

Proteção funcional da enzima heme-oxigenase-1 na lesão renal aguda isquêmica e tóxica*

Functional protection of heme-oxygenase-1 enzyme in ischemic and toxic acute kidney injury

Protección funcional de la enzima heme-oxigenasa-1 en la lesión renal aguda isquémica y tóxica

Cassiane Dezoti¹, Mirian Watanabe¹, Carolina Ferreira Pinto¹, Luciana Barros de Moura Neiva¹, Maria de Fátima Fernandes Vattimo²

RESUMO

Objetivos: Verificar a proteção funcional da heme-oxigenase (HO-1), por meio do uso do seu indutor (Hemin) e seu inibidor químico (protoporfirina de zinco-ZnPP) na lesão renal aguda isquêmica e tóxica pela Polimixina B (PmxB) em ratos. **Material:** Foram utilizados ratos Wistar, adultos e machos divididos em 8 grupos: SHAM (controle), Isquemia (Isq), Isq+Hemin (indutor de HO-1), Isq+ZnPP (inibidor de HO-1), SALINA (controle), Polimixina B (PmxB), PmxB+Hemin, PmxB+ZnPP. **Métodos:** Jaffé (clearance de creatinina, Clcr) e FOX-2 (peróxidos urinários). **Resultados:** A isquemia (30') dos pedículos reais e a administração de PmxB reduziu o Clcr com manutenção do fluxo urinário. Os peróxidos urinários se elevaram em ambas as lesões. A administração do Indutor de HO-1 determinou melhora da função renal e redução dos níveis de peróxidos urinários. **Conclusão:** Os resultados deste estudo demonstraram que a isquemia e a PmxB induzem LRA oxidativa. O indutor de HO-1 atenuou a lesão em ambos os modelos por atenuação do mecanismo redox.

Descritores: Rim/lesões; Heme-oxigenase-1

ABSTRACT

Objective: To investigate the functional protection of heme-oxygenase-1 enzyme (HO-1) when using its inducer (Hemin) and inhibitor (zinc protoporphyrin-ZnPP) in ischemic and toxic acute kidney injury by Polymixin B in mice. **Materials:** Adult male Wistar mice divided into 8 groups were used: SHAM (control), Ischemic (Isq), Isq+Hemin (Inducer of HO-1), Isq+ZnPP (inhibitor of HO-1), SALINA (control), Polimyxin B (PmxB), PmxB+Hemin, PmxB+ZnPP. **Method:** Analysis consists of Jaffé (creatinine clearance [CrCl]) and FOX-2 (urinary peroxides [UP]). **Results:** Thirty minutes renal ischemia and its treatment with PmxB reduced the CrCl and maintained urinary output. Urinary peroxide levels increased in both injuries. The administration of the inducer of HO-1 resulted in improvement in renal function and reduction in the levels of urinary peroxide. **Conclusions:** Findings indicated that ischemia and PmxB induce LAR (acute kidney injury [AKI]) by elevating the levels of urinary peroxide. The HO-1 inducer ameliorated the injury in both animal models through redox mechanism.

Keywords: kidney/injuries; Heme-oxygenase-1

RESUMEN

Objetivos: Verificar la protección funcional de la heme-oxigenasa (HO-1), por medio del uso de su indutor (Hemin) y su inhibidor químico (protoporfirina de zinc-ZnPP) en la lesión renal aguda isquémica y tóxica producida por la Polimixina B (PmxB) en ratas. **Material:** Fueron utilizadas ratas Wistar, adultas y machos divididos en 8 grupos: SHAM (control), Isquemia (Isq), Isq+Hemin (indutor de HO-1), Isq+ZnPP (inibidor de HO-1), SALINA (control), Polimixina B (PmxB), PmxB+Hemin, PmxB+ZnPP. **Métodos:** Jaffé (clearance de creatinina, Clcr) y FOX-2 (peróxidos urinarios). **Resultados:** La isquemia (30') de los pedículos reales y la administración de PmxB redujo el Clcr con manutención del flujo urinario. Los peróxidos urinarios se elevaron en ambas lesiones. La administración del Inductor de HO-1 determinó mejora de la función renal y reducción de los niveles de peróxidos urinarios. **Conclusión:** Los resultados de este estudio demuestran que la isquemia y la PmxB inducen AKI por la elevación de los peróxidos urinarios. El indutor de HO-1 atenuó la lesión en ambos modelos por atenuación del mecanismo redox.

Descriptores: Riñón/lesión; Hemo-oxigenase-1

* Estudo realizado no Instituto de Ciências Biológicas IV da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Mestre, Laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

² Livre-docente, Professora da Escola de Enfermagem e Laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

A isquemia e a nefrotoxicidade são as causas mais comuns de lesão renal aguda (LRA). A LRA é caracterizada pelo aumento plasmático de produtos do metabolismo protéico (creatinina e uréia), redução da taxa de filtração glomerular (clearance de creatinina) ou redução do fluxo urinário e está relacionada ao aumento no tempo de hospitalização e mortalidade⁽¹⁻²⁾.

A fisiopatologia da LRA envolve vários mecanismos como a vasoconstrição da microvasculatura renal, envolvendo espécies reativas de oxigênio, resposta inflamatória e ativação de mecanismos de proteção celular como a heme oxigenase-1 (HO-1)^(1,3). Os mecanismos envolvidos na LRA estão presentes tanto no modelo de isquemia, quanto na toxicidade com gradações diferentes que na clínica acabam por definir padrões menos severos para as lesões por nefrotoxicidade em situações em que não estão presentes outros agravos, Há que se ressaltar que circunstâncias em que se observe lesão renal aguda isolada de outras ocorrências mórbidas são raras.

Neste estudo, pela sua recente retomada clínica, a polimixina B, um antibiótico catiônico com ação surfactante sobre a membrana celular bacteriana característica que lhe confere efeito contra microorganismos gram negativos, será o foco de atenção. Destaca-se o efeito nefrotóxico significativo desse fármaco, que apesar do uso não tão comum, é relevante uma vez que quando indicado traduz-se como única opção terapêutica.

O sistema HO degrada o grupo heme em biliverdina, ferritina e monóxido de carbono. Os subprodutos têm demonstrado ação de proteção celular: a biliverdina convertida para bilirrubina sob a ação da biliverdina redutase confere a ação antioxidante; a ferritina é a forma inativa do ferro e ausenta a sua participação no desequilíbrio redox e finalmente o monóxido de carbono com ação vasodilatadora⁽⁴⁻⁵⁾.

A hipótese deste estudo é que a heme oxigenase possa desempenhar efeito de proteção na função renal de ratos submetidos a modelos de LRA, por toxicidade pela Polimixina B ou isquemia, e que esse efeito ocorra por interferência no mecanismo oxidativo descrito para essa síndrome.

OBJETIVO

Este estudo teve por objetivo verificar a proteção funcional da HO-1, por meio do uso do seu indutor (Hemin) e seu inibidor químico (protoporfirina de zinco-ZnPP) na LRA isquêmica e tóxica pela Polimixina B em ratos.

MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão

de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas IV da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados ratos Wistar, adultos e machos divididos nos protocolos isquemia e tóxico (PmxB):

Protocolo isquemia

1. SHAM (controle) – ratos que foram submetidos ao tratamento cirúrgico sem o clampeamento dos pedículos.
2. Isquemia (Isq) – ratos que foram submetidos ao clampeamento dos pedículos renais durante 30 minutos.
3. Isq + Hemin – ratos que foram submetidos à isquemia renal e administração de Hemin (1 mg/kg), via intraperitoneal (ip), 24 horas antes do procedimento cirúrgico.
4. Isq + ZnPP - ratos que foram submetidos à isquemia renal e administração de ZnPP (50 imol/kg), ip, uma hora antes do procedimento cirúrgico.

Protocolo tóxico

5. SALINA (controle) – ratos que foram submetidos à administração de soro fisiológico 0,9%, ip, durante cinco dias.
6. PmxB - ratos que foram submetidos à administração de polimixina B (PmxB) (4mg/kg/dia), ip durante cinco dias.
7. PmxB + Hemin - ratos que foram submetidos à administração de PmxB durante cinco dias e Hemin (1 mg/kg), ip, uma vez ao dia.
8. PmxB + ZnPP - ratos que foram submetidos à administração de PmxB durante cinco dias e ZnPP (50 imol/kg), ip, uma vez dia.

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (gaiola individual que permite mensuração de variáveis biológicas), durante 24 horas, para coleta de urina e tiveram acesso livre à água e alimentos. Após a retirada da gaiola metabólica, os animais foram anestesiados com tiopental de sódio 20-30 mg/kg, via intraperitoneal para punção da aorta abdominal e então obtenção de plasma. Ao final do experimento, o animal foi sacrificado segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório.

As amostras de urina e sangue forma utilizadas para a mensuração do clearance de creatinina, Clcr/ 100g método Jaffé⁽⁶⁾, que foi o marcador de função renal adotado neste estudo. A lesão oxidativa foi avaliada por meio da mensuração de peróxidos urinários, método FOX-2⁽⁷⁾.

RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

A isquemia dos pedículos renais durante 30 minutos e a administração de PmxB durante cinco dias em ratos

Tabela 1 - Dados de função renal global (Clcr) e excreção de peróxidos urinários (PU) dos grupos isquêmicos e de tóxico. São Paulo - 2008

Grupos	PU	Clcr	Grupos	Clcr	PU (nmol/mg
Isquemia	(nmol/mg creatinina)	(ml/min)	Tóxico	(ml/min)	creatinina)
SHAM	5,6±0,4	0,60±0,03	SALINA	0,70±0,01	5,05±0,10
Isquemia	13,6±0,6*	0,21±0,01*	PmxB	0,28±0,03*	35,32±0,60*
Isq+Hemin	4,9±0,4**	0,46±0,02**	PmxB+Hemin	0,50±0,09**	10,78±0,90**
Isq+ZnPP	11,9±0,5*	0,37±0,01**	PmxB+ZnPP	0,31±0,13**	29,65±0,04*

Os dados representam médias ± erro padrão, *p < 0,05 versus SHAM e Salina, **p < 0,05 versus Isquemia e PmxB

confirmou o modelo de LRA com redução da taxa de filtração glomerular. A análise dos peróxidos urinários confirmou a participação do desequilíbrio redox nos modelos isquêmico e tóxico com aumento dos níveis de peróxidos urinários.

A administração do Indutor de HO-1 conferiu proteção funcional em ambos os modelos com melhora da função renal e redução dos níveis de peróxidos urinários. Por outro lado, a administração do inibidor de HO-1 não demonstrou diferenças estatísticas em relação aos grupos isquemia e PmxB.

DISCUSSÃO

A etiologia da LRA é multifatorial destacando-se as lesões isquêmica e a nefrotóxica. Seu mecanismo fisiopatológico envolve uma complexa cascata de eventos, onde a resposta inflamatória e o desequilíbrio redox desempenham importante papel^(2,8).

Este estudo confirmou o envolvimento do desequilíbrio redox na LRA isquêmica e tóxica, pela polimixina B, com elevação dos níveis de peróxidos urinários e redução da função renal, utilizando-se o *clearance* de creatinina como marcador, que esteve significativamente reduzido nas situações de lesão instituídas.

A administração do indutor de HO-1 (Hemin) demonstrou função protetora da enzima HO-1 nos modelos de isquemia e toxicidade renal. A isoforma induzível HO-1 é bastante estudada como um sistema citoprotetor efetivo em modelos isquêmicos e de toxicidade⁽⁹⁻¹²⁾.

A HO-1 desempenha um importante papel na manutenção da função renal e na proteção de células tubulares, principalmente em segmento dos néfrons

susceptíveis a lesão isquêmica ou tóxica, achado já demonstrado pela proteção funcional em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*^(11,13).

Acredita-se que a função protetora de HO-1 esteja associada à ação de um ou mais subprodutos provenientes da degradação de heme: bilirrubina, ferritina e monóxido de carbono⁽¹⁴⁾.

A ZnPP, um seletivo inibidor de HO-1 e HO-2 com alta especificidade, de forma intrigante, não demonstrou alteração na função renal ou interferência no mecanismo redox. De fato, estudos com modelos animais de isquemia-reperfusão e administração de altas doses do inibidor de HO-1 demonstraram melhora significativa da função renal sugerindo que esse inibidor possa ter envolvimento em outras vias de proteção celular independente da atividade de HO, ou ainda que a inibição de HO-1, caso ocorra de forma satisfatória, não é capaz de originar desvios funcionais vistos pelo *clearance* de creatinina⁽¹⁰⁾.

Sumariamente, o estudo comprovou a proteção funcional da HO-1 em modelos animais de isquemia e nefrotoxicidade com melhora da função renal e redução dos níveis de peróxidos urinários com a administração do indutor de HO-1.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a isquemia e a PmxB induzem lesão renal com elevação da excreção de peróxidos urinários. O indutor de HO-1 atenuou a lesão em ambos os modelos, enquanto que a administração do inibidor não demonstrou efeito significativo nessas lesões. Os achados confirmam a participação e proteção funcional de HO-1 nas lesões renais isquêmica e nefrotóxica.

REFERÊNCIAS

- Pannu N, Nadim MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. *Crit Care Med.* 2008;36(4 Suppl):S216-23.
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C; Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA.* 2005;294(7):813-8. Comment in: *JAMA.* 2006;295(6):624; author reply 624-5. *JAMA.* 2006;295(6):624; author reply 624-5.
- Shimizu H, Takahashi T, Suzuki T, Yamasaki A, Fujiwara T, Odaka Y, et al. Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med.* 2000;28(3):809-17.
- Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 Gene-Ablation and expression. *J*

- Am Soc Nephrol. 2000;11(5):965-73.
- Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol.* 2002;21(4):307-21.
 - Dórea EL, Yu L, De Castro I, Campos SB, Ori M, Vaccari EM, et al. Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(9):1415-22.
 - Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. *Anal Biochem.* 1999;273(2):149-55.
 - Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(6):1503-20.
 - Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest.* 1992;90(1):267-70.
 - Morimoto K, Ohta K, Yachie A, Yang Y, Shimizu M, Goto C, et al. Cytoprotective role of heme oxygenase (HO)-1 in human kidney with various renal diseases. *Kidney Int.* 2001;60(5):1858-66.
 - Mosley K, Wembridge DE, Cattell V, Cook HT. Heme oxygenase is induced in nephrotoxic nephritis and hemin, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. *Kidney Int.* 1998;53(3):672-8.
 - Watanabe M, de Moura Neiva LB, da Costa Santos CX, Martins Laurindo FR, de Fátima Fernandes Vattimo M. Isoflavone and the heme oxygenase system in ischemic acute kidney injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(12):2366-71.
 - da Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabaawy HE, Lianos E, Abraham NG. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int.* 2001;59(4):1448-57.
 - Kaizu T, Tamaki T, Tanaka M, Uchida Y, Tsuchihashi S, Kawamura A, Kakita A. Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int.* 2003;63(4):1393-403.