

Distribuição e Expressão da MKP-1 em Diferentes Tempos de Isquemia e Reperusão Renal após a Aplicação de Clorpromazina

Guimarães, L.L.B ¹; Menezes, L.B ²; Pimenta, V.S.C ³; Prado, Y.C.L ³; Araújo, E.G ⁴; Miguel, M.P ⁵.

Palavras-chave: insuficiência renal, renoproteção, transdução de sinal

1. INTRODUÇÃO

Isquemia é definida como sendo 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 arterial após um período de isquemia (EVORA et al., 1996).

Segundo EVORA et al. (1996) Apesar da revascularização sanguínea 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 reperusão de um órgão isquêmico é denominado de lesão de isquemia-reperusão (I/R).

A isquemia tem papel fundamental em muitas situações clínicas. Em seres humanos a hipoperusão severa representa a causa mais freqüente de insuficiência renal aguda (IRA), podendo ser precipitada por cirurgia cardiovascular, trauma, hemorragia, septicemia ou depleção de volume. Além disso, a isquemia é inevitável nos transplantes renais, sendo que a lesão por I/R afeta o individuo tanto a curto (KOUWENHOVEN et al., 2001) bem como a longo prazo (GUELER et al., 2004).

A reperusão inflige em danos adicionais mediados, principalmente, por formação de espécies reativas de oxigênio (NOIRI et al., 2001) que implicam em danos teciduais, pois, iniciam uma cascata de respostas celulares deletérias precedendo a inflamação (BONVENTRE & ZUK, 2004; FRIEDEWALD & RABB, 2004), morte celular (DIRNAGL

¹ Acadêmica em Medicina Veterinária EV/UFG. Bolsista do CNPq. Goiânia, GO, Brasil. Email: [vet.lorena07@gmail.com](mailto:veter.lorena07@gmail.com)

² Professora de Patologia Geral, DMIPP/IPTSP/UFG

³ Aluna de Doutorado em Ciência Animal, EV/UFG

⁴ Professor de Patologia Animal, DMV/EV/UFG

⁵ Professora de Patologia Geral, Campus Jataí/UFG

et al., 1999; FURUKAWA et al., 1997) e, por ultimo, falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003).

Foi demonstrado o envolvimento das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) em eventos de resposta celular a I/R (BOGOYEVITCH et al., 1995; BOGOYEVITCH & SUGDEN, 1996; DERIJARD et al., 1995; DOWNEY, 1992; GOTOH & NISHIDA, 1991), sendo que para PEIPEI et al (1998) os eventos de ativação da cascata das MAPK não estão totalmente esclarecidos.

A unidade central das vias de ativação das MAPKs é constituída por três vias proteínas quinases que estabelecem uma cascata de ativação sequencial que vem sendo mantidas (WIDMANN et al., 1999). O primeiro componente do modulo é uma MAPK quinase quinase (MAPKKK) que quando acionada, ativa a próxima quinase, uma MAPK quinase (MAPKK) que, então induz a ativação da quinase final, a MAPK (GARTNER et al., 1992; SIOW et al., 1997).

A cascata das MAPKs consiste em uma hierarquia das quinases que tem o papel de fosforilar e ativar as quinases efetoras como, p38, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e JNK. Cada quinase efetora é regulada por fosforilações reversíveis (WIDMANN et al., 1999) e, em resposta a ativação das MKPs, ocorre a desfosforilação específica e inativação das quinases efetoras (p-38, JNK e ERK) pelas MAP quinases fosfatases (MKPs) de especificidade dupla (HANEDA et al., 1999).

Segundo KEYSE & EMSLIE (1992) em casos de estresse oxidativo e hipóxia ocorre expressão da fosfatase - 1 da proteína quinase ativada por mitógeno (MKP-1). DORN et al. (1999); LI et al., (1999) afirmaram tratar-se de um importante membro da família das fosfatases de especificidade dupla responsável por regular a inativação das p-38, JNK1/2 e ERK1/2. Desta forma, a regulação da expressão da MKP-1 pode estar relacionada com a sobrevivência ou morte celular em estresse oxidativo.

Intervenções farmacológicas apresentam grande potencial de melhorar as condições clínicas em procedimentos cirúrgicos 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).

Seguindo tal princípio, este trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição e expressão da MKP-1 em diferentes tempos de isquemia e reperfusão renal após a aplicação de clorpromazina.

2. METODOLOGIA

2.1. 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 sob protocolo nº006/2008.

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.

2.2. 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, a artéria renal foi desobstruída e nas primeiras 2h de reperfusão colhidas amostras para estudo 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.

2.3. Amostras

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

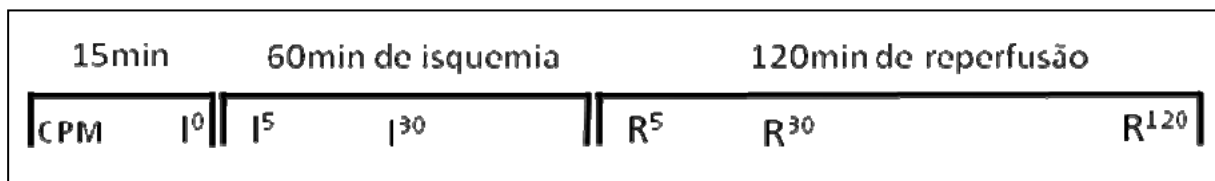


Figura 1: Representação esquemática dos momentos de colheita das amostras. CPM= aplicação da clorpromazina; I⁰= amostra antes da isquemia; I⁵=amostra após 5min de isquemia; I³⁰= amostra após 30min de isquemia; R⁵=amostra após 5min de reperfusão; R³⁰= amostra após 30min de reperfusão; R¹²⁰= amostra após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

2.4. Imunohistoquímica

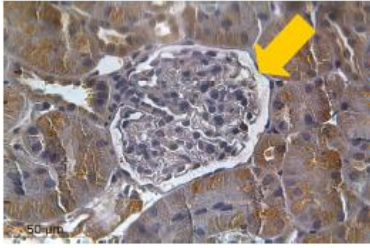
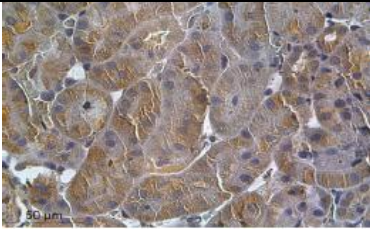
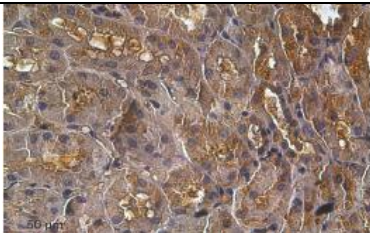
Secções de rim de 3µm foram submetidos a imunohistoquímica e marcados com anticorpo anti-MKP-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc1199). Após desparafinização e desidratação as lâminas foram incubadas por 15 minutos com peróxido de hidrogênio 10vol para bloqueio da atividade da peroxidase endógena e, posteriormente, para recuperação antigênica foi empregada solução de citrato com Triton (pH 6,0) em panela Pascal. Mais tarde, as lâminas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com 3% de soro albumina bovina (BSA) em PBS para prevenir ligações inespecíficas. Os tecidos foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C por 18 horas com anti-MKP-1 1:200 (v/v) diluído 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

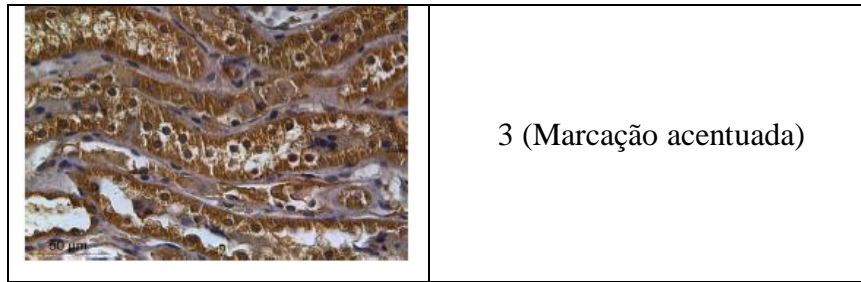
DAB Substrate Chromogen System®, Dako, Carpinteria, California, USA) de 3min. As secções foram contracoradas com hematoxilina de Mayer por 15 minutos e montadas com Entellan (Merck, São Paulo, SP). O controle negativo foi realizado para identificar coloração inespecífica incluindo no lugar do anticorpo primário o BSA e posteriormente Envision.

As lâminas tratadas com os anticorpos para MKP-1 foram analisadas quanto à localização e tonalidade de marcação, por microscopia de luz e a marcação mensurada por avaliação semi-quantitativa atribuindo-se os escores relacionados no Quadro 1, sendo feita análise da região cortical (glomérulo – GL, túbulo contorcido proximal – TCP e túbulo contorcido distal – TCD) 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 1: Escores aplicados a análise da marcação do anticorpo anti-MKP-1 em rins de cães.

Marcação	Escore
	0 (Ausência de marcação – seta)
	1 (Marcação discreta)
	2 (Marcação moderada)



3. RESULTADOS

Observou-se que o emprego do protocolo utilizado na imunohistoquímica foi favorável à observação da marcação pelo anticorpo anti-MKP-1 na presença da proteína MKP-1 no citoplasma celular.

Nos fragmentos expostos ao anticorpo anti-MKP-1 a marcação foi sempre positiva nos TCP e TCD, sendo observada variedade na intensidade de marcação entre os momentos de isquemia e reperfusão comparada dentre os grupos A e B. No Grupo A a expressão da MKP-1 nos glomérulos variou entre ausência de marcação até marcação acentuada, já no grupo B variou de marcação leve à acentuada (Figura 2).

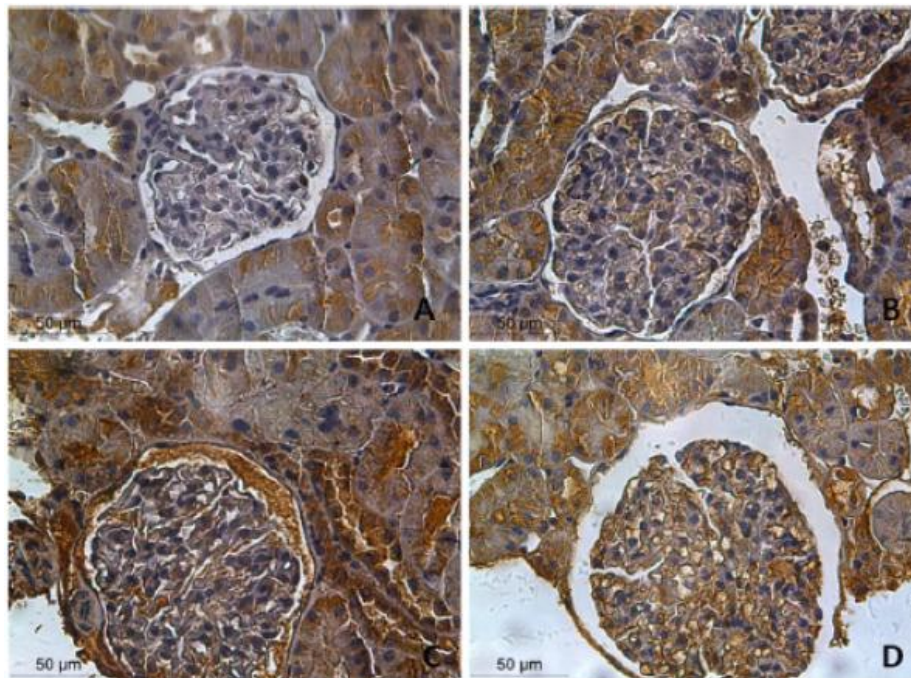


Figura 2: Fotomicroscopia de rim de cão submetido à isquemia e reperfusão, evidenciando diferença de intensidade de expressão da MPK-1 (200x), onde: A-ausência de marcação; B- marcação leve; C-marcação moderada; D-marcação acentuada.

Os resultados revelam que a intensidade de marcação dentro de cada grupo apresentou variação nos TCP, TCD e glomérulo. Porém, foi observado que o escore de marcação acentuada foi mais freqüente nos animais do Grupo A comparado ao Grupo B. Assim, foi observado que o Grupo A apresentou maior variação da intensidade de marcação pelo anticorpo anti-MKP-1 comparado ao grupo B em que o escore variou entre 1 e 2 tanto nos tempos de isquemia como de reperfusão (Tabela 1).

TABELA 1 – Frequência (%) da marcação com anticorpo anti-MKP-1 em rim de cães submetidos a isquemia e reperfusão, tratados (Grupo A) e não tratados (Grupo B) com clorpromazina.

	LOCALIZAÇÃO	ESCORE	INTENSIDADE DE MARCAÇÃO					
			I0	I5	I30	R5	R30	R120
GRUPO A	GL	0	33,33	33,33	0	33,33	0	0
		1	0	0	0	66,66	0	66,66
		2	66,66	0	100	0	66,66	0
		3	0	66,66	0	0	33,33	33,33
	TCP	0	0	0	0	0	0	0
		1	100	33,33	33,33	33,33	33,33	66,66
		2	0	33,33	33,33	33,33	0	33,33
		3	0	33,33	33,33	33,33	66,66	0
	TCD	0	0	0	0	0	0	0
		1	66,66	66,66	33,33	33,33	0	66,66
		2	33,33	0	66,66	0	33,33	0
		3	0	33,33	0	66,66	66,66	33,33
GRUPO B	GL	0	0	0	0	0	0	-
		1	50	50	50	50	50	-
		2	0	0	0	50	50	-
		3	50	50	50	0	0	-
	TCP	0	0	0	0	0	0	0
		1	50	50	0	50	50	100
		2	50	50	100	0	50	0
		3	0	0	0	50	0	0
	TCD	0	0	0	0	0	0	0
		1	50	100	100	50	100	100
		2	50	0	0	50	0	0
		3	0	0	0	0	0	0

GL-glomérulo; TCP-túbulo contorcido proximal; TCD-túbulo contorcido distal; 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada, 3-marcação acentuada. 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.

4. DISCUSSÃO

Foi possível demonstrar o envolvimento da MKP-1 nos eventos de resposta celular a I/R como citado pelos autores GOTOH & NISHIDA (1991), DOWNEY (1992), DERIJARD et al. (1995) e BOGOYEVITCH & SUGDEN (1996). Portanto, é sustentável que o dano provocado pela clampagem da artéria renal provoque danos oxidativos que estimulem a expressão das diferentes MAPKs, pois segundo WIDMANN et al. (1999), é necessário uma cascata de reações para que ocorra ativação seqüencial da MAPKs

Uma alteração molecular observada neste trabalho foi o aumento da presença da proteína MKP-1 no citoplasma dos TCP, TCD e glomérulo que pôde ser evidenciada devido o aumento da intensidade de marcação pelo anticorpo anti-MKP-1. Segundo PADANILAM (2003), durante o processo de isquemia ocorre a privação de oxigênio e nutriente que desencadeia uma série de alterações celulares e moleculares.

Observou-se que mesmo antes da isquemia havia marcação da proteína MKP-1 no citoplasma celular, o que é justificável, pois, segundo os autores CHANG & KARIN (2001), DAVIS (2000), JOHNSON & LAPADAT (2002), PEARSON et al. (2001) e WADA & PENNINGER (2004), a MKP-1, pertencente ao grupo das MAPKs, têm diversas funções, entre elas a de determinar a sobrevivência, regular a proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular.

Não foi possível estabelecer se a expressão da MKP-1 está envolvida com a sobrevivência ou morte celular no processo de isquemia e reperfusão que os animais foram submetidos, e nem fazer relação com proteção ou não conferida pela clorpromazina. Isto aconteceu, pois esta fosfatase faz parte de uma família de proteínas de especificidade dupla, ou seja, pode estar atuando na sobrevivência ou morte celular a depender da MAPK efetora que está inibindo, por exemplo, se estiver atuando na desfosforilação da p-38 ou JNK estão relacionadas com a morte celular e se estiver desfosforilando a ERK1/2 é a sobrevivência celular. Desta forma, há necessidade de completar este trabalho utilizando outros anticorpos a fim de tirar conclusões mais específicas da ativação das MAPKs no processo de isquemia e reperfusão renal após tratamento com clorpromazina.

5. CONCLUSÃO

Foi possível concluir que houve maior intensidade de marcação pela MKP-1 nos rins de cães submetidos à isquemia e reperfusão sem uso de clorpromazina quando comparado com aqueles tratados com clorpromazina.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, 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.
- BONVENTRE J. V; Zuk A: Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney International**, Malden, Massachusetts, v. 66, p. 480-485, 2004.
- BOGOYEVITCH, M. A; KETTERMAN, A. J; SUGDEN, P. H. Cellular stress differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Maryland, v. 270, p. 29710–29717, 1995.
- BOGOYEVITCH, M. A; SUGDEN, P. H. The role of protein kinases in adaptational growth of the heart. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, Reino Unido, v. 28, p. 1–12, 1996.
- CHANG, L; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature Publishing Group**, v. 410, p. 37-40, 2000.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robins: **Patologia estrutural e funcional**. 6.edição, p. 1251. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.
- DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell** v. 103, p. 239-252, 2000.
- DIRNAGL U; IADECOLA C; MOSKOWITZ M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, Netherlands, v. 22, p. 391-7, 1999.
- DORN, G. W I. I; BROW, J. H. Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. **Trends Cardiovasc Med**. 1999;9:26 –34.
- 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.

FONDEVILA, C; BUSUTTIL, R. W; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia-reperfusion injury - a fresh look. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, New York, v.74, n.2, p. 86-93, April, , 2003.

FRANKLIN C. C; KRAFT A. S. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Maryland, v. 272, p. 16917–16923, 1997.

FRIEDEWALD J. J; Rabb H: Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney International**, Malden, Massachusetts, v. 66, p. 486-491, 2004.

FURUKAWA K; FU W; LI Y; WITKE W; KWIATKOWSKI D. J; MATTSON M. P. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, Maryland, v. 17, p. 8178-86, 1997.

GARTNER, A; NASMYTH, K; AMMERER, G. Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 1280-1292, 1992.

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

HANEDA, M; SUGIMOTO, T; KIKKAWA, R. Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, Netherlands, v. 365, p.1–7, 1999.

JOHNSON, G. L; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, Tokyo, v. 298, p. 1911-1912, 2002.

KOUWENHOVEN, E. A; BRUIN, R. W; BAJEMA, I. M; MARQUET, R. L; IJZERMANS JN: Cold ischemia augments allogeneic-mediated injury in rat kidney allografts. **Kidney International**, Malden, Massachusetts, v. 59, p. 1142-1148, 2001.

LI, C; HU, Y; MAYR, M; XU Q. Cyclic strain stress-induced mitogenactivated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Maryland, v. 274, p. 25273–25280, 1999.

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.

NOIRI, E; NAKAO, A; UCHIDA, K; TSUKAHARA, H; OHNO, M; FUJITA, T; BRODSKY, S; GOLIGORSKY, M. S: Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, Maryland, v. 281, p. 948-957, 2001.

PADANILAM, B. J: Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, Maryland, v. 284, p. 608-627, 2003.

PEARSON, G; ROBINSON, F; BEERS, GIBSON, T; XU, B. E; KARANDIKAR, M; BERMAN, K; COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, Baltimore, Maryland, v. 22, p. 153-183, 2001.

SIOW, Y. L; KALMAR, G. B; SANGHERA, J. S; TAI, T; OH, S. S; PELECH, S. L. Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Maryland, p. 7586-7594, 1997.

WADA T; PENNINGER J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, Basingstoke, Inglaterra, v. 23, p. 2838–2849, 2004.

WIDMANN, C; GIBSON, S; JARPE, M. B; JOHNSON, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**, Baltimore, Maryland, v. 79, p. 143–180, 1999.