenina em rim de cães, além de relacionar a expressão dessas proteínas das junções de aderência em diferentes tempos de isquemia e reperfusão com ou sem a aplicação de clorpromazina. Para tanto foram utilizados 12 cães distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis indivíduos: grupo A com isquemia e reperfusão sem tratamento por clorpromazina e o grupo B com isquemia e reperfusão tratados por clorpromazina. No procedimento cirúrgico foi realizada uma incisão paracostal esquerda para identificação e isolamento do rim esquerdo e da artéria renal esquerda. Após o isolamento da artéria, os animais de todos os grupos tiveram o vaso ocluído. Os animais do grupo B receberam clorpromazina via endovenosa, na dose de 5 mg/kg, 15 min antes da clampagem do vaso, que durou 1 h. Após este período, as artérias renais foram desobstruídas e os órgãos permaneceram em reperfusão por 2 h. Em cada grupo foram extraídas seis amostras de parênquima renal, com utilização de agulha *tru-cut*, para marcação com anticorpos anti-E-caderina e anti- β -catenina por meio de imunistoquímica. E-caderina e β -catenina são diferencialmente expressas em segmentos do córtex e da medula em rim de cães e o uso da clorpromazina não alterou a expressão das duas proteínas.

Palavras-chave: imunistoquímica, insuficiência renal aguda, lesão tubular

ABSTRACT

Renal ischemia can be associated with some urological procedures, such as renovascular surgery, kidney surgery or kidney transplantation. This insult is often followed by acute renal failure. The aim of this study was to verify the E-cadherin and β -catenin localization in canine kidney and to investigate the adherens junctions proteins abnormalities in different times of renal ischemia and reperfusion after chlorpromazine application. For this study, twelve dogs were randomly distributed into two groups of six individuals: group A with ischemia and reperfusion without treatment by chlorpromazine and group B with ischemia and reperfusion treated by chlorpromazine. In the surgical procedure, a left paracostal incision was made in order to detect and isolate the left kidney and left renal artery. After artery isolation, the vessels were occluded in all animals. The dogs in group B received intravenously chlorpromazine, at a dose of 5 mg/kg, 15 minutes

before the artery obstruction, which lasted 1 hour. After this period, the clamps in the renal arteries were released and the organ remained in reperfusion by 2 hours. In each group, six tissue samples from renal parenchyma were extracted, using tru-cut needle, in order to make immunohistochemistry detection through anti-E-cadherin and anti- β -catenin antibodies. E-cadherin and β -catenin are differentially expressed in segments from cortex and medulla in kidney dogs and the use of chlorpromazine did not alter the both proteins expression.

Keywords: immunohistochemistry, acute renal failure, tubular injury

INTRODUÇÃO

A lesão renal isquêmica pode estar associada a procedimentos urológicos, tais como cirurgia renovascular, cirurgia renal extracorpórea ou transplante renal. Esta injúria muitas vezes é seguida de insuficiência renal aguda. TSUJI et al. (1993) ressaltaram a necessidade de avaliar potenciais procedimentos de prevenção e tratamento para o comprometimento funcional dos rins.

A isquemia renal induz um amplo leque de respostas celulares, incluindo diminuição da adesão e morte celular, dependendo do tipo celular e a duração do período de isquemia. A isquemia e reperfusão subletal provocam primariamente degeneração hidrópica das células epiteliais dos túbulos proximais (SCHRIER et al., 2004).

As funções das células epiteliais dependem da integridade das junções intercelulares e arranjo dos lipídios e proteínas da membrana plasmática, estreitamente mantida por domínios apicais e basolaterais. A isquemia e subsequente reperfusão/reoxigenação alteram a função epitelial por romper as junções intercelulares (BUSH et al., 2000a).

As junções intercelulares são estruturas especializadas essenciais para adesão e comunicação celular. As caderinas são moléculas de adesão Ca^{2+} dependentes que se ligam a uma molécula de caderina idêntica da célula oposta. A β -catenina interage diretamente com o domínio citoplasmático das caderinas e forma um complexo com α -catenina, a qual liga os filamentos de actina com as junções de aderência. As cateninas regulam a atividade de adesão das caderinas nas junções de aderência (MILLER & MOON, 1996).

Estudos recentes têm mostrado que uma variedade de caderinas esta presente em rim e é diferentemente expressa em vários segmentos do néfron. Entretanto, as interpretações destes achados têm sido complicadas pelo fato de que vários estudos focam em diferentes tipos de caderinas e diferentes espécies. Em ratos, notou-se a presença abundante da E-caderina nos túbulos distais, ducto coletor e segmentos medulares, mas presente em níveis muito baixos nos túbulos proximais (PROZIALECK et al., 2004).

BUSH et al. (2000b) mostraram que a isquemia induz lesões bioquímicas distintas nas junções de aderência. Foi demonstrado que um agravo isquêmico resulta na degradação seletiva da E-caderina e a ruptura da interação proteína-proteína entre E-caderina e as cateninas o que compromete as junções. Estes achados sugerem que alterações na E-caderina e suas interações com componentes citoplasmáticos das junções de aderência constituem um mecanismo de lesões na isquemia epitelial. Entretanto, o mecanismo preciso envolvido na isquemia epitelial permanece fracamente estudado.

A depleção de ATP nas células epiteliais renais resulta em rápida interiorização da E-caderina. Uma injúria isquêmica um pouco mais prolongado conduz não só a interiorização da E-caderina, mas também para quebra da proteína em sítio específico e ruptura da interação caderina-catenina. A degradação da E-caderina, bem como a interrupção da interação caderina-catenina, provavelmente constitui uma lesão crítica na isquemia epitelial (BUSH et al., 2000a).

Intervenções farmacológicas nesses processos apresentam grande potencial de melhorar as condições clínicas em cirurgias que envolvam isquemia e reperfusão (JOESCHKE, 2003). Dentre as opções recentemente estudadas, tem-se a proteção conferida pela clorpromazina, uma droga de baixo custo e usada na rotina pré-anestésica, cuja ação protetora ainda não foi totalmente esclarecida (NETTO et al. 2001; ARAÚJO et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi descrever a distribuição da E-caderina e β -catenina em rim de cães e avaliar em diferentes tempos de isquemia e reperfusão renal após a aplicação de clorpromazina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais de experimentação

Foram utilizados 12 animais da espécie canina, sem raça definida, machos, com peso corpóreo entre 10 e 25 kg, obtidos junto ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Goiânia e transferidos para o canil de Experimentação Científica da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

Previamente ao estudo experimental, os cães foram avaliados clinicamente para a identificação de enfermidades sistêmicas e renais que pudessem interferir nos resultados. Foi realizada ainda colheita de urina e sangue para hemograma e pesquisa de hematozoários, conforme rotina do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFG, para ratificação das condições de higiene orgânica.

Os animais foram divididos em dois grupos de seis indivíduos:

Grupo A: cães submetidos à isquemia e reperfusão renal sem clorpromazina.

Grupo B: cães medicados com clorpromazina e submetidos à isquemia e reperfusão renal.

Procedimento cirúrgico e pós-operatório

Os animais tiveram indução anestésica pela aplicação de propofol por via intravenosa (Propovan, Cristália, São Paulo, SP) e manutenção anestésica com halotano (Halotano, Hoechst do Brasil, São Paulo, SP). Inicialmente, foi realizada uma incisão paracostal esquerda para identificação e isolamento do rim esquerdo e da artéria renal esquerda. Após o isolamento da artéria, os animais de todos os grupos tiveram o vaso ocluído com auxílio de uma pinça *Satinsky*. Os animais do grupo B receberam clorpromazina (Amplictil, Aventis Pharma, São Paulo, SP) via intravenosa, na dose de 5 mg/kg, 15 min antes da clampagem do vaso, que durou 1 h. Após este período, as artérias renais foram desobstruídas e nas primeiras 2h de reperfusão colhidas amostras para estudo histológico e imunoistoquímico.

Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foi realizada a administração de cloridrato de tramadol na dose de 0,1mg/kg/SC, de 12 em 12 horas durante três dias e cefalexina duas vezes ao dia, via oral, por 10 dias. Todos os cães foram doados ao final do experimento.

Amostras

Em cada grupo foram extraídas seis amostras de parênquima renal da borda convexa do rim esquerdo, com utilização de agulha de biópsia para tecidos moles (Tru-cut®), durante o procedimento cirúrgico de acordo com o esquema indicado pela Figura 1.

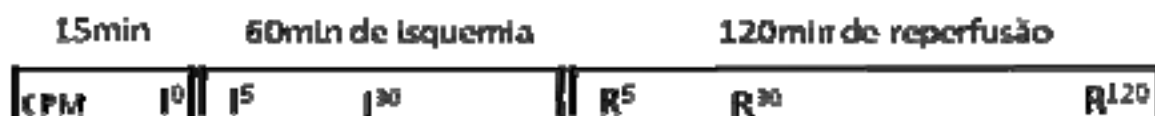


FIGURA 1 - Representação esquemática dos momentos de colheita das amostras. CPM= aplicação da clorpromazina; I⁰= amostra antes da isquemia; I⁵= amostra após 5min de isquemia; I³⁰= amostra após 30min de isquemia; R⁵= amostra após 5min de reperfusão; R³⁰= amostra após 30min de reperfusão; R¹²⁰= amostra após 120min de reperfusão.

As amostras foram identificadas, fixadas e armazenadas em frascos individuais contendo formaldeído tamponado a 10% e deixadas à temperatura ambiente durante 12 horas. As amostras foram posteriormente lavadas em água corrente por 15 minutos, colocadas em álcool 70%.

Os fragmentos obtidos por biópsia foram processados de acordo com o método convencional de histologia e laminados para posterior coloração com hematoxilina e eosina e a realização da imunoistoquímica.

Exame histológico

No estudo histológico realizado de acordo com FEITOSA et al. (2005), realizou-se uma análise descritiva e semiquantitativa, sendo que a descrição abrangeu uma análise dos compartimentos glomerular, tubular e intersticial renal. Analisou-se no compartimento tubular a possível presença de degeneração

hidrópica, descamação celular e alterações nucleares e no compartimento intersticial, edema, congestão capilar, hemorragia e inflamação.

A avaliação de cada parâmetro foi feito às cegas, sendo analisados cortical e medular de todos os fragmentos, utilizando aumento de 400 X. A quantificação foi feita com escores de zero a conforme discriminado no Quadro 1.

QUADRO 1 - Interpretação dos escores aplicados na análise dos parâmetros histopatológicos em rins de cães submetidos à isquemia e reperfusão renal.

Localização	Alteração Histopatológica	Escores	Significado
Glomérulo	Infiltrado inflamatório Edema Degeneração/Necrose	0	Ausência de alteração
		1	Presença de alteração
Compartimento Tubular	Degeneração hidrópica Alterações nucleares Descamação	0	Ausência de alteração
		1	Alteração presente em menos de 25% das células tubulares
		2	Alteração presente em 26% a 50% das células tubulares
		3	Alteração presente em 51% a 100% das células tubulares
Compartimento Intersticial	Edema Congestão Hemorragia Inflamação	0	Ausência de alteração
		1	Alteração presente em menos de 25% dos campos analisados
		2	Alteração presente em 26% a 50% dos campos analisados
		3	Alteração presente em 51% a 100% dos campos analisados

Conforme a metodologia de TAKITO et al. (2005), os resultados foram expressos como índice de lesão intersticial e índice de lesão tubular, correspondendo ao somatório de pontos conferidos para cada parâmetro correspondente como indicado no Quadro 2.

QUADRO 2 - Valores atribuídos às diferentes alterações histopatológicas encontradas em rins de cães submetidos à isquemia e reperfusão renal.

Compartimento (Localização)		Alteração histopatológica	Valor atribuído	Índice de lesão ²	
Tubular	Cortical (TCP;TCD) ¹	Degeneração hidrópica	Ausente	0	Valor Mínimo=0 Valor Máximo=27
		Alterações nucleares	Discreta	1	
	Medular (Alça de Henle)		Moderada	2	
		Descamação	Acentuada	3	
Intersticial		Edema	Ausente	0	Valor Mínimo=0 Valor Máximo=12
		Congestão	Discreta	1	
		Hemorragia	Moderada	2	
		Inflamação	Acentuada	3	

¹ TCP=túbulo contorcido proximal; TCD=túbulo contorcido distal

² número de compartimento x número de alteração x valor atribuído

Para análise estatística foram aplicados teste de Mann-Whitney, análise de variância por posto de Kruskal-Wallis como realizado por FEITOSA et al. (2005).





Imunoistoquímica

Secções de rim de 3µm foram submetidos a imunoistoquímica e marcados com anticorpo anti-E-caderina e anti-β-catenina. Após desparafinização e desidratação. as lâminas foram incubadas por 15 minutos com 30% de peróxido de hidrogênio, diluído em solução de PBS pH 7,2 para bloqueio da atividade da peroxidase endógena e, posteriormente, para recuperação antigênica foi empregada solução de citrato 2N (pH 6,0) em banho maria durante 30 minutos a temperatura de 95°C. Mais tarde, as lâminas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com 3% de soro albumina bovina (BSA) em PBS para prevenir ligações não específicas. Os tecidos foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C com anti-E-caderina (purified mouse anti-E-cadherin, BD Biosciences, Nova Jersey, USA) 1:2000 (v/v) ou anti-β-catenina (purified mouse anti-E-catenin, BD Biosciences, Nova Jersey, USA) 1:1000 (v/v) diluídos em BSA 1,5%. As secções foram lavadas várias vezes em PBS e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos com Envision (Dako, Califórnia, USA) seguidas por lavagens em PBS. A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina-peroxidase (Liquid DAB Substrate Chromogen System®, Dako, Carpinteria, California, USA) de 3min. As secções foram contracoradas com hematoxilina de

Mayer por 30 segundos e montadas com Entellan (Merck, São Paulo, SP). O controle negativo foi realizado para identificar coloração inespecífica incluindo no lugar do anticorpo primário o PBS e posteriormente Envision.

As lâminas tratadas com os anticorpos para β -catenina e domínio citoplasmático da E-caderina foram analisadas quanto à localização e tonalidade de marcação, por microscopia de luz e a marcação mensurada por avaliação semiquantitativa atribuindo-se os escores relacionados no Quadro 3, sendo analisados a cortical e medular de todos os fragmentos em aumento de 100x para verificar a intensidade de marcação e localização, sendo confirmadas em aumento de 400x. A intensidade de marcação foi determinada após avaliação de todas as lâminas tratadas e, posterior definição de tonalidades em escores de gradação de cor (Quadro 3).

QUADRO 3 – Escores aplicados a análise da marcação do anticorpo E-caderina e β -catenina em rins de cães

Marcação	Escore
	0 (Ausência de marcação)
	1 (Marcação discreta)
	2 (Marcação moderada)
	3 (Marcação acentuada)

RESULTADOS

Histologia renal

As alterações morfológicas encontradas foram semelhantes nos dois grupos, para os diferentes tempos. Em I⁰ os fragmentos de rim apresentaram

aspecto histológico preservado, semelhante ao normal. Em nenhum momento foi observada alteração nos glomérulos.

Nos TCP observou-se uma discreta degeneração hidrópica e descamação em I⁵ e I³⁰, que tornaram-se moderadas no R⁵ e R³⁰, intensificando-se na última colheita (R¹²⁰). A presença de material protéico na luz dos TCP em I³⁰ e R⁵ foi evidenciada.

Já nos TCD, a degeneração hidrópica e descamação foram encontradas somente a partir do R⁵ com intensidade discreta e moderada, mas ao final do período de reperfusão (R¹²⁰) estava acentuada (Figura 2).

Alterações compatíveis com necrose tubular (acidofilia citoplasmática e picnose) foram encontradas em poucas células tubulares no último momento (R¹²⁰) nos dois grupos.

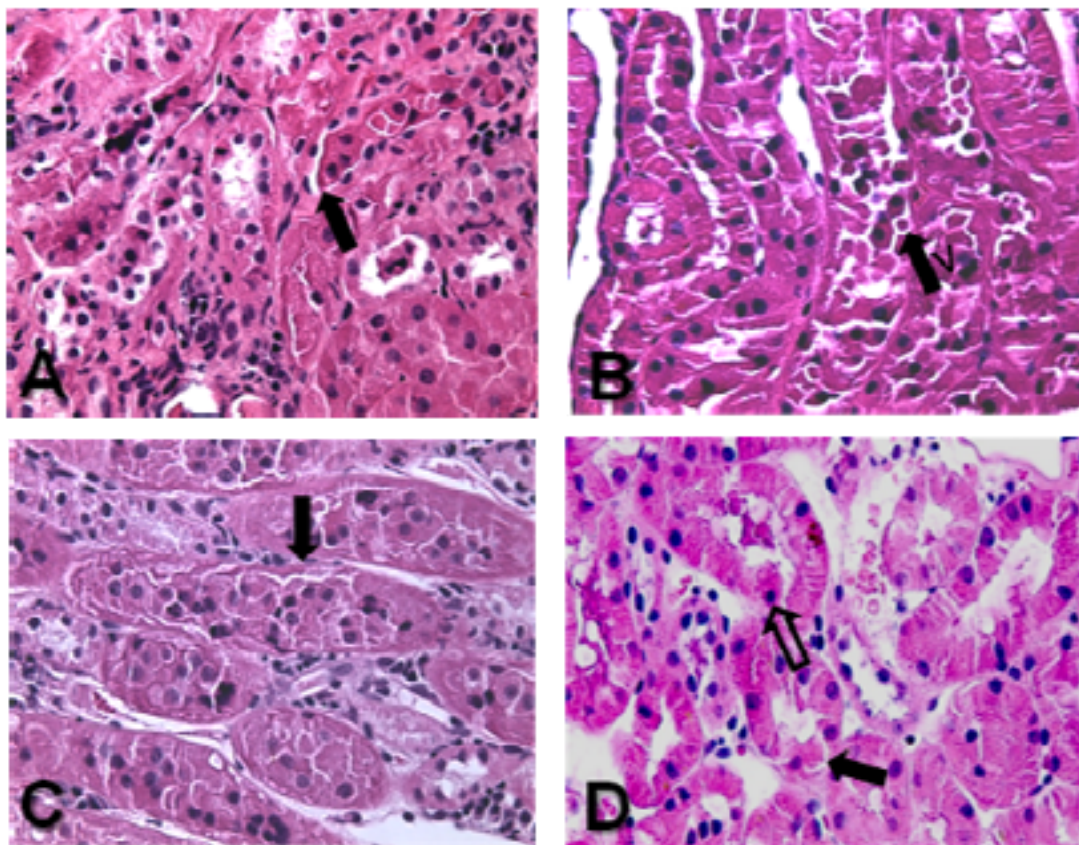


FIGURA 2 - Fotomicrografias da região cortical do rim de cães submetidos à isquemia e reperfusão (HE, 400x), evidenciando a descamação celular (seta cheia) após 30min de isquemia que é intensificada após o período de reperfusão. (A) I³⁰ do Grupo A; (B) R¹²⁰ do Grupo A; (C) I³⁰ do Grupo B; (D) R¹²⁰ do Grupo B, evidenciando picnose (seta vazada).

Nenhuma alteração foi observada nos componentes medulares dos néfrons, a não ser a presença de debris celulares encontradas a partir do R⁵ (Figura 3).

No compartimento intersticial foi observada uma discreta congestão no I⁵ e foi intensificada após 30min de isquemia (I³⁰). Células inflamatórias no interstício foram observadas somente em raros campos de forma discreta e somente no final do período de reperfusão (R¹²⁰).

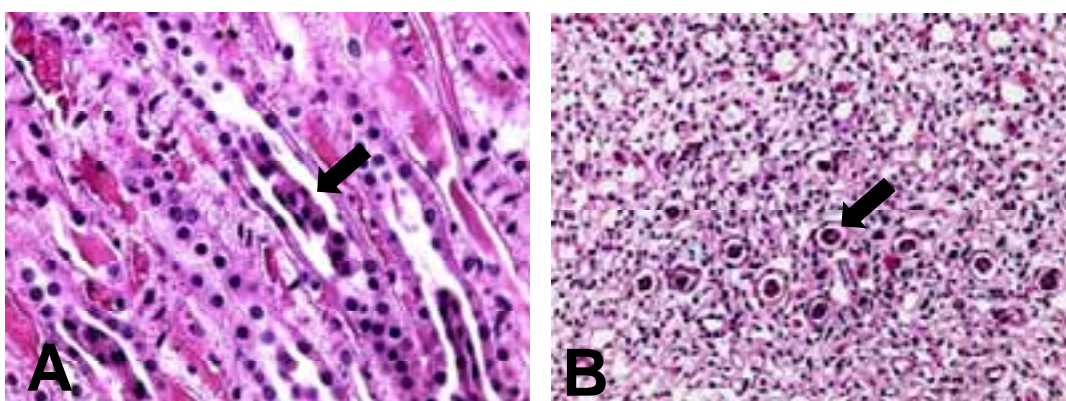


FIGURA 3 - Fotomicrografias da região medular do rim de cães submetidos à isquemia e reperfusão (HE), evidenciando presença de debris celulares nas alças de Henle (setas). (a) corte longitudinal da amostra R⁵ do Grupo B (400x); (b) corte transversal da amostra R⁵ do Grupo B (200x).

Os índices de lesões renais estão representadas na Figura 4, que mostra o comportamento semelhante dentro dos dois grupos, ou seja, as lesões foram intensificadas com o processo de isquemia/reperfusão.

Não houve diferença significativa entre os dois grupos em nenhum dos momentos avaliados ($p > 0,05$). Entretanto, foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os momentos (I⁰, I⁵, I³⁰, R⁵, R³⁰) com o final da reperfusão (R¹²⁰) dentro dos dois grupos.

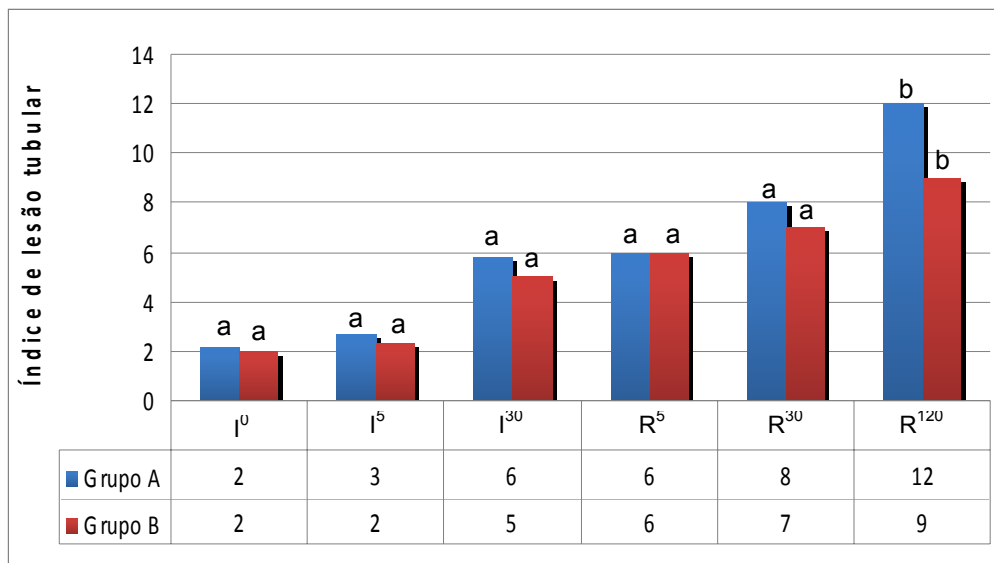


FIGURA 4 - Índice de lesão tubular após isquemia e reperusão renal em cães tratados (Grupo A) ou não tratados (Grupo B) com clorpromazina. ab - momentos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) dentro dos grupos.

Análise imunoistoquímica com anticorpo β -catenina

Nos fragmentos marcados com o anticorpo β -catenina registrou-se marcação semelhante nos dois grupos quanto à localização da proteína no rim, sendo positiva nos túbulos contorcido proximal e distal, e nos todos os componentes medulares, ducto coletor (DC), alça de Henle espessa (AHE) e delgada (AHD). Não foi detectada nos glomérulos.

Houve variação de intensidade na marcação desta proteína nos animais em todos os momentos de biópsia e nos dois grupos. A ausência de marcação nos glomérulos foi observada em 100% das amostras. A marcação nos túbulos contorcidos proximais foi discreta, sendo que em torno de 30% a 90% em todos os momentos de colheita apresentaram ausência de marcação. Nos túbulos contorcidos distais, a marcação variou de moderada a acentuada.

O compartimento medular apresentou marcação variando entre discreta e intensa (Tabela 1)

A β -catenina foi encontrada com um padrão linear da porção lateral da membrana plasmática em todas as estruturas da cortical e da medular e nos grupos (Figura 5).

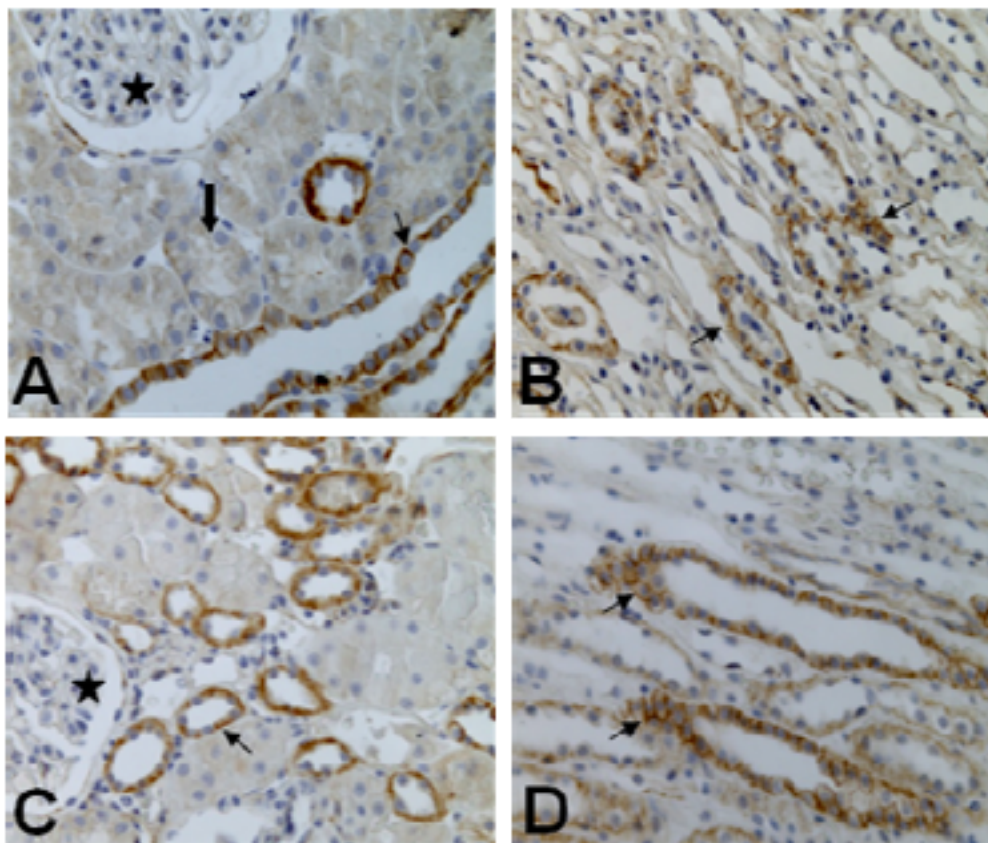


FIGURA 5 - Fotomicrografias após lesão de isquemia e reperfusão renal em cão, marcados pelo anticorpo anti- β -catenina (200x) evidenciando a proteína em forma linear na membrana plasmática (seta), ausência da proteína nos glomérulos (estrela) e marcação discreta nos túbulos contorcidos proximais (seta cheia). (A) amostra I⁰ do córtex renal animal do Grupo A; (B) amostra R¹²⁰ da medula renal animal do Grupo A; (C) amostra I⁰ do córtex renal; animal do Grupo B; (D) amostra R¹²⁰ da medular animal do Grupo B.

Tabela 1 - Frequência da marcação com anticorpo anti- β -catenina em rim de cães submetidos a isquemia e reperfusão, tratados (Grupo A) ou não tratados (Grupo B) com clorpromazina.

Momentos	Grupo A (%)																							
	I ⁰				I ⁵				I ³⁰				R ⁵				R ³⁰				R ¹²⁰			
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glomérulo	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
TCP	33	67	0	0	100	0	0	0	50	50	0	0	80	20	0	0	83	17	0	0	50	50	0	0
TCD	0	0	33	67	0	0	33	67	0	0	50	50	0	0	60	40	0	0	67	33	0	0	40	60
Medular	0	0	50	50	0	33	17	50	0	40	0	60	0	25	0	75	0	20	40	40	0	50	0	50
Grupo B (%)																								
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glomérulo	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
TCP	80	20	0	0	83	17	0	0	100	0	0	0	75	25	0	0	60	40	0	0	50	50	0	0
TCD	0	0	40	60	0	0	17	83	0	0	50	50	0	0	60	40	0	0	33	67	0	0	50	50
Medular	0	17	33	50	0	17	50	33	0	50	50	0	0	100	0	0	0	25	50	25	0	17	50	33

Onde: 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada e 3-marcação acentuada.

Análise imunoistoquímica com anticorpo E-caderina

Nos fragmentos marcados com o anticorpo E-caderina, a marcação foi positiva em todos os componentes tubulares. Entretanto, observou-se variedade na intensidade de marcação entre os animais.

Assim como na β -catenina, não houve expressão de E-caderina nos glomérulos. Nos TCP a marcação variou de discreta a moderada. Já nos TCD o comportamento foi similar ao da β -catenina, em que as amostras expressaram escores variando de moderada à acentuada (Figura 6).

Nos componentes medulares a marcação foi sempre positiva variando de moderada à acentuada (Tabela 2).

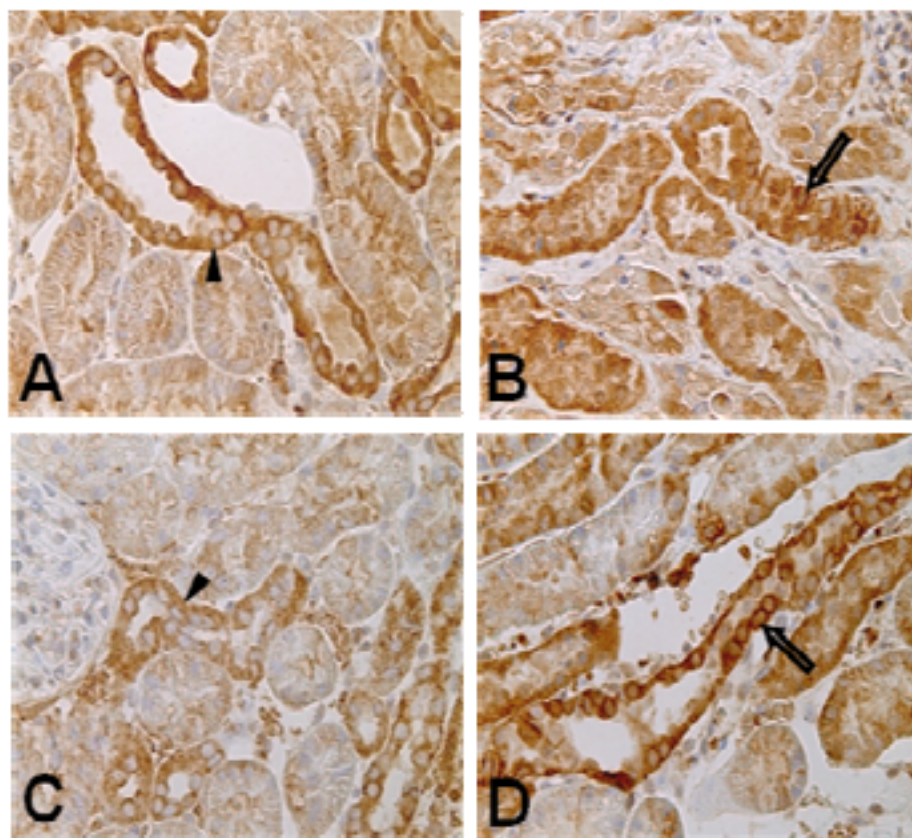


FIGURA 6 - Fotomicrografia do córtex renal após lesão de isquemia e reperfusão renal em cão, marcados pelo anticorpo anti-E-caderina (400x) evidenciando a proteína intracitoplasmática (ponta da seta), e realocação da proteína no citoplasma (seta vazada). (A) amostra I⁰ do animal do Grupo A; (B) amostra R¹²⁰ do Grupo A; (C) amostra I⁰ do animal do Grupo B; (D) amostra R¹²⁰ do Grupo B.

Tabela 2: Frequência da marcação com anticorpo anti-E-caderina em rim de cães submetidos a isquemia e reperfusão, tratados (Grupo A) ou não tratados (Grupo B) com clorpromazina.

Momentos	Grupo A (%)																															
	I ⁰				I ⁵				I ³⁰				R ⁵				R ³⁰				R ¹²⁰											
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3				
Glomérulo	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
TCP	0	40	60	0	0	50	50	0	0	67	33	0	0	40	60	0	0	60	40	0	0	75	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCD	0	0	20	80	0	0	33	67	0	0	33	67	0	0	20	80	0	0	17	83	0	0	33	67	0	0	0	0	0	0	0	0
Medular	0	0	20	80	0	0	17	83	0	0	17	83	0	0	0	100	0	0	40	60	0	0	0	0	0	0	20	80	0	0	0	0
Grupo B (%)																																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3				
Glomérulo	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
TCP	0	33	67	0	0	40	60	0	0	83	17	0	0	75	25	0	0	100	0	0	0	60	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCD	0	0	17	83	0	0	17	83	0	0	83	17	0	0	75	25	0	0	80	20	0	0	60	40	0	0	0	0	0	0	0	0
Medular	0	0	17	83	0	0	17	83	0	0	60	40	0	0	60	40	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	17	83	0	0	0	0

Onde: 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada e 3-marcação acentuada.

DISCUSSÃO

As alterações mais evidentes foram descamação e a degeneração, que aumentaram com a progressão da lesão, sendo intensificada no período de reperfusão. Este fato pode ser explicado porque a reperfusão, ainda que seja essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, pode agravar as lesões produzidas na fase isquêmica isolada. FEITOSA et al. (2005) demonstraram que em 30 minutos de isquemia houve alterações tubulares que foram agravadas após 30 minutos de reperfusão.

A presença de alterações nucleares que indicam irreversibilidade das lesões tubulares, como a presença de picnose associada à homogeneidade e acidofilia citoplasmática, foram discretas mesmo após 2h de reperfusão. No entanto, SCHRIER et al. (2004) afirmaram que a presença da necrose tubular aguda no exame histopatológico renal é visto em ocasionais células tubulares e em alguns casos nem é detectável.

Foi possível perceber que a lesão nos TCP iniciava-se 30min após o início da isquemia, já nos TCD apareciam de forma discreta somente depois de 1h de isquemia. SCHRIER et al. (2004) esclareceram que a hipóxia já predispõe a lesão do segmento S3 dos túbulos proximais, os túbulos contorcidos distais também podem sofrer alterações e a alça de Henle podem ser mais resistentes contra danos isquêmicos.

Este estudo é pioneiro em descrever informações relativas à localização e expressão da E-caderina e β -catenina em rim de cães. Estudos anteriores mostraram que uma variedade de caderinas está presente do rim, sendo as mesmas importantes no mecanismo de regulação da função de barreira e estabilização da polaridade epitelial (PIEPENHAGEN & NELSON, 1998). Outros estudos descreveram que alterações na expressão e função da E-caderina e β -catenina pode estar associadas a diversos processos tais como glomerulonefrite (NAKAPOULOU et al., 2002), injúria isquêmica renal (SÁENZ-MORALES et al., 2006) e neoplasias renais (HUAN & ADELSBERG, 1999). Assim, segundo PROZIALECK et al. (2004), a compreensão da distribuição e função específica das caderinas no rim pode fornecer novas perspectivas sobre a função renal e fisiopatologia.

Não foi observada redistribuição da β -catenina, uma vez que o tempo de isquemia de uma hora e meia pode não ter sido suficiente para induzir esta alteração (Figura 4). Entretanto, SÁENZ-MORALES et al. (2006) reportaram mudança na distribuição da β -catenina, que foi removida da membrana durante a hipóxia e tempos curtos de reoxigenação, mas recuperou posteriormente a forma padrão.

Nas amostras controle, a E-caderina estava localizada preferencialmente na região intracitoplasmática. Ao contrário, BUSH et al. (2000b) mencionaram a presença desta proteína na membrana plasmática como uma marcação de forma contínua e linear, e somente uma discreta marcação intracelular. Este achado pode ser explicado pelo fato do anticorpo utilizado no presente estudo sinalizar o domínio citoplasmático da E-caderina. No entanto, a expressão padrão da proteína foi alterada no presente estudo, possivelmente porque a isquemia em curto prazo resulta em redistribuição das moléculas da superfície celular e ruptura do citoesqueleto, mas não induz a detecção baixa da E-caderina ou outra molécula rapidamente degradados (BUSH et al., 2000b).

Os diferentes padrões de expressão e de localização das caderinas/cateninas levantam a possibilidade de que estas podem contribuir para suscetibilidade de diversos segmentos do néfron à doença renal ou lesões tóxicas e isquêmicas, como já havia sido citado por PROZIALECK et al. (2004) para outras caderinas.

A clorpromazina não interferiu nas características de localização e expressão das proteínas de junção entre os dois grupos de animais. Segundo BALZAC et al. (2005) e ZUHORN et al. (2007), a droga teria capacidade de inibir a endocitose da E-caderina, prevenindo a perda do contato intercelular, efeito não sugerido pelo presente estudo. Porém, vários estudos utilizaram a clorpromazina como protetor de lesão de isquemia e reperfusão (CHIEN et al., 1977; NETTO et al. 2001). Em modelos experimentais de isquemia e reperfusão foi relatada a redistribuição de E-caderina e β -catenina mas não degradação específica destas proteínas (SÁENZ-MORALES et al., 2006), sugerindo que a ausência de diferenças entre os grupos no presente trabalho pode ser devida ao fato de que a lesão isquêmica seguida de reperfusão não determinou queda dos níveis das proteínas de junção.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o uso da clorpromazina não alterou o aspecto histológico dos rins, nem a expressão da E-caderina e da β -catenina. A oclusão da artéria renal esquerda em cães causa alterações morfológicas principalmente nos túbulos contorcidos proximais, que se iniciam 30min após o início da isquemia e são agravadas após 2h de reperfusão.

A E-caderina e β -catenina possuem um padrão diferente de expressão em segmentos do córtex e da medula em rim de cães. A expressão da E-caderina foi maior no túbulo contorcido distal quando comparado ao túbulo contorcido proximal, estando presente em todos os segmentos medulares e ausente nos glomérulos. A β -catenina não foi expressa no glomérulo dos cães, sendo presente em níveis muito baixos ou ausente nos túbulos contorcidos proximais, mas presente nas alças de Henle e ducto coletor.

Não foi observada a redistribuição da β -catenina causada pela lesão de isquemia e reperfusão, após uma hora de isquemia e duas horas de reperfusão. A E-caderina variou o padrão inicial, de citoplasmática, e passou a perinuclear após 30min de reperfusão.

REFERÊNCIAS

1. ARAUJO, W. M.; JUNIOR, S. T.; COSTA, R. S.; FERREIRA, R. A.; POZZA, M. L.; MAZZETO, S. A.; ALVES, P.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. P. Animal model of ischemic injury, and chlorpromazina protector effect, evaluate by TC-99M-MAG3 dynamic renal scan. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, suppl.3, p.15-19, 2002.
2. BALZAC, F.; AVOLIO, M.; DEGANI, S.; KAVERINA, I.; TORTI, M.; SILENGO, L. SMALL, J. V.; RETTA, S. F. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. **Journal of Cell Science**, Canada, v.118, p.4765-4783, 2005.
3. BUSH, K. T.; KELLER, S. H.; NIGAM, S. K. Genesis and reversal of the ischemic phenotype in epithelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.106, n.5, p.621-626, 2000a.

4. BUSH, K. T.; TSUKAMOTO, T.; NIGAM, S. K. Selective degradation of E-cadherin and dissolution of E-cadherin-catenin complexes in epithelial ischemia. **The Journal Clinical Investigation**, Michigan, v.27, p.F847–F852, 2000b.
5. CHIEN, K. R.; ABRAMS, J.; PFAU, R. G.; FARBER, J. L. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.88, n.3, p.539-553, 1977.
6. FEITOSA, E. A. N.; TAHA, M. O.; FAGUNDES, D. J.; TAKIYA, C. M.; CARDOSO, L. R.; CAMPOS, D. M. Estudo da morfologia renal após a oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.32, n.4, 2005.
7. HUAN, Y; ADELSBERG, J. V. Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. **The Journal Clinical Investigation**, Michigan, v.104, n.10, p.1459-1468, 1999.
8. JOESCHKE, H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. **American Journal Physiological Gastrointestinal and Liver Physiology**, Stanford, v.284, n.1, p. 15-26, jan. 2003.
9. MILLER, J. R.; MOON, R. T. Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. **Genes & Development**, Woodbury, n.10, p.2527-2539, 1996.
10. NAKOPOULOU L.; LAZARIS, A. C.; BOLETIS, I. N.; MICHAIL, S.; GIANNOPOULOU, I.; ZEIS, P. M.; STATHAKIS, C. P.; DAVARIS, P. S. Evaluation of E-cadherin/catenin complex in primary and secondary glomerulonephritis. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v.39, n.3, p. 469-474, 2002.
11. NETTO, J. M. B.; TUCCI Jr., S.; COLONGNA, A. J.; SUAD, H. J; MARTINS, A C. P.; MOLINA, C. A F.; ROSELINO, J. E. S. Chlorpromazine and mitochondrial function in kidney ischemia-reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.16, suppl.1, p.36-40, 2001.
12. PIEPENHAGEN, P. A.; NELSON, W. J: Biogenesis of polarized epithelial cells during kidney development in situ: role of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and membrane cytoskeleton organization. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v.9, p.3161-3177, 1998

13. PROZIALECK, W.C.; LAMAR, P. C.; APPELT, D. M. Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron. **BMC Physiology**, London,. v.4, n.10, p.1-14, 2004.
14. SÁENZ-MORALES, D.; ESCRIBESE, M. M.; STAMATAKIS, K.; GARCIA-MARTOS, M.; ALEGRE, L.; CONDE, E.; PEREZ-SALA, D.; MAMPASO, F. ; GARCIA-BERMEJO, M. L. Requirements for proximal tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: Role of oxidative stress. **Experimental Cell Research**, Orlando, v.312, n.19, p. 3711-3727, 2006.
15. SCHRIER, R. W.; WANG, W.; POOLE, B.; MITRA, AMIT. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.114, n.1, p.5-14, 2004.
16. TSUJI, Y.; ARIYOSHI, A. SAKAMOTO, K. An experimental model for unilateral ischaemic acute renal failure in dog. **International Urology and Nephrology**, Netherlands, n.25, v.1, p.83-88, 1993.
17. ZUHORN, I. S.; KALICHARAN, D.; ROBILLARD, G. T.; HOEKSTRA, D. Adhesion receptors mediate efficient non-viral gene delivery. **Molecular Therapy**, San Diego, v.15, n.5, p.946–953, 2007.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado investigou a função renal e as alterações na estrutura das junções de aderência, bem como a distribuição e expressão da E-caderina e β -catenina, em um modelo experimental de isquemia e reperfusão renal, utilizando pré-condicionamento farmacológico. Os resultados obtidos nos dois trabalhos descritos anteriormente permitiram as seguintes conclusões:

- a. A oclusão temporária unilateral da artéria renal de cães mostrou-se um modelo experimental eficaz na produção de lesão de isquemia e reperfusão, uma vez que não ocorreram óbitos;
- b. A avaliação da relação PU/CU e atividade da GGT urinária são exames mais sensíveis para detectar lesão tubular aguda que o exame de urina de rotina, uma vez que estas variáveis apresentaram alteração mais precocemente;
- c. Não houve ação protetora da clorpromazina por meio da urinálise, dosagens séricas de uréia e creatinina, excreção urinária de GGT e relação PU/CU, quando administrada a 5mg/kg, 15min antes da isquemia renal com uma hora de duração;
- d. A E-caderina e a β -catenina são diferencialmente expressas em segmentos do córtex e da medula em rim de cães. A E-caderina é mais expressa no túbulo contorcido distal quando comparado ao túbulo contorcido proximal, sendo presente em todos os segmentos medulares e ausente nos glomérulos. A β -catenina não foi expressa no glomérulo dos cães, sendo presente em níveis muito baixos ou ausente nos túbulos contorcidos proximais, mas presente nas alças de Henle e ducto coletor;
- e. A redistribuição da β -catenina causada pela lesão de isquemia e reperfusão não foi observada, pois o tempo de isquemia de uma hora e meia pode não ter sido suficiente para induzir esta alteração. A E-caderina mudou o seu padrão inicial, de citoplasmática, e passou a perinuclear após 2h de reperfusão;
- f. O uso da clorpromazina não alterou a expressão da E-caderina e da β -catenina, verificada por meio da imunistoquímica, quando administrada na dose de 5mg/kg, 15min antes da isquemia renal com uma hora de duração.

A escassez de oxigênio desempenha papel muito importante na fisiopatologia de várias condições clínicas e cirúrgicas, como estado de choque, hérnia diafragmática, torção gástrica, intussuscepção, obstruções intestinais, infarto do miocárdio, ressecções hepáticas parciais e transplantes. Entretanto, a reperfusão com sangue rico em oxigênio resulta em uma cascata de eventos, a qual exacerba o dano nos tecidos previamente comprometidos pela isquemia, resultando em perda da função celular.

A realização deste trabalho considerou a possibilidade de que a lesão de isquemia e reperfusão pudessem estar associadas às alterações estruturais e funcionais das junções de aderência, sendo por isso, lhe atribuída um possível mecanismo de lesão epitelial isquêmica. Assim, diante de tal perspectiva, considerou-se que a avaliação de tais parâmetros para avaliar a eficácia da clorpromazina no pré-condicionamento isquêmico renal após 1h de isquemia e 2h de reperfusão.

O uso da clorpromazina não alterou a expressão das proteínas de junção de aderência avaliadas. Entretanto, este trabalho foi pioneiro em demonstrar a localização da E-caderina e da β -catenina em rins de cães que antes foi descrito somente em ratos.

Sabendo da fundamental importância da lesão de isquemia e reperfusão após submeter qualquer tecido a esse processo, torna-se relevante um entendimento de sua fisiopatologia, além da criação de modelos experimentais de isquemia-reperfusão que sejam simples, reprodutíveis e consistentes, com intuito de testar tratamentos que possam atenuar as lesões decorrentes desse tipo de intervenção.

Outra expectativa do estudo poderia ser proposta empregando-se outros métodos como o *Western Blot* que possibilitaria uma avaliação quantitativa desta proteína, podendo dar mais suporte para discussões de sua associação nos mecanismos fisiopatogênicos que culminam com a insuficiência renal aguda isquêmica.

ANEXOS DO CAPÍTULO 2

QUADRO 1: Resultado do exame de urina do cão número 2, submetidos á isquemia e reperfusão sem aplicação de clorpromazina, ao longo de 30 dias de avaliação, Goiânia, 2008.

ASPECTO	I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{14d}	R ^{21d}	R ^{28d}
Cor		Verm	Am ouro	Am citrino	Am citrino	Am ouro	Am ouro	Am claro
Densidade		1,016	1,012	1,020	1,024	1,036	1,024	1,010
pH		8,0	7,5	6,5	6,5	7,0	6,5	7,0
Proteína		7,5	7,5	Traços	-	-	-	-
Glicose		-	-	-	-	-	-	-
Bilirrubina		-	-	+	-	-	-	-
Hemoglobina		+++	+++	-	-	Traços	traços	-
Células		Vesicais (+)	Vesicais (+)	Vesicais (+)	Descamativa	Vesicais (+)	Vesicais (+)	Renais (+)
Leucócitos		1 a 2	1 a 2	1 a 2	-	1 a 2	1 a 2	1 a 2
Hemáceas		Incont	Incont	15 a 20	incont	Incont	7 a 10	1 a 2
Cilindros		-	-	Gran grossos (+)	++	Gran grossos (+)	-	-
Cristais		F amorfos	-	-	-	-	-	-

QUADRO 2: Resultado do exame de urina do cão número 5, submetidos á isquemia e reperfusão sem aplicação de clorpromazina, ao longo de 30 dias de avaliação, Goiânia, 2008.

ASPECTO	I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{14d}	R ^{21d}	R ^{28d}
Cor		Marron	Am citrino	Marron	Am citrino	Am citrino	Am citrino	Am citrino
Densidade		1,038	1,018	1,030	1,024	1,022	1,026	1,024
pH		6,5	6,5	7,5	7,5	7,0	6,5	8,5
Proteína		+	-	Traços	+	-	-	+
Glicose		-	-	-	-	-	-	-
Bilirrubina		-	-	+	+	-	-	-
Hemoglobina		1.025	1,025	-	-	-	-	-
Células		-	-	Vesicais +	renais +	Renais + pélvicas + vesicais +++	-	-
Leucócitos		1 a 2	-	1 a 2	3 a 5	3/campo	1/campo	1
Hemáceas		Incont	-	Incont	Incont	Raras	3/campo	2
Cilindros		-	-	++	Gran finos ++	Hialinos ++; finos +	Gran finos, gran grossos (raros)	G finos (alguns)
Cristais		-	-	-	-	-	-	-

QUADRO 9: Resultado do exame de urina do cão número 4, submetidos á isquemia e reperfusão medicado com clorpromazina, ao longo de 30 dias de avaliação, Goiânia, 2008.

ASPECTO	I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{14d}	R ^{21d}	R ^{28d}
Cor		Am citrino	Marron	Am citrino	Am ouro		Am citrino	Am citrino
Densidade		1,036	1,036	1,020	1,040		1,042	1,046
pH		6,5	6,5	6,0	6,0		7,0	8,0
Proteína		++	++	Traços	-		-	++
Glicose		-	-	-	-		-	-
Bilirrubina		-	-	+	-		-	+
Hemoglobina		1.025	+	Moderada -80	Traços		-	-
Células		-	-	Vesicais +	Renais +; vesicais +		Vesicais (raras)	Renais (várias) Vesicais (algumas)
Leucócitos		1 a 2	1 a 2	3 a 4	3 a 5		14/campo	1/campo
Hemáceas		Incont	Incont	Incont	Incont		1/campo	Incont
Cilindros		-	-	+	Gran finos		Gran finos e grossos (alguns)	Gran finos (alguns) Grossos (raros)
Cristais		-	-	-	-		-	-

QUADRO 10: Resultado do exame de urina do cão número 7, submetidos á isquemia e reperfusão medicado com clorpromazina, ao longo de 30 dias de avaliação, Goiânia, 2008.

ASPECTO	I ⁰	I ^{1h}	R ^{2h}	R ^{3d}	R ^{7d}	R ^{14d}	R ^{21d}	R ^{28d}
Cor	Am. Citrino	Am. Citrino	Am. Citrino	marrom/Am. esverdeado	Laranjada	Am ouro	Am ouro	Am. Citrino
Densidade	1,022	1,030	1,020	1,024	1,026	1,030	1,036	1,030
pH	6,5	8,0	7,0	6,5	6,5	7,5	8,0	7,5
Proteína	-	++	+	+	+	+	++	++
Glicose	-	-	-	-	-	-	-	-
Bilirrubina	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemoglobina	-	++++	++++	+++	-	-	-	-
Células	Vesicais(+)	-	Vesicais(+)	Vesicis (+)	Renais (++) Vesicais(+)	Vesicais(+)	Vesicais(+)	vesicais (+)
Leucócitos	1 a 2	1 a 2	1 a 2	1 a 2	1 a 2	7 a 10	1 a 2	1 a 2
Hemáceas	6 a 7	Incont	Incont	Incont	Incont	7 a 10	3 a 4	1 a 2
Cilindros	Gran finos (+)	-	Gran grossos (+)-	Gran. Finos(+)	-	-	-	Gran. Grossos(+)
Cristais	-	F. de cálcio (+)	-	-	-	F. amorfos +	F. amorfos +	F. amorfos +

