

Efeito da hipóxia e reoxigenação na resposta à angiotensina II em células mesangiais *in vitro*

Authors

Clara Versolato Razvickas¹
 Fernanda Teixeira Borges¹
 Andréia Silva de Oliveira¹
 Nestor Schor¹
 Mirian Aparecida Boim¹

¹ Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Submitted on: 06/18/2013.
 Approved on: 09/03/2013.

Correspondence to:

Mirian Aparecida Boim.
 Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).
 Rua Pedro de Toledo, nº 781,
 13º andar, Vila Clementino,
 São Paulo, SP. CEP: 04039-032.
 E-mail: maboim@unifesp.br
 Capes, CNPq, FOR, FAPESP.

DOI: 10.5935/0101-2800.20130044

RESUMO

Introdução: Células mesangiais (CM) podem estar envolvidas na lesão glomerular induzida por hipóxia/reperfusão (H/R). **Objetivo:** Avaliar a resposta de CM imortalizadas (CMI) à hipóxia por 30 minutos seguida de reoxigenação por 30 minutos (H/R₃₀) ou 24 horas (H/R₂₄). **Métodos:** Concentração de cálcio intracelular ([Ca²⁺]_i) foi avaliada antes (basal) e após a adição de angiotensina II (AII, 10⁻⁵ M), na presença e na ausência de glibenclamida (bloqueador de canais K_{ATP}). Foram estimados o nível de ATP intracelular, de óxido nítrico (NO) e de PGE₂. **Resultados:** Nível de ATP diminuiu após hipóxia e aumentou após a reoxigenação. H/R induziu aumento na [Ca²⁺]_i basal. A AII elevou a [Ca²⁺]_i nas condições de normoxia (97 ± 9%), hipóxia (72 ± 10%) ou HR₃₀ (85 ± 17%), porém no grupo H/R₂₄ houve diminuição significativa na resposta à AII, uma vez que a elevação da [Ca²⁺]_i foi mais baixa do que no controle (61 ± 10%, *p* < 0,05). Glibenclamida não alterou esta resposta. Houve um aumento significativo na geração de NO após 24 horas de reoxigenação, mas não foi observada nenhuma diferença na produção de PGE₂. Os dados indicam que a injúria celular causada pela hipóxia/reoxigenação é caracterizada pelo aumento na [Ca²⁺]_i basal e por uma diminuição na reatividade celular à AII. Resultados sugerem que a insensibilidade ao agonista constritor pode ser pelo menos em parte, mediada pelo NO, mas não pelas prostaglandinas ou por canais K_{ATP}. **Conclusão:** H/R resultou em disfunção das CMI, caracterizada pelo aumento na [Ca²⁺]_i basal durante a hipóxia e redução da resposta funcional a AII durante a reoxigenação.

Palavras-chave: angiotensina II, hipóxia celular, lesão renal aguda, técnicas de culturas de células.

INTRODUÇÃO

A isquemia renal continua a ser a principal causa de lesão renal aguda (IRA) na população adulta, apresentando alta taxa de morbidade e mortalidade, como mostrado por um estudo multicêntrico e prospectivo, no qual aproximadamente 60% dos pacientes com lesão renal aguda isquêmica evoluíram para óbito durante a internação hospitalar.¹

A lesão por isquemia/reperfusão (I/R) provoca danos substanciais aos túbulos renais, e também afeta a microcirculação renal. A disfunção glomerular observada durante a I/R é causada por muitos fatores, incluindo a resposta funcional da microcirculação à hipóxia e um desequilíbrio entre vasoconstritores e substâncias vasodilatadoras. Há um aumento no tônus vascular intrínseco, que reduz a filtração glomerular, mas também há um aumento da resposta aos agentes vasoconstritores, enganando a capacidade autoreguladora e deixando o rim vulnerável a uma recorrente lesão isquêmica.²

Os mecanismos de dano tubular durante a lesão por I/R são melhor conhecidos; no entanto, os mecanismos de lesão glomerular, são menos compreendidos. Células mesangiais modulam a taxa de filtração glomerular, devido às suas propriedades de contração e relaxamento em resposta a substâncias vasoativas,³ afetando diretamente a área da superfície glomerular. O relaxamento é uma manifestação comum de isquemia nas células semelhantes às do músculo liso, resultando em vasodilatação, principalmente dependente da ativação de canais de K⁺.⁴

Embora as alterações agudas na concentração local do oxigênio causam profundos efeitos sobre a contratilidade arterial, os mecanismos envolvidos são complexos e não totalmente caracterizadas. No entanto, tanto a liberação de fatores endoteliais⁵ e alterações na concentração de cálcio intracelular livre ($[Ca^{2+}]_i$) parecem ter um papel central na contratilidade arterial induzida por hipóxia.^{6,7} O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) tem sido implicado na fisiopatologia da lesão hipóxica em diferentes tipos de células, incluindo as epiteliais, endoteliais e músculo liso vascular.^{8,9} No entanto, o papel das células mesangiais na lesão hipóxica foi menos investigado. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta funcional de células mesangiais imortalizadas (IMC) de ratos à lesão por hipóxia/reperfusão em relação a níveis de cálcio e a produção de fatores vasodilatadores, tais como o óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE_2) e ativação de canais K.

MÉTODOS

As células mesangiais imortalizadas de ratos obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC), foram cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino; 2g/L de $NaHCO_3$; 2,6g/L de HEPES; 10.000UI/L de penicilina; e 100 mg/L de neomicina. As células foram mantidas na incubadora a 37°C em mistura de ar de 95% O_2 e 5% CO_2 .

Foram estudados quatro grupos de células: controle (Cont) onde as células foram mantidos sob oxigenação normal; hipóxia aguda, onde as células foram mantidas em mistura gasosa contendo 95% de N_2 e 5% de CO_2 durante 30 minutos (H_{30}); hipóxia aguda/reperfusão, em que as células foram mantidas em condições de hipóxia durante 30 minutos, seguido por 30 minutos (H/R_{30}) ou 24 horas (H/R_{24}) em oxigenação (períodos de reperfusão).

A hipóxia foi induzida pela adição de duas agulhas 30 x 7 mm para trespassar a rolha, e através de uma dessas agulhas foi conectado um sistema de infusão da mistura gasosa. Durante 30 minutos, 3 a 4 litros por minuto desta mistura gasosa foram infundidos com o propósito de reduzir a pressão parcial de oxigênio no meio de cultura.

A viabilidade celular foi avaliada através do método de exclusão utilizando dois corantes fluorescentes: o laranja de acridina (100 μ g/mL) e brometo de etídio (100 μ g/mL). As células foram examinadas por

microscopia óptica de fluorescência. Cerca de 100 a 150 células foram contadas e consideradas viáveis quando coradas em verde, e não viáveis quando coradas de laranja. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células viáveis.

A liberação de LDH foi utilizada para avaliar o dano celular. A integridade da membrana plasmática foi avaliada por meio do vazamento da enzima citosólica, lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura. A enzima foi determinada por espectrofotometria no meio de incubação através da medição da taxa de consumo de NADH a 340nm.

As medidas da concentração de cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) foram realizadas pelo método de espectrofluorimetria usando o método Fura 2-AM. As células mesangiais (4×10^5 células/mL) foram novamente suspensas em solução Thyrode (em mM: NaCl 137,0; KCl 2,7; $CaCl_2$; $2H_2O$ 1,4; $MgCl_2$; $6H_2O$ 0,5; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,4; $16,0H_2CO_3$, Glicose 5,5) suplementado com albumina bovina sérica (BSA, 0,2% w/v) e incubadas com fura-2 acetoximetil ester (AM; 5 μ M, 23°C) durante 1 hora, sob agitação contínua. As medidas de $[Ca^{2+}]_i$ foram realizadas num espectrofluorímetro (Photon Technology International, Ontário, Canadá). Foram alcançadas taxas máximas e mínimas de 340/380 através da administração do permeabilizante celular digitonina (50 μ M) e EGTA (4 mM) + NaOH (0,04 N) adicionada no final das experiências. As medidas de $[Ca^{2+}]_i$ foram feitas de acordo com Grynkiewicz e colaboradores.¹⁰ A resposta funcional das células foi avaliada pela alteração de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a 10^{-5} M de angiotensina II (All) em comparação com níveis basais. Esta concentração de angiotensina II foi previamente determinada como uma concentração na qual $[Ca^{2+}]_i$ atingiu um platô.¹¹

A concentração intracelular de ATP foi analisada por bioluminescência através de reação de luciferina-luciferase.¹² As concentrações de ATP no lisado celular foram quantificadas utilizando-se um kit de determinação de ATP de acordo com as instruções do fabricante. As placas de 96 poços foram então lidas (Luminunc™ Placa Nunc). Uma curva padrão foi gerada utilizando soluções com concentrações conhecidas de ATP. As concentrações de proteína nas amostras foram determinadas pelo método de Lowry.¹³ Os níveis de ATP foram calculados como ATP nanomolar por miligrama de proteína.

A produção de NO foi determinada no meio de cultura pelo método da quimioluminescência¹⁴ utilizando

o Analisador de Óxido Nítrico (NOA™, Modelo 280; Sievers Instruments, Boulder, CO, EUA). A concentração de NO foi normalizada pelo teor total de proteína celular, que foi medido pelo método de Lowry.

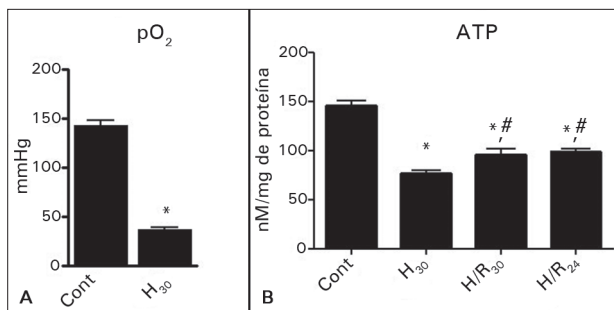
Os níveis de prostaglandina (PGE₂) foram avaliados pelo método ELISA, utilizando um kit comercial (Prostaglandin E₂ enzyme immunoassay system, BIOTRAK, Amersham Pharmacia, England).¹⁵ O ensaio é baseado na competição entre PGE₂ presente na amostra e a quantidade fixa de anti-PGE₂ marcado com peroxidase de acordo com as instruções do fabricante.

Análise estatística: os valores foram apresentados como média ± SEM. Foram realizados testes de ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparar as diferenças entre os grupos. Usamos os testes “t” pareado de Student e ANOVA de Friedman para comparar os resultados obtidos no mesmo grupo. A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

RESULTADOS

A condição hipóxica foi caracterizada por uma redução significativa na pO₂ (36 ± 3 mm Hg) em relação à condição de normoxia de controle (139 ± 2 mmHg), (Figura 1A). Além disso, a redução na concentração intracelular de ATP confirmou a resposta metabólica à hipóxia (Figura 1B).

Figura 1. Níveis de pO₂ antes (n = 6) e depois de 30 minutos de hipóxia (n = 9). Níveis ATP intracelular nos grupos Controle (n = 9); H₃₀ (n = 9); H/R₃₀ (n = 9) e H/R₂₄ (n = 9). $p < 0,05$: * vs. controles; # vs. H₃₀.



Não houve diferença significativa na viabilidade celular analisada pelo método laranja de acridina entre os grupos controle, H₃₀, H/R₃₀, mas houve uma diminuição significativa da viabilidade celular no grupo H/R₂₄. Estes resultados foram corroborados por permeabilidade da membrana celular analisada por liberação intracelular da enzima LDH. Houve um aumento significativo da LDH no meio de cultura em H/R₃₀ (20 ± 1%) e H/R₂₄ (41 ± 3%) em comparação com o grupo controle (15 ± 1%) (Tabela 1).

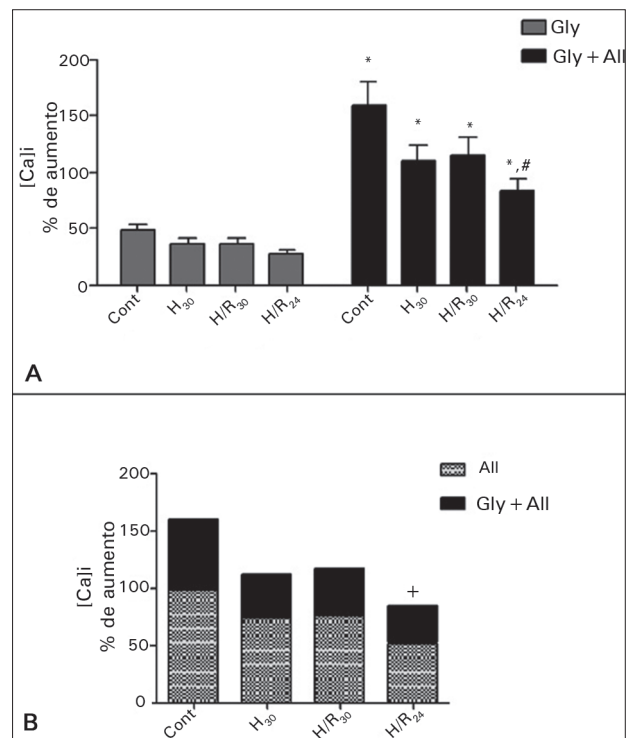
TABELA 1 VIABILIDADE CELULAR AVALIADA PELA LIBERAÇÃO DE LARANJA DE ACRIDINA (A/O) E LDH

Grupo	A/O (%)	DHL (%)
Cont	88 ± 2	15 ± 1
H ₃₀	83 ± 2	19 ± 2
H/R ₃₀	91 ± 1	20 ± 1*
H/R ₂₄	79 ± 2*	41 ± 3*

* $p < 0,05$ vs. Controle (Cont, n = 7 para cada grupo). A viabilidade celular foi feita pela coloração da acridina laranja e a integridade da membrana plasmática foi avaliada pela liberação da desidrogenase láctica (LDH).

Um aumento significativo nos níveis basais de [Ca²⁺]_i foi observado no grupo em hipóxia (H₃₀: 365 ± 40 vs. cont: 186 ± 24 nM) e também após os períodos de reperfusão. (H/R₃₀: 360 ± 73 nM e H/R₂₄: 355 ± 48 nM), como mostrado na Figura 2A. A adição de AII induziu elevação na [Ca]_i em todos os grupos (Figura 2B), no entanto, a resposta foi significativamente inferior nos grupos H₃₀ e H/R₂₄, como mostrado na Figura 2C.

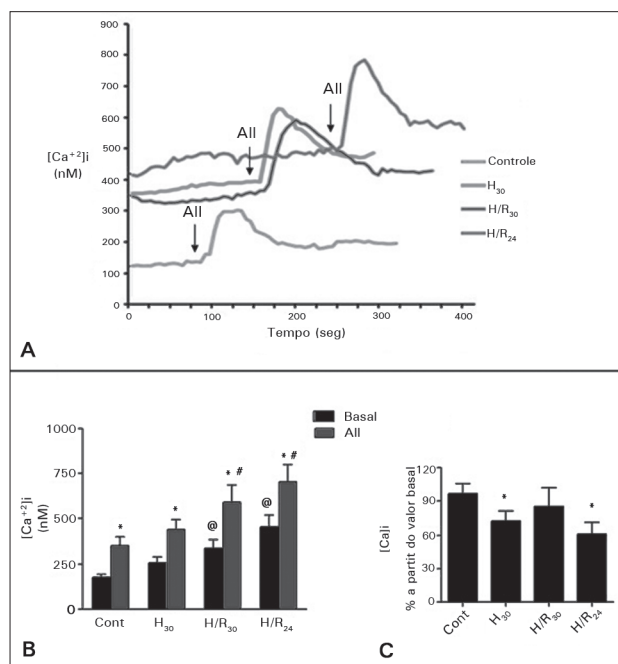
Figura 2. Concentração de cálcio intracelular. A: Registro representativo da liberação intracelular de cálcio sob condições basais e após estímulo por AII (10⁻⁶ M); B: Valores médios obtidos para todos os animais nos grupos Controle (n = 14); H₃₀ (n = 14); H/R₃₀ (n = 10) e H/R₂₄ (n = 10); C: Porcentagem de aumento na [Ca]_i após adição de AII. $p < 0,05$: * vs. basal; # vs. cont; @ vs. cont após AII.



A glibenclamida induziu um ligeiro aumento na [Ca²⁺]_i, que foi semelhante entre os grupos (Figura 3A). A glibenclamida não alterou o perfil de resposta à AII

(Figura 3B); no entanto, a intensidade do aumento na $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela AII, na presença de glibenclamida foi maior do que aquela observada na ausência de glibenclamida (Figura 3C).

Figura 3. Cálcio intracelular. A: Porcentagem de aumentos na $[Ca^{2+}]_i$ em relação aos valores basais em resposta à glibenclamida isoladamente e à AII na presença de glibenclamida nos grupos Controle (n = 6); H₃₀ (n = 14); H/R₃₀ (n = 9) e H/R₂₄ (n = 14); B: Efeitos acumulados da AII na presença de Gli comparados à AII isoladamente. $p < 0.05$: * vs. Gli; # vs. cont após a AII.



A produção de NO foi analisada na hipóxia, e na hipóxia seguida por períodos de reperfusão. Os grupos H₃₀ e H/R₃₀ não apresentaram qualquer diferença na geração de NO em comparação com o grupo controle; no entanto, houve um aumento significativo da produção de NO no grupo H/R₂₄ em comparação com as condições de normoxia. Em contraste, a produção de PGE₂ não foi diferente entre os grupos (Tabela 2).

TABELA 2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E NÍVEIS DE PGE₂ NO MEIO DE CULTURA

Grupos	NO (μM/μg prot)	PGE ₂ (pg/mg prot)
Cont	6.8 ± 1.0	5.9 ± 0.7
H ₃₀	9.8 ± 1.3	5.6 ± 0.5
H/R ₃₀	8.7 ± 1.3	5.2 ± 0.3
H/R ₂₄	12.2 ± 2.0*	5.4 ± 0.6

* $p < 0.05$ vs. Controle (Cont, n = 12 para cada grupo). A produção de óxido nítrico foi estimada pela quimioluminescência e a PGE₂ pelo método Elisa.

DISCUSSÃO

O fornecimento de oxigênio a um tecido é em grande parte dependente da vascularização e da oxigenação sanguínea naquele local, enquanto a demanda de oxigênio é largamente determinada pela taxa de respiração celular. A depleção de oxigênio pode ser absoluta (anoxia) ou parcial (hipóxia), mas tem de estar a um nível inferior ao requerido para a completa oxidação do citocromo C.^{16,17} No presente estudo, não houve uma diminuição significativa na pO₂ e os níveis intracelulares de ATP, indicando que o ambiente hipóxico foi estabelecido neste modelo *in vitro* e a produção de ATP foi enfraquecida. Após a reoxigenação os níveis de ATP aumentaram de forma significativa, embora tenha permanecido abaixo das condições de oxigenação de controle. Além disso, lesão e morte celular foram observadas principalmente após um período prolongado de reoxigenação, como observado por outros.¹⁸ Estes resultados apontam para a presença de alterações respiratórias e metabólicas compatíveis com lesão por hipóxia/reperfusão observada *in vivo*.

Células mesangiais têm capacidade contrátil em resposta a uma variedade de hormônios, que é mediada por um aumento na concentração de cálcio intracelular. Aumentos na $[Ca^{2+}]_i$ são causados pela liberação de Ca²⁺ a partir de sítios de armazenamento intracelular na membrana citoplasmática celular,¹⁹ promovendo contração. Observamos um aumento significativo na concentração basal de $[Ca^{2+}]_i$ nas células submetidas à hipóxia e também à hipóxia seguida por reoxigenação. Este aumento na $[Ca^{2+}]_i$ pode induzir contração na célula mesangial, resultando numa diminuição da área de filtração glomerular, o que poderia mediar a redução na taxa de filtração glomerular durante situações de hipóxia.²⁰ Esse aumento na $[Ca^{2+}]_i$ pode ser consequente ao dano da membrana plasmática (aumento de LDH). No entanto, é também importante considerar que a depleção de ATP induzida por hipóxia resulta em disfunção das bombas de íons, tais como a Ca-ATPase, e outros transportadores responsáveis para manter a $[Ca^{2+}]_i$, resultando no acúmulo de cálcio no citoplasma. Além disso, um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ induzido por hipóxia tem também sido atribuído a uma estimulação da proteína quinase C (PKC)⁹, provavelmente por um mecanismo dependente de espécies reativas de oxigênio (ROS).²¹ Além da contração, a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ pode também

determinar uma ruptura na homeostase celular, uma vez que o cálcio é um importante segundo mensageiro em muitas respostas fisiológicas celulares, portanto, perturbações na homeostase do cálcio podem sobrecarregar a capacidade da célula em manter a sua função fisiológica.²²

Em contraste a um aumento nos níveis basais de $[Ca^{2+}]_i$, a resposta das células à AII foi prejudicada após a hipóxia e também depois de um período mais prolongado de reoxigenação (24h). Este comportamento foi melhor observado quando a $[Ca^{2+}]_i$ foi calculada como porcentagem do aumento após a adição de AII. Este resultado sugere que a lesão por isquemia/reperfusão pode modificar a capacidade funcional das células mesangiais de reagir a um agente vasoconstritor. Os íons cálcio intracelulares são regulados principalmente por um mecanismo de influxo/efluxo de cálcio e captação/liberação de Ca pelo retículo sarcoplasmático. O influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática constitui um dos principais componentes das respostas mesangiais a vasoconstritores, i.e. AII³ e, portanto, a redução na resposta à AII durante lesões por I/R pode ser causada, principalmente, por uma deficiência das células em controlar o influxo de cálcio. À propósito, Sahai e colaboradores⁹ demonstraram que o bloqueador de canal de cálcio - verapamil impediu a estimulação induzida por hipóxia da $[Ca^{2+}]_i$ em células mesangiais em cultura.

Além disso, em nossas condições experimentais, a concentração de ATP reduziu sob hipóxia e melhorou discretamente após reoxigenação. A recuperação de ATP celular durante a reperfusão depende de vários fatores que são influenciados principalmente pela duração da isquemia. Fatores específicos incluem a disponibilidade de ADP, AMP, bases de nucleótidos, e a função mitocondrial. O AMP fornece a fonte mais rápida e importante para a ressíntese de ATP após a isquemia *in vivo*.²³

Está bem estabelecido que durante a isquemia, a concentração de ATP celular diminui significativamente,²⁴ como foi observado no presente estudo. Além disso, é bem sabido que a redução no coeficiente ATP/ADP abre canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}),²⁵ resultando em hiperpolarização da membrana celular e, conseqüentemente, fechamento dos canais de cálcio voltagem-dependentes, resultando numa diminuição da $[Ca^{2+}]_i$. Este mecanismo está

envolvido principalmente no relaxamento das células musculares lisas vasculares e também pode diminuir a sensibilidade das células aos agentes vasoconstritores. A glibenclamida é um bloqueador específico do canal K_{ATP} e a adição de glibenclamida as MCs potencializou os efeitos da AII, embora não tenha alterado o perfil de resposta à AII. Este resultado sugere que os canais K_{ATP} podem ter um papel na manutenção do potencial de repouso de membrana na célula mesangial, mas que não estão envolvidos na resposta inadequada das células à AII sob lesão por hipóxia/reperfusão.

A fim de investigar o possível mecanismo de baixa reatividade de MCs a AII, avaliou-se a produção de dois agentes vasodilatadores importantes, incluindo o óxido nítrico e a prostaglandina E_2 . Não houve mudança na produção de PGE_2 entre os grupos; no entanto, houve um aumento significativo na produção de NO no grupo H/R₂₄, sugerindo que o NO pode ser um potencial mediador da resposta inadequada da MCs à AII durante um período prolongado de reoxigenação. Em contraste, tem sido bem descrito que a produção de NO fica reduzida durante a hipóxia, causando disfunção do tônus do músculo liso vascular. Por outro lado, o efeito da hipóxia em células mesangiais em cultura é mal compreendido, mas uma possibilidade é que o aumento na produção de NO sob condições de hipóxia possa ser atribuído à ativação do fator induzido por hipóxia (FIH), que por sua vez, pode aumentar a expressão da NOS e produção de NO,²⁶ no entanto, essa hipótese deve ser comprovada em experimentos futuros.

Em conclusão, o presente modelo de hipóxia/reperfusão causou a disfunção no CMI, caracterizada pelo aumento na concentração basal de $[Ca^{2+}]_i$ após hipóxia e reperfusão, mas a resposta à AII foi enfraquecida após prolongado período de reperfusão. O potencial mediador da hiporreatividade destas células um agente vasoconstritor inclui o NO, mas não os canais K_{ATP} ou PGE_2 . Esta deficiência funcional de células mesangiais pode estar envolvida na disfunção glomerular durante a lesão por isquemia e reperfusão.

REFERÊNCIAS

- Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004;114:5-14. PMID: 15232604
- Conger J. Hemodynamic factors in acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther* 1997;4:25-37. PMID: 9113238
- Stockand JD, Sansom SC. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol Rev* 1998;78:723-44. PMID: 9674692

4. Liu Y, Gutterman DD. Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:305-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03649.x>
5. Ward JP, Robertson TP. The role of the endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Exp Physiol* 1995;80:793-801. PMID: 8546868
6. Morio Y, McMurtry IF. Ca(2+) release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *J Appl Physiol* 2002;92:527-34. PMID: 11796660
7. Shimizu S, Bowman PS, Thorne G 3rd, Paul RJ. Effects of hypoxia on isometric force, intracellular Ca(2+), pH, and energetics in porcine coronary artery. *Circ Res* 2000;86:862-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.86.8.862>
8. Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993;265:L53-6.
9. Sahai A, Mei C, Pattison TA, Tannen RL. Chronic hypoxia induces proliferation of cultured mesangial cells: role of calcium and protein kinase C. *Am J Physiol* 1997;273:F954-60. PMID: 9435685
10. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-50. PMID: 3838314
11. Hadad SJ, Ferreira AT, Oshiro ME, Neri R, Schor N. Alteration of cytosolic calcium induced by angiotensin II and norepinephrine in mesangial cells from diabetic rats. *Kidney Int* 1997;51:87-93. PMID: 8995721 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1997.11>
12. Ford SR, Leach FR. Bioluminescent assay of the guanylates. *Methods Mol Biol* 1998;102:55-68. PMID: 9680609
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75. PMID: 14907713
14. Hampl V, Walters CL, Archer SL. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Feelisch M, Stanler JS, eds. *Methods in Nitric Oxide Research*. Chichester: John Wiley & Sons; 1996. p.310-18.
15. Roszinski S, Jelkmann W. Effect of PO2 on prostaglandin E2 production in renal cell cultures. *Respir Physiol* 1987;70:131-41. PMID: 2445011
16. Hauser CJ, Locke RR, Kao HW, Patterson J, Zipser RD. Visceral surface oxygen tension in experimental colitis in the rabbit. *J Lab Clin Med* 1988;112:68-71.
17. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2199-210. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.ASN.0000079785.13922.F6>
18. Viñas JL, Sola A, Hotter G. Mitochondrial NOS upregulation during renal I/R causes apoptosis in a peroxynitrite-dependent manner. *Kidney Int* 2006;69:1403-9.
19. Bonventre JV. Calcium and calcium-related signalling pathways in glomerular mesangial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:65-70. PMID: 8713498 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb03064.x>
20. Mené P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 1989;69:1347-424. PMID: 2678170
21. Yadav VR, Song T, Joseph L, Mei L, Zheng YM, Wang YX. Important role of PLC-γ1 in hypoxic increase in intracellular calcium in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;304:L143-51.
22. Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 2006;1:405-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100218>
23. Bauerle JD, Grenz A, Kim JH, Lee HT, Eltzschig HK. Adenosine generation and signaling during acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:14-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2009121217>
24. Zager RA, Jurkowitz MS, Merola AJ. Responses of the normal rat kidney to sequential ischemic events. *Am J Physiol* 1985;249:F148-59. PMID: 4014471
25. Craig TJ, Ashcroft FM, Proks P. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *J Gen Physiol* 2008;132:131-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200709874>
26. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998;274:L212-9. PMID: 9486205