

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**IMPACTO DA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA-
REPERFUSÃO NA FIBROSE RENAL E NA DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS
DISTANTES**

SHIRLEY MARIA DE SOUSA

RECIFE
2022

SHIRLEY MARIA DE SOUSA

**IMPACTO DA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA-
REPERFUSÃO NA FIBROSE RENAL E NA DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS
DISTANTES**

Tese apresentada como um dos requisitos para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia, pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

RECIFE
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Sousa, Shirley Maria de

Impacto da lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão na fibrose renal e na disfunção de órgãos distantes / Shirley Maria de Sousa – 2022.

130 f. : il., fig., tab.

Orientador: Leucio Duarte Vieira Filho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2022.

Inclui referências e anexo.

1. Rins- doenças
 2. Isquemia
 3. Estresse oxidativo
- I. Vieira Filho, Leucio Duarte (orient.) II. Título

616.61

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -035

SHIRLEY MARIA DE SOUSA

**IMPACTO DA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA- REPERFUSÃO
NA FIBROSE RENAL E NA DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS DISTANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Recife, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia.

Aprovado em: 30/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Leucio Duarte Vieira Filho
(Titular interno – Presidente – Departamento de Bioquímica da UFPE)

Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa
(Titular interna - Departamento de Bioquímica da UFPE)

Gardenia Carmen Gadelha Militão
(Titular interna - Departamento de Bioquímica da UFPE)

Humberto Muzi-Filho
(Titular externo - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ)

Regina Souza Aires
(Titular externa - Departamento de Fisiologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP)

A minha mãe.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre me guiar pelo caminho correto me dando força nos momentos difíceis. E por toda graça concedida durante esses anos. A **Nossa Senhora Aparecida** por sempre interceder por mim junto ao Pai me dando discernimento e conforto. Nunca deixando que eu abandonasse minha fé diante os desafios.

À **Universidade Federal de Pernambuco** e ao **Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia** por proporcionar a oportunidade da realização do Doutorado, e aos órgãos de fomento **CAPES**, pela concessão da bolsa, **FACEPE** e **CNPq**.

Ao meu orientador, **Leucio Duarte Vieira Filho**, pela oportunidade, paciência, confiança, dedicação a minha pesquisa, pela sua disponibilidade em ensinar e ajudar nos experimentos. O Senhor é um ser diferenciado. Já faz parte da minha história e da realização de um sonho.

A Profa. **Dayane Aparecida Gomes** pelo acesso aos equipamentos localizado em seu laboratório (Plataforma Multiusuário em Biologia Celular e Molecular) e ao **Departamento de Fisiologia e Farmacologia**.

Aos **professores** do Programa, por todos os ensinamentos.

À minha Mãe, **Maria Correia**, pelas orações, por ser meu porto seguro e por ser essa mãe tão presente em todos os momentos importantes da minha vida. Ao meu Pai, **Antônio Amaro**, pelo apoio e por sentir tanto orgulho de mim. A eles sou grata pela pessoa que me tornei, por tudo que conquistei, pelo que ainda serei e conquistarei. A minha irmã, **Vanessa Polyana**, por todo apoio e pela torcida verdadeira pelo meu sucesso. Ao meu esposo, **Fabríciode Mendonça**, por compreender minha ausência em alguns momentos e por todo apoio sempre.

Aos **membros do Laboratório de Fisiopatologia Renal**, por sempre me ajudar e me ensinar quando precisei. Vocês fizeram esta caminhada, muitas vezes difícil, se tornar mais leve e prazerosa.

Por último e não menos importante à **Jeoadã Karollyne**, por sua amizade, por toda ajuda na construção desta pesquisa, pelas palavras de incentivo nos momentos de desespero. Você é muito importante e especial para mim.

Meu sincero agradecimento,

Shirley Maria de Sousa

Até aqui me permitiu o Senhor.

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) pode se estabelecer de maneira rápida, porém é potencialmente reversível. Contudo, quando não controlada e tratada adequadamente, a LRA pode predispor ao desenvolvimento de fibrose renal e favorecer a evolução da injúria para doença renal crônica (DRC). Além disso, a LRA também impacta a função de órgãos distantes, incluindo coração e fígado. O sistema imune e a NADPH oxidase são mediadores de lesão em múltiplos órgãos, e são estimulados pela LRA. Diante disso, investigamos se o tratamento com o imunossupressor e com o inibidor da NADPH oxidase são capazes de prevenir os efeitos da LRA induzida por isquemia reperfusão (IR) na fibrose renal, bem como na lesão de órgãos distantes, como coração e fígado. Ratos Wistar (300-400 g) foram submetidos a LRA induzida por 30 minutos de isquemia renal bilateral seguida de 24h de reperfusão (IR). Esses animais foram divididos em três grupos: um grupo tratado com veículo (IR, n=8); um grupo tratado com o imunossupressor micofenolato de mofetila (MMF) (30 mg/kg de peso corpóreo, via intraperitoneal) (IRM, n=8); e um grupo tratado com o inibidor da NADPH oxidase apocinina (100 mg/kg de peso corpóreo, na água de beber) (IRA, n=8). Um grupo de animais foi submetido a uma simulação da cirurgia (grupo Sham, n=8). Os tratamentos com apocinina e MMF foram administrados em dose única 24 horas antes da IR. A IR renal induziu elevação da deposição renal de colágeno e o conteúdo de α -SMA, reduziu o conteúdo de nefrina, bem como, elevou os marcadores de estresse oxidativo, e aumento a atividade e conteúdo proteico da MMP-2, a atividade da MMP-9 e o conteúdo proteico de TGF- β 1. A IR renal também elevou os marcadores séricos de lesão cardíaca e hepática, desregulou a atividade das ATPases cardíacas transportadoras de Na⁺ e Ca²⁺, e elevou o estresse oxidativo cardíaco e hepático através da inibição de enzimas antioxidantes e ativação da NADPH oxidase. Os tratamentos com MMF e apocinina preveniram a grande maioria das alterações induzidas pela IR renal no rim, coração e fígado. Nossos dados sugerem um papel importante do sistema imune e da NADPH oxidase em mecanismos de deposição de tecido fibrótico mediados pela via TGF- β 1-->MMP-2 e -9, bem como, a importância desses mediadores de lesão na indução da disfunção cardíaca e hepática em quadros de LRA.

Palavras-chave: Apocinina, Isquemia-reperfusão renal, Lesão cardíaca, Lesão hepática, Micofenolato de mofetila.

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) can be established suddenly, but is potentially reversible. When not properly managed, AKI can predispose to the development of renal fibrosis and increase the risk of chronic kidney disease onset. In addition, the AKI also impacts the function of distant organs, including the heart and the liver. The immune system and NADPH oxidase are mediators of multiorgan damage and are stimulated by AKI. Therefore, we investigated whether treatment with the immunosuppressant and the NADPH oxidase inhibitor are able to prevent the effects of ischemia-reperfusion induced AKI on the renal fibrosis, as well as the damage to distant organs, such as the heart and the liver. Wistar rats (300-400 g) underwent AKI induced by 30 minutes of bilateral renal ischemia followed by 24h of reperfusion. The animals were divided into three groups: a vehicle-treated group (n=8); a group treated with the immunosuppressant mycophenolate mofetil (MMF) (30 mg/kg of body weight, intraperitoneally) (n=8); and a group treated with the NADPH oxidase inhibitor apocynin (100 mg/kg body weight, in drinking water) (n=8). One group of animals was submitted to a surgery simulation (Sham group, n=8). The treatments with apocynin and MMF were administered in a single dose 24 hours before IR. The renal IR increased renal collagen deposition and alpha-SMA content, decreased nephrin content, as well as, increased oxidative stress markers, increased MMP-2 activity and protein content, and MMP-9 and TGF- β 1 protein content. The renal IR also elevated serum markers of cardiac and hepatic injury, deregulated the activity of cardiac Na⁺ and Ca²⁺ transporting ATPases, and increased cardiac and hepatic oxidative stress through inhibition of antioxidant enzymes and NADPH oxidase activation. Treatments with MMF and apocynin prevented the vast majority of changes induced by renal IR in the kidney, heart and liver. Our data suggest the important role of the immune system and NADPH oxidase in mechanisms of fibrotic tissue deposition mediated by the TGF- β 1-->MMP-2 and -9 pathway, as well as the importance of these injury mediators in the induction of cardiac and hepatic dysfunction in AKI.

Keywords: Apocynin, Renal ischemia-reperfusion, Cardiac injury, Liver injury, Mycophenolate mofetil.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotranferase
ATP	Adenosina trifosfato
AEC	Acoplamento excitação-contração
CAT	Catalase
Ca ²⁺	Cálcio
CMs	Células mesangiais
CL-11	Colectina-11
CK	Creatina kinase
COL I	Colágeno I
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DRC	Doença renal crônica
DHE	Dihidroetídio
DRT	Doença renal terminal
DOUX1	Dupla oxidase 1
DOUX2	Dupla oxidase 2
EMT	Transição epitélio-mesênquima, do Inglês: <i>epithelialmesenchymal transition</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
EROS	Espécies reativas de oxigênio
eNOS	NOS endotelial
TNFs	Fatores de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
GFs	Fatores de crescimento
GSH	Glutationa reduzida
GPx	Glutationa peroxidase

GSK3 β	Glicogênio sintase quinase-3 β
HIF	Fator induzível por hipóxia
HO2-	Radicais hidroperoxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
iNOS	NOS indutível
IR	Isquemia/ reperfusão
LRA	Lesão renal aguda
LRC	Lesão renal crônica
MDA	Malondialdeído
MCPs	Proteínas quimioatraentes de monócitos
MEC	Matriz extracelular
MMF	Micofenolato de mofetila
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MPO	Mieloperoxidase
Na ⁺	Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
nNOS	NOS neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase

NOX	NADPH oxidase
OH	Radical hidroxila
O ₂	Superóxido
O ₂ ⁻	Ânions superóxidos
PA	Potencial de ação
PGI ₂	Prostaciclina
PGE ₁	Prostaglandina E1
PLB	Fosfolambano
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptores de ryanodina
SOD	Superóxido dismutase
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF-β	Fator de crescimento transformante β, do Inglês: <i>Transforming growth factor beta</i>
TLRs	Receptores toll-like
TIMP-1	Inibidor tecidual da metaloproteinase 9, do Inglês: <i>tissue inhibitors of metalloproteinases 1</i>
TIMP-2	Inibidor tecidual da metaloproteinase 2, do Inglês: <i>tissue inhibitors of metalloproteinases 2</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRX	Tioredoxina
α-SMA	α-Actina de músculo liso, do Inglês: <i>Alpha-smooth muscle actin</i>
XDH	Xantina desidrogenase
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	LESÃO RENAL AGUDA (LRA).....	16
2.1.1	Classificação da LRA.....	19
2.2	ISQUEMIA/ REPERCUSSÃO	21
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	24
2.3.1	NADPH oxidase	27
2.3.1.1	NADPH oxidase e apocinina.....	29
2.4	SISTEMA IMUNE.....	32
2.4.1	Sistema imune e micofenolato de mofetila (MMF).....	35
2.5	FIBROSE RENAL.....	36
2.5.1	Metaloproteinase de matriz e regulação da deposição de matriz extracelular.....	39
2.6	IMPACTO DA LRA EM ÓRGÃOSDISTANTES.....	42
2.6.1	Coração.....	44
2.6.1.1	Síndrome cardiorenal.....	43
2.6.1.2	Alterações da função cardíaca derivadas de perturbações do balanço de Ca ²⁺	46
2.6.2	Fígado.....	48
2.6.2.1	Fígado x modulação do balanço oxidativo sistêmico.....	51
3	JUSTIFICATIVA.....	54
4	OBJETIVOS.....	55
4.1	OBJETIVO GERAL.....	55
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
5	REFERÊNCIAS.....	56
6	RESULTADOS	80
6.1	MANUSCRITO 1.....	80

6.2	MANUSCRITO 2.....	108
7	CONCLUSÕES.....	129
	ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética.....	130

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as doenças não-transmissíveis compõem 7 das 10 principais causas de morte no mundo. Dentre elas, as doenças cardíacas representam 16% do total de mortes por todas as causas, compondo 32% de todas as mortes globais, onde mais de 75% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda. Estima-se que 1,28 bilhão de adultos com idades entre 30 e 79 anos em todo o mundo tenham hipertensão e a maioria também são de países de baixa e média renda. Dessa forma, a hipertensão representa 9,4 milhões de mortes anuais por doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais (OMS, 2019; WHO, 2021). A pressão arterial está intimamente relacionada a função renal, onde cerca de 80% dos pacientes com doença renal crônica (DRC) desenvolvem hipertensão (SANTOS et al., 2012), passando a ser o maior fator de risco para a progressão da doença renal (PALM e NORDQUIST, 2011).

A lesão renal aguda (LRA) pode se estabelecer de maneira rápida, com diminuição da função renal e acúmulo de compostos nitrogenados na circulação (SINGH et al., 2012), porém potencialmente reversível. Todavia, quando não controlada e tratada adequadamente, a LRA pode evoluir para DRC, ou mesmo quando ocorre restabelecimento da função renal, alterações mais suaves podem persistir, e ao longo do tempo evoluírem com o desenvolvimento de DRC (HEUNG e CHAWLA, 2012; CHAWLA e KIMMEL, 2012).

Vários fatores estão envolvidos em alterações agudas da função renal, sobretudo por indução de situações de instabilidade hemodinâmica. Intervenções cirúrgicas de reparação, transplante renal, administração de contraste, parada cardíaca, choque hipovolêmico, são todas alterações hemodinâmicas que podem induzir importantes danos no tecido renal através da indução de isquemia. A reperfusão por sua vez promove o surgimento de alterações com padrão diferente da isquemia, mas que potencializa a necrose e apoptose tubular, sobretudo por estimulação de fatores inflamatórios (YAP e LEE, 2012).

O desenvolvimento de fibrose renal é uma importante alteração na lesão renal (LEE et al., 2014). A fibrose renal é caracterizada pelo acúmulo exagerado de matriz extracelular (MEC), que por sua vez, pode decorrer de sua maior produção ou menor degradação. Os fibroblastos no interstício e as células mesangiais glomerulares são as principais células produtoras de MEC, enquanto que a degradação da MEC no rim é realizada, sobretudo, pelas metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e 9), que são

produzidas pelas células mesangiais (MARTIN et al., 2001). No qual a citocina pró-fibrótica TGF- β (transforming growth factor beta) apresenta ação central na regulação desse processo (BADID et al., 2000).

A LRA também tem sido associada a lesões em órgãos distantes. A LRA aumenta o risco de surgimento de disfunção cardíaca, por meio de sobrecarga de volume, acidose metabólica, distúrbios eletrolíticos, entre outros mecanismos (DI LULLO et al., 2019). A disfunção hepática similarmente é fortemente observada em pacientes críticos com LRA (ZARBOCK et al., 2006). Diversos estudos demonstraram o surgimento de lesões hepáticas em pacientes com LRA, eles apresentavam alterações na síntese proteica, aumento de respostas inflamatórias, alterações no metabolismo de lipídios, proteínas e de alguns fármacos (VILAY, et al., 2008; LANE, et al., 2013).

A ativação exacerbada do sistema imune e da produção de espécies reativas do oxigênio mediada pela NADPH oxidase são dois fatores associadas à lesão em diversos tecidos, incluindo rim, coração e fígado. A ativação do sistema imune tem sido atrelada a severidade e a piora do prognóstico da LRA (BERRY e CLATWOTHY, 2012). Além disso, a ativação de células imunes está vinculada a elevação do estresse oxidativo (WANG et al., 2013), como também a terapia antioxidante atenua a ativação do sistema imune (CACH et al., 2015), indicando o caráter modulatório recíproco entre os dois fatores patogênicos.

Considerando esses dados, a IR renal é um fator de risco para o desenvolvimento tardio de hipertensão e doença renal crônica, que pode ser decorrente de alterações na regulação da deposição de MEC dependentes da sinalização de NADPH oxidase-->TGF- β 1-->MMPs e modulação do sistema imune. Além disso, a IR renal também é um fator de risco para a indução de lesões em órgãos distantes, incluindo coração e fígado, através de perturbações do balanço redox. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar, em ratos, o impacto da IR renal sobre mecanismos modulatórios da deposição de MEC dependentes da via TGF- β 1-->MMPs, bem como, investigar o impacto dessa lesão sobre o balanço redox cardíaco e hepático, e a função das ATPases cardíacas. Adicionalmente, considerando o papel do sistema imune e da NADPH oxidase na indução de lesão renal, hepática e cardíaca, estudamos o impacto do tratamento com inibidor da NADPH oxidase, apocinina, e de um imunossupressor, micofenolato de mofetila, sobre as alterações induzidas pela IR renal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Lesão renal aguda

A doença renal crônica (DRC) ou lesão renal aguda (LRA), possui incidência crescente, sendo considerado um problema de saúde pública mundial, de desfechos desfavoráveis e alto custo (LEVEY et al., 2003). A DRC é um termo geral para distúrbios heterogêneos que afetam a estrutura e função do rim progressivamente. Por outro lado, a LRA é caracterizada pelo declínio abrupto da taxa de filtração glomerular, o que leva ao acúmulo de ureia e outras substâncias químicas no sangue (LEVEY e CORESH, 2012; KELLUM, UNRUH, MURUGAN, 2011). Esses acúmulos podem ser acompanhados de distúrbios metabólicos (como a acidose metabólica e hipercalemia), alterações no equilíbrio de fluidos e efeitos em outros sistemas, que irão depender da gravidade e duração da disfunção renal (SINGRI, AHJA e LEVIN, 2003).

Considera-se que 1,7 milhão morrem anualmente por conta de LRA, sendo diabetes e hipertensão, fatores comportamentais e estilo de vida, importantes fatores de risco. A LRA pode ocorrer em 8-16% das internações hospitalares (SAWHNEY et al., 2017) contribuindo para um aumento de custos com despesas hospitalares (WEHBE et al., 2012). Dessas internações hospitalares por insuficiência renal no Brasil foi visto que a maioria está entre 50 e 69 anos, (Figura 1), sendo predominante no sexo masculino (Figura 2), sendo mais prevalente entre pardos e brancos (Figura 3) (SOUZA, 2020; DATASUS, 2020). Em países desenvolvidos, cerca de 15% dos pacientes adultos hospitalizados estão internados em unidades de terapia intensiva (UCHINO et al., 2005; GUIDELINES, 2017), e desses pacientes, 6% desenvolvem complicações que representam fatores de risco um dano renal permanente (ROCHA et al., 2005; WEHBE et al., 2012; HEUNG et al., 2016; SIKMA et al., 2017).

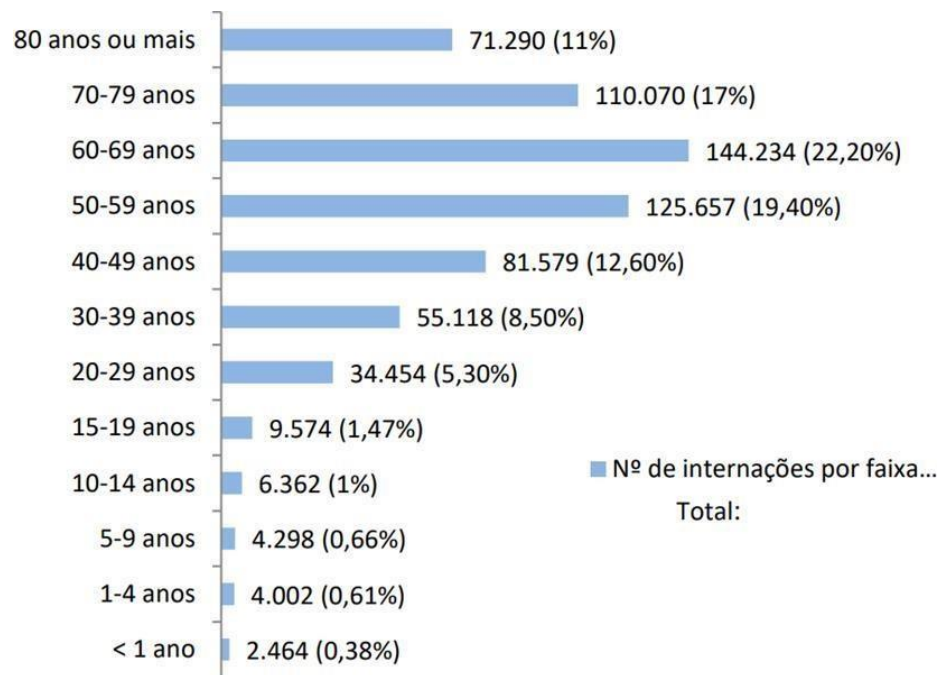


Figura 1. Internações por insuficiência renal no Brasil dividida de acordo com a faixa etária, no período de 2014 a 2019. Fonte: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), 2020. Adaptado de SOUZA, (2020).

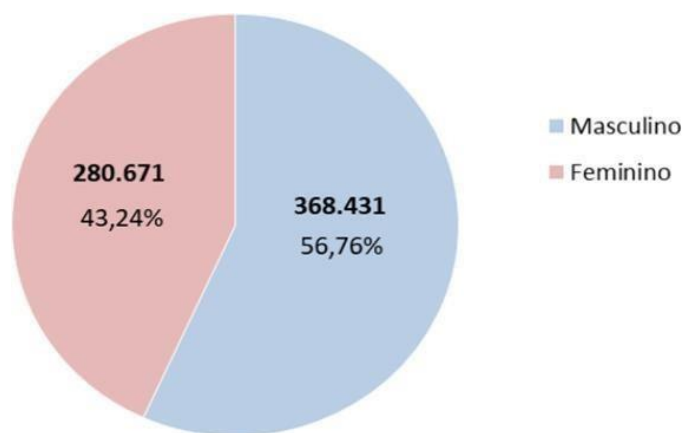


Figura 2. Internações por insuficiência renal no Brasil dividida por gênero, no período de 2014 a 2019. Fonte: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), 2020. Adaptado de SOUZA, (2020).

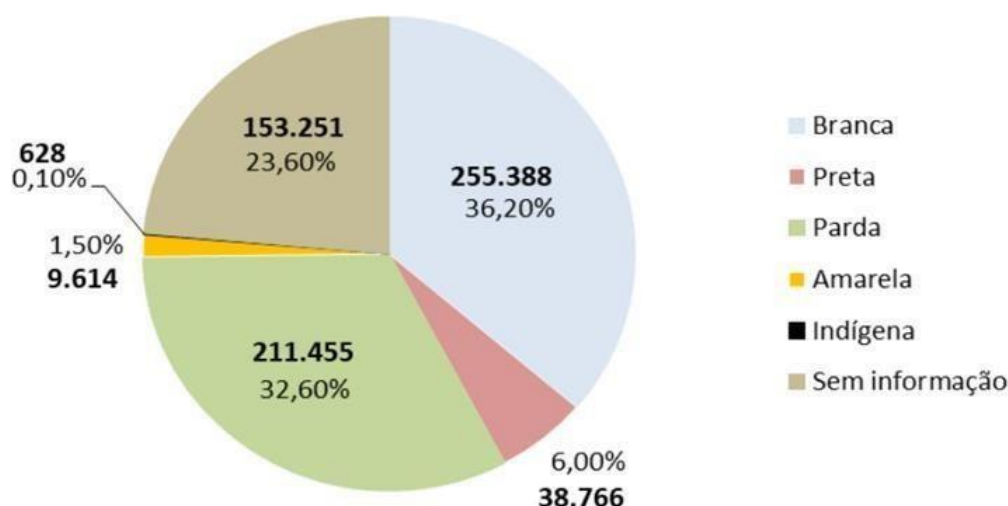


Figura 3. Internações por insuficiência renal no Brasil dividida por raça/cor, no período de 2014 a 2019. Fonte: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), 2020. Adaptado de SOUZA, (2020).

A LRA está associada à alta morbidade, mortalidade e custos de saúde. Além da diálise, nenhuma intervenção terapêutica melhora a sobrevida de forma confiável, limita a lesão ou acelera a recuperação, embora algumas intervenções farmacológicas direcionadas a mecanismos específicos tenham sido promissoras em modelos experimentais (ZUK e BONVENTRE, 2016). Por muito tempo, a LRA foi considerada uma síndrome completamente reversível, entretanto, nos últimos anos, estudos demonstraram um aumento na indução de DRC e danos em órgãos não renais ocasionados pela LRA (COCA, SINGANAMALA, PARIKH, 2012).

Também foi observado a ocorrência de LRA secundária à lesão de outros órgãos e outras doenças não-renais. Cerca de 65% de pacientes submetidos a transplante de pulmão desenvolvem LRA no pós-operatório (WEHBE et al., 2012; CARILLO et al., 2017) e os principais motivos são hipotensão arterial, baixo débito cardíaco, hipertensão pulmonar, circulação extracorpórea e hemorragia grave (ROCHA et al., 2005; SIKMA et al., 2017). Além disso, em pacientes submetido a cirurgia cardíaca, mesmo uma pequena alteração na função renal está relacionada ao alto risco de LRA (WILSON et al., 2016) e a alta mortalidade (OGURI et al., 2015), assim como histórico de hipertensão anterior da gravidez está relacionado ao surgimento de LRA e altas taxas de morbimortalidade materna neonatal (PRAKASH et al., 2018; CONTI-RAMSDEN, et al., 2019). Nos últimos dois anos durante a pandemia de COVID-19 A LRA também é

frequente em pacientes hospitalizados com COVID-19, sendo um fator de risco para um pior prognóstico (HIRSCH et al., 2020).

Classificação da LRA

A gravidade da LRA pode ser categorizada através de diversos critérios. Uma das primeiras classificações utilizada foi a *RIFLE*, que categoriza em: *Risk* (risco de disfunção renal); *Injury* (injúria/lesão para o rim); *Failure* (falência da função renal); *Loss* (perda da função renal) e *end-stage renal disease* (doença renal em estágio terminal) (Figura 5). A gravidade da lesão renal é dada por alterações do nível sérico da creatinina ou na taxa de filtração glomerular (TFG) e na redução da medida do fluxo urinário calculado por quilo de peso em um determinado tempo (RICCI, CRUZ, RONCO, 2008; BAGSHAW et al., 2008; BAGSHAW et al., 2010).

Classificação RIFLE	Critério TFG	Critério débito urinário
Risco (Risk)	Aumento SCr x1,5 ou diminuição da TFG > 25%	Diurese < 0,5 ml/Kq/h em 6h
Injúria (Injury)	Aumento SCr x2 ou diminuição da TFG > 50%	Diurese < 0,5 ml/Kq/h em 12h
Falência (Failure)	Aumento SCr x3 ou diminuição da TFG > 75% ou SCr > 4 mg/dl	Diurese < 0,3 ml/Kq/h em 24h ou anúria por 24h
Perda de Função renal (Loss)	Perda completa da função renal por > 4 semanas	
Estágio final de doença renal (End-stage kidney disease)	Necessidade de diálise por > 3 meses	

Figura 5. Classificação de RIFLE. RIFLE *Risk*, *Injury*, *Failure*, TGF: Taxa de filtração glomerular, SCr: creatinina sérica. Fonte: Ricci, Z.; Cruz, D.; Ronco, C. The RIFLE criteria and morality in acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int*, v. 73, n. 5, p. 538-546, 2008.

Posteriormente a classificação de *RIFLE* foi modificada pela *AKIN* (*Acute Kidney Injury Network*) também de acordo com a elevação de creatinina sérica em relação ao volume urinário (Figura 6) (MEHTA et al., 2007; Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007).

Estágios	Creatinina sérica	Diurese
Estágio 1	Aumento de 0,3 mg/dl ou aumento de 150-200% do valor basal (1,5 a 2 vezes)	< 0,5 ml/Kg/h por 6 horas
Estágio 2	Aumento > 200-300% do valor basal (> 2-3 vezes)	< 0,5 ml/Kg/h por > 12 horas
Estágio 3	Aumento > 300% do valor basal (> 3 vezes ou Cr sérica $\geq$ 4,0 mg/dl com aumento agudo de pelo menos 0,5 mg/dl)	< 0,3 ml/Kg/h por 24 horas ou anúria por 12 horas

Figura 6. Definição e classificação da IRA. Somente um dos critérios Cr (creatinina) ou diurese pode ser utilizado para inclusão no estágio. Pacientes que necessitem de diálise são considerados estágio 3, independente do estágio em que se encontravam no início da terapia dialítica. Fonte: Sociedade Brasileira de Nefrologia. Diretrizes da AMB.Comitê de Insuficiência Renal Aguda da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007.

As causas de LRA podem ser divididas em três classes: pré-renal, intrínseca e pós-renal. Na forma pré-renal, ocorre um aumento reversível dos níveis de creatinina sérica e de ureia no sangue, isso resulta da diminuição da perfusão renal, levando a uma redução na TFG (LAMEIRE, VAN BIESEN e VANHOLDE, 2005). A integridade do tecido renal é preservada, e uma resposta fisiológica adequada à hipoperfusão renal é a redução do volume circulante efetivo, como baixo débito cardíaco, vasodilatação sistêmica, ou vasoconstrição intrarrenal (BLANTZ, 1998). O rim responde a alterações na pressão de perfusão renal, autoregulando o fluxo sanguíneo renal e a TFG dentro de limites bastante estreitos (LAMEIRE, VAN BIESEN e VANHOLDE, 2005).

A principal causa de LRA intrínseca ao rim é a necrose tubular aguda. Esse distúrbio é causado por lesão isquêmica ou nefrotóxica no rim, que pode resultar de vários insultos renais distintos (LAMEIRE, VAN BIESEN e VANHOLDE, 2005). Nas unidades de terapia intensiva, 35-50% dos casos podem ser atribuídos à sepse (HOSTE et al., 2003). Várias classes de agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antineoplásicos são nefrotóxicos (BACH, 2001; DILLON, 2001; EVENEPOEL, 2004). Além disso, alguns agentes ambientais e drogas recreativas podem causar insuficiência renal aguda (TURNERY, 2001). A LRA pós-renal ocorre devido a uma obstrução no sistema urinário. Consequências importantes são a diurese e a presença de acidose tubular renal hipercalêmica (YARGER, 1992).

Isquemia/reperfusão

A lesão de isquemia/reperfusão (IR) é caracterizada pela restrição do suprimento sanguíneo para um órgão, seguida pela restauração do fluxo sanguíneo e re-oxigenação (BREZIS e ROSEN, 1995). As lesões podem ocorrer após infarto, sepse e transplante de órgãos, e esse fenômeno agrava o dano tecidual ao iniciar uma cascata inflamatória, incluindo ativação de espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas, quimiocinas e leucócitos (JANG e RABB, 2009).

Os rins lesionados por isquemia manifestam uma variedade de deficiências funcionais, destacando-se o comprometimento da reabsorção tubular de solutos e água (HANLEY, 1980; JOHNSTON, RENNKE e LEVINSKY, 1984). A isquemia altera de maneira importante a função e a estrutura de células epiteliais tubulares, podendo ocorrer necrose dessas células (ZAPPITELLI, 2008), inflamação intersticial e microvasculopatia intersticial (Figura 7) (PATSHAN; PATSHAN e MULLER, 2012).

Em geral, 25% do débito cardíaco é direcionado para os rins. Por não possuir distribuição uniforme do fluxo sanguíneo, maior parte é direcionada para o córtex renal. Por outro lado, na medula externa, a troca de oxigênio em contracorrente leva a uma queda progressiva da pressão parcial do oxigênio (pO_2) do córtex para medula (BREZIS e ROSEN, 1995). Na isquemia renal, o fluxo sanguíneo renal diminui de 30-50%, com evidências de uma redução seletiva no suprimento sanguíneo para a medula externa (LAMEIRE, VAN BIESEN e VANHOLDE, 2005).

O eixo hipoxantina é um dos mais importantes formadores de EROs ligados a IR, tornando-se um mecanismo dessa lesão. Por esse fato uma intervenção nesse eixo pode reduzir estresse oxidativo (PRIETO-MOURE et al., 2014). A inibição da xantina oxidase tem efeitos benéficos sobre a lesão isquêmica no rim (TSUDA et al., 2012; HAGA et al., 2017) e no tecido cardíaco (TSUDA et al., 2012; HAGA et al., 2017). O processo de hipóxia induz um desequilíbrio na homeostasia de cálcio ativando proteases intracelulares, transformando a xantina desidrogenase em xantina oxidase. Sendo essa última responsável pela catálise da reação entre o oxigênio e a hipoxantina, no decorrer do processo de reperfusão, originando o ácido úrico e tendo como produto o superóxido e o peróxido de hidrogênio (BERRY e HARY, 2004). A xantina desidrogenase atua nesses mesmos substratos, porém utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) como cofator para produzir NADH. Uma outra via do envolvimento da xantina oxidase

(XOD) em lesão tecidual como as causada por isquemia é um sinergismo do superóxido, um produto tóxico da xantina oxidase, e o óxido nítrico (Figura 8) (CHUNG et al., 1997).

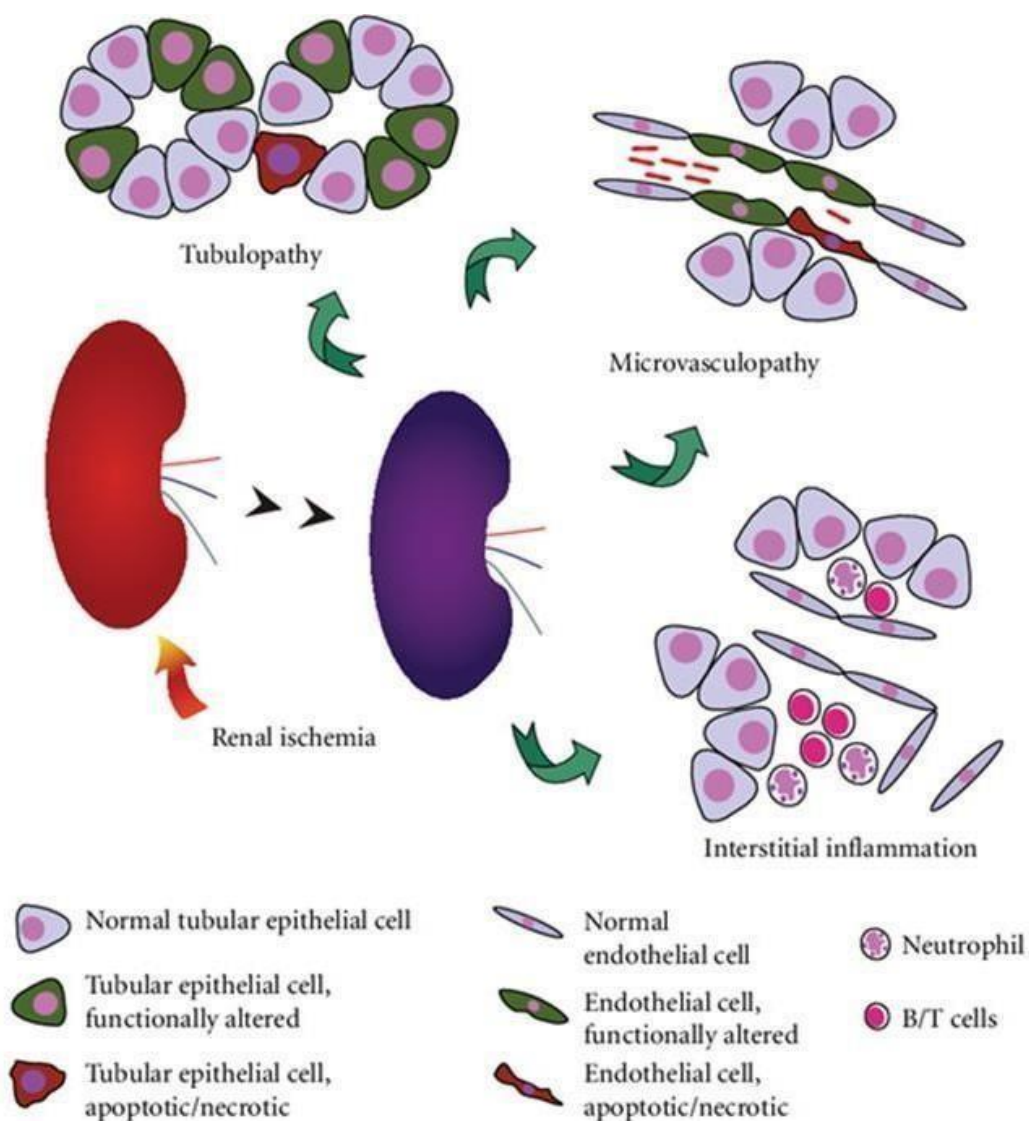


Figura7. A insuficiência renal isquêmica aguda é caracterizada por disfunção e lesão das células epiteliais tubulares. Após o evento da isquemia a restauração da função e estrutura renal depende da inflamação intersticial e da microvasculopatia peritubular.

Fonte: Patschan, D.; Patschan, S.; Muller, G.A. Inflammation and Microvasculopathy in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Transplantation*, v. 2012, p. 7, 2012.

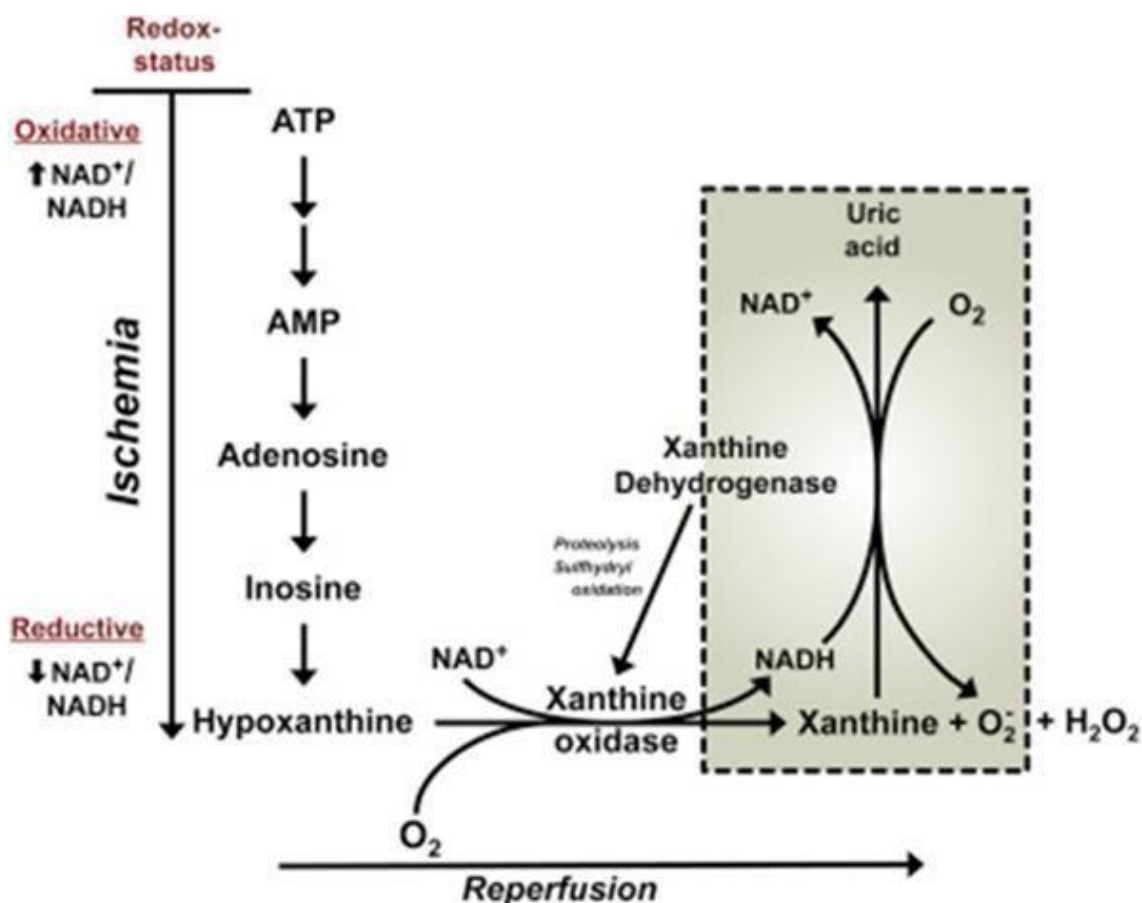


Figura 8. Mecanismos de produção de EROs por xantina oxidoreductase (XOR) em tecidos expostos a IR. Na isquemia, o ATP é catabolizado em hipoxantina e a forma desidrogenase (XDH) de XOR é convertida, por meio de proteólise e oxidação de sulfidril, na forma de xantina oxidase (XO). Após a reperusão, o tecido restaurado reage com hipoxantina e XO para gerar O₂⁻ e H₂O₂, que podem consequentemente interagir para produzir espécies reativas. A conversão de XDH em XO pode não ser necessária para a produção de EROs após a reperusão. Durante a isquemia, o estado redox do tecido é alterado de um estado oxidativo (nível mais alto de NAD⁺ em relação ao NADH) para um estado redutor (NADH em relação a NAD⁺). Fonte: Granger, D.N.; Kvietys, P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, v. 6, p.524-551, 2015.

Níveis elevados de NADH e hipoxantina durante o processo de isquemia, são responsáveis por uma importante via de produção de EROs por xantina oxidase após IR renal. O NADH atua inibindo a xantina desidrogenase (XDH), não causadora de EROs, convertendo para XOD, a forma produtora de EROs, elevando a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da degradação de hipoxantina e xantina pela XOD (FUJII et al., 2019).

Dentre algumas alterações ocasionadas pela isquemia, percebe-se um encolhimento dos lúmens tubulares decorrente do inchaço das células do epitélio tubular. Após o restabelecimento do fluxo sanguíneo, estas se recuperam gradualmente (ANDREWS, 2008). Outras alterações encontradas na IR, podemos destacar a

aglomeruloesclerose, a fibrose intersticial, a perda endotelial, o dano tubulointersticial (inflamação, formação de fibrose, necrose e apoptose) e o espessamento da cápsula glomerular (KHALID, 2015; GAI, 2017).

Estresse oxidativo e antioxidantes

As substâncias oxidantes possuem átomos de oxigênio com elétrons desemparelhados. Nesse ciclo podem ser gerados ânions superóxidos (O_2^-), radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroperoxila (O_2H) que são EROs (ALZOGHAIBI, 2013). O estresse oxidativo presente na fisiopatologia da IR (CHAMORRO et al., 2016), pode ser decorrente da produção excessiva de EROs, como também da redução nas defesas antioxidantes ou até mesmo por uma elevação da produção de EROs e uma redução nas defesas antioxidantes simultaneamente (Figura 9) (ALZOGHAIBI, 2013; BARDAWEEL et al., 2018). Esses fenômenos podem ocorrer nas células e nos tecidos (KOVACIC et al., 2015; RODRÍGUEZ-LARA et al., 2016; RANJBAR et al., 2018).

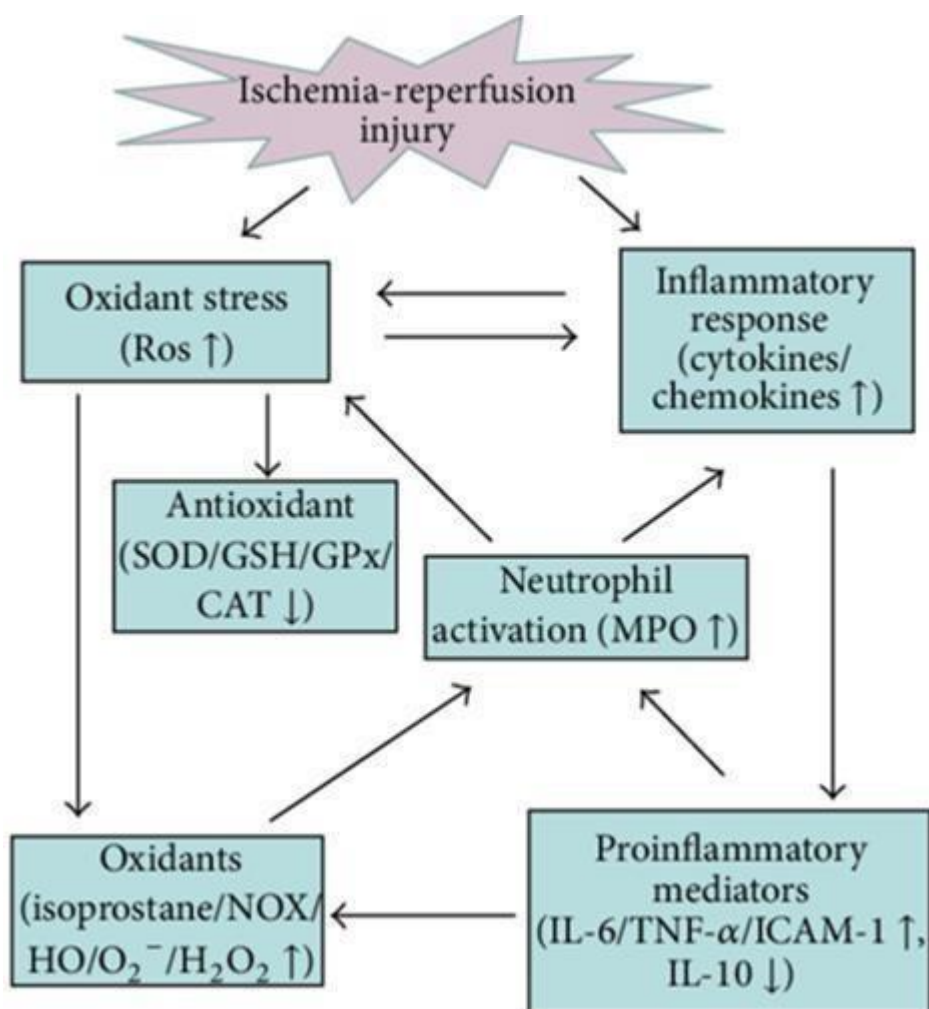


Figura 9. Lesão de IR mediada pelo estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser decorrente da produção excessiva de EROs, da redução nas defesas antioxidantes, como também por uma variedade de citocinas envolvidas na resposta inflamatória. ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GSH, glutathiona reduzida; GPx, glutathiona peroxidase; NOX, NADPH oxidase; ânion superóxido; HO⁻, radical hidroxila; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; TNF- α , fator de necrose tumoral α ; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; MPO, mieloperoxidase. Fonte: Liu, F.C.; Tsai, H.; Yu, H.P. Organ-Protective Effects of Red Wine Extract, Resveratrol, in Oxidative Stress-Mediated Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 5, n. 568634, 2015. (adaptado)

O mecanismo fundamental de estresse oxidativo dos túbulos renais na fase de isquemia ocorre inicialmente pela depleção de ATP através da ativação das caspases, fosfolipases e aumento do cálcio intracelular causando morte celular (BONVENTRE, 1993; DEVARAJAN, 2006; KOVACIC, 2015; RODRÍGUEZ-LARA et al., 2016; KESIK et al., 2016; PARADIS et al., 2016). A isquemia prolongada seguida de reperusão reduz a ativação de apoptose celular por necrose, porém causa lesão oxidativa e modificações proteicas, principalmente pela via da hipoxantina. Já o superóxido reage com óxido nítrico formando peroxinitrito que através da nitrosilação e

nitração de proteínas e sua capacidade de oxidação causa danos nas células (DEVARAJAN,2006).

O estresse oxidativo contribui para a apoptose e morte celular (BONVENTRE, 1993; MURALIKRISHNA e HATCHER, 2006; KURIAN et al, 2016). Induz apoptose das células hepáticas e disfunção hepática após transplante de fígado (YAO et al., 2017). Outras vias pelas quais o estresse oxidativo pode surgir é a via da xantina oxidase por deficiência de adenosina trifosfato (ATP),re-oxigenação, pela via da NADPH oxidase bem como por aumento de óxido nítrico que pode reagir com EROs produzindo peroxinitrito causando assim lesão tecidual (YAMAMOTO et al., 2017).

Durante a reperusão, o restabelecimento do fluxo sanguíneo inicia-se com uma série de alterações deletérias nas células, resultando em inflamação, morte celular e insuficiência orgânica. A ativação da produção de EROs e de espécies reativas de nitrogênio alteram várias estruturas inclusive as mitocôndrias (BONVENTRE, 1993; RODRÍGUEZ-LARA et al., 2016), sendo essa a principal fonte de estresse oxidativo após um evento de isquemia e reperusão (MALEK e MEHDI, 2015). Enfatizando o papel da mitocôndria, Chouchani e colaboradores (2016) revelaram que o succinato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico na mitocôndria, apresentou-se elevado nos tecidos isquêmicos e o aumento dessa molécula é responsável pela produção de EROs mitocondrial durante a reperusão. Dessa forma a peroxidação lipídica causa danos celulares por meio da sua ação em ácidos graxos insaturados que estão nas membranas, bem como quebra de DNA, danifica a estrutura e função das proteínas e dos ácidos nucleicos. Surgindo como uma das principais vias de lesões (BONVENTRE, 1993; LI e JACKSON, 2002;ALZOGHAIBI, 2013; AYALA, MUÑOZ e ARGÜELLES, 2014; GUO, 2019).

Por outro lado, para manter o equilíbrio entre a produção de EROs, as moléculas antioxidantes são as responsáveis pela doação de elétrons, com o intuito de combater sua formação em demasia. Para que haja um equilíbrio, esse sistema de defesa vai atuar eliminando as EROs ou impedindo que ele se transforme em substâncias mais tóxicas para o organismo, as vias antioxidantes podem ser enzimáticas, que são as produzidas pelo organismo como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina (TRX) e as não enzimáticas, que podem ser de origem endógena ou proveniente da dieta como glutathione, flavonóides, vitaminas, minerais, entre outros (RATNAM et al., 2006; HE et al., 2017).

A inibição do estresse oxidativo com melatonina, um antioxidante, atenuou a LRA causada pela isquemia em ratos diabéticos, melhorando a apoptose e o estresse oxidativo através da sinalização do SIRT1 / Nrf2 / HO-1. Isso torna a melatonina uma droga terapêutica em potencial, especialmente sob a condição de IR (SHI et al., 2019). Também no tecido renal a IR levou ao aumento dos níveis de malondialdeído e o tratamento com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo reduz esses níveis, o dano tecidual e o estresse oxidativo, aumentando a atividade antioxidante e melhorando a função renal (HAFAZEY et al., 2019). Recentemente Fatih Kar e colaboradores (2020) verificaram uma elevação de peroxidação lipídica, causado pela IR renal e o ácido bórico foi capaz de reduzir as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH.

Estudos anteriores também demonstraram que em outros tecidos ocorre semelhantemente, alterações nos indicadores de estresse oxidativo e nas enzimas antioxidantes. Em dez minutos de isquemia cerebral seguidos por 24 horas de reperfusão houve um aumento de peroxidação lipídica, ânion superóxido e redução da glutathione reduzida, onde a suplementação com vitamina D3 reverteu esses resultados, mostrando a importância da suplementação correta da vitamina D3 na melhoria da lesão causada por IR (VELIMIROVIC et al., 2018). Resultados também encontrados no mesmo modelo sendo no tecido cardíaco constataram um aumento da expressão de MDA, indicativo de peroxidação lipídica, e redução das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) e a alicina foi capaz de reduzir a lesão miocárdica e peroxidação lipídica regulando positivamente as enzimas antioxidantes (LIU, 2019).

NADPH oxidase

Entre as funções fisiológicas da NADPH oxidase estão, defesa contra microrganismos, sinalização celular, regulação da expressão gênica e diferenciação celular, regulação do fluxo sanguíneo (ASABA et al., 2005; GRANGER e KVIETYS, 2015), entretanto podem ser mediadores críticos de diversas doenças quando ocorre uma elevação na sua atividade (ASABA et al., 2005). A NOX exerce função na produção de ânion superóxido e EROs, lesionando células e tecidos, iniciando assim uma cascata de sinalização danosa no organismo (BRITO et al., 2015; RASTOGI et al., 2017; HSU et al., 2018; JOSHI e KHAN, 2019).

Alterações na NADPH oxidase estão presente em inúmeras doenças incluindo doença renal crônica, câncer de pâncreas, hipertensão, fibrose cística, doença de Parkinson, fibrose pulmonar, lesão pulmonar aguda, doenças do sistema imunológico (MA et al., 2017), doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca e hipertensão (LI et al., 2002) e lesões por IR (CIFUENTES-PAGANO, MEIJLES e PAGANO, 2014). Desse modo, a inibição da NOX torna-se um tratamento terapêutico promissor para diversas doenças (BRITO et al., 2015; RASTOGI, et al., 2017; HSU et al., 2018; JOSHI e KHAN, 2019), porém o tratamento ideal precisa ter seletividade, uma toxicidade favorável e ser biodisponível (ALTENHOFER et al., 2015).

A enzima da NADPH oxidase possui as subunidades no citoplasma p47-phox, p67-phox, p40-phox (MA et al., 2017; RASTOGI, et al., 2017). Suas isoformas NOX1 (homóloga a NOX2) (JHA et al., 2016), NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DOUX1 e DOUX2. A ativação dessa enzima implica primeiramente na fosforilação da p47phox interagindo assim com a gp91phox. A ligação entre domínios homólogos de duas estruturas Src auto inibem a ligação com a p22phox. Essa interação auto inibitória é perdida na fosforilação, possibilitando a ligação entre as subunidades p47phox e p22phox, ativando a NADPH oxidase (RASTOGI, et al., 2017). A ativação de Nox4 também requer a interação com p22^{phox}, contudo não necessita da subunidade reguladora citosólica para produzir EROs. O NOX5 é ativado com o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e não precisa de outras subunidades para ser ativada (JHA et al., 2016). As isoformas NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5 encontram-se nos vasos renais, nas células glomerulares mesangiais, nos podócitos, na mácula densa, no ramo ascendente, no túbulo distal e nos ductos coletores (GORIN e BLOCK, 2013; GRANGER e KVIETYS, 2015; TUO et al., 2017). A NOX4 é a isoforma maioritariamente expressa no epitélio tubular (LIU et al., 2015).

Alguns fatores influenciam a produção de EROs nos rins que pode ser aumentada por meio da ativação do complexo NADPH oxidase com a influência de alguns fatores como a IR (CIFUENTES-PAGANO, MEIJLES e PAGANO, 2014), a ativação do receptor AT1 pela angiotensina II, a hiperglicemia e o TGF- β (JHA et al., 2016).

Milica Velimirovic (2018) constatou que dez minutos de isquemia cerebral seguida por 24 horas de reperfusão resultou em modificações na expressão de NOX2, sugerindo assim o envolvimento dessa enzima com o aumento de estresse oxidativo

(NISHIMURA et al., 2016; MA, 2017). O tratamento com vitamina D3 antes da IR foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e as expressões de NOX2.

A ativação da NADPH oxidase também está relacionada com disfunções vasculares e renais em um modelo de programação intrauterina (VIEIRA et al., 2018). Em um estudo com humanos com cirrose hepática, foram encontrados sítios de NOX4 no fígado o que foi associado a progressão da fibrose (LAN, KISSELEVA e BRENNER et al. 2015; BETTAIEB et al. 2015; CAI et al., 2016; LUANGMONKONG, 2018). Lesões no sistema vascular pode ter início com alterações no equilíbrio oxidativo, estando a NOX como a principal fonte de EROs na parede do vaso e possivelmente desempenha um papel fundamental na origem de doenças causadas pela aterosclerose (BRYK, OLEJARZ e ZAPOLSKA-DOWNAR, 2017).

Houve uma regulação positiva da NOX2 e NOX4 em ratos hiperglicêmicos após IR cerebral, e o tratamento com o inibidor da NOX conseguiu prevenir os danos causados pela reperfusão (TUO et al., 2017). Utilizando um inibidor da NADPH oxidase houve proteção do cérebro proveniente da lesão oxidativa por IR, relacionando-se a redução da produção de EROs (LOU, 2015).

NADPH oxidase e apocinina

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), igualmente conhecida como acetovanilona, é um inibidor não tóxico da NADPH oxidase em células fagocíticas e não-fagocíticas (HART et al., 1990; LAFEVER et al., 1999, COSTA et al., 2009; TUO et al., 2017). Foi descrita por Schmiedeberg pela primeira vez em 1883, da raiz da planta *Apocynum cannabinum*, conhecida como maconha canadense. Em 1971, foi isolada da raiz de *Picrorhiza kurrooa* (HOUGEE, 2006; LUCHTEFELD et al., 2008), bem utilizada na medicina tradicional indiana como um potente antioxidante e anti-inflamatório (HU et al., 2017).

O mecanismo de ação da apocinina ainda não está totalmente esclarecido (STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008; HU et al., 2017), contudo sabe-se que ela inibe a NADPH oxidase impedindo a translocação da p47phox do citosol para a membrana, em leucócitos, monócitos e células endoteliais (STOLK et al., 1994; JOHNSON, et al., 2002; STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008). Como ela é uma pró-droga, para inibir a NADPH oxidase é necessário que seja oxidada pela mieloperoxidase (MPO) na presença de peróxido de hidrogênio formando um dímero 39 que corresponde a sua

forma ativa (Figura 10) (SIMONS et al., 1990; STEFANSKA e PAWLICZAK, 2008). A apocinina também tem ação antioxidante que ocorre pelo sequestro de superóxidos (HEUMÜLLER et al., 2008). Mostrando-se eficaz na redução e prevenindo a produção dos níveis de superóxido em condições associadas a hipóxia (SLEPCHENKO, LU e LI, 2016).

No rim, em modelos de IR, a apocinina tem ação antioxidante e citoprotetora (CHOI et al., 2015; ROMANINI et al., 2015), como também, reduz o aumento de creatinina, da uréia, do estresse oxidativo e danos histológicos renais (CHOI et al., 2015). Além disso, verificou-se que na fibrose renal causada pela obstrução ureteral a apocinina consegue reverter esse dano (CHENG et al., 2016). Em concordância com outros autores e outros tipos de insulto renal, como os causados pela gentamicina, constatou-se uma redução dos efeitos de nefrotoxicidade renal (ABDELRAHMAN, 2017). Efeitos anti-inflamatórios foram observados através do aumento dos níveis de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) e da redução dos níveis de fatores inflamatórios como interleucina-6 (IL-6) e TNF- α no tecido renal (HU et al, 2017).

Diversas pesquisas comprovaram os efeitos benéficos do tratamento com apocinina em vários órgãos que estão relacionados a produção de EROs. Por exemplos, danos neurológicos (CRUZ-ALVAREZ et al., 2017), cerebrais (ZHENG et al., 2005; WANG et al., 2006; LO et al., 2007; TANG et al., 2007; CHOI et al., 2015; ROMANINI et al., 2015), renais (CHOI et al., 2015; ROMANINI et al., 2015) e hepáticos (RAHMAN et al., 2017).

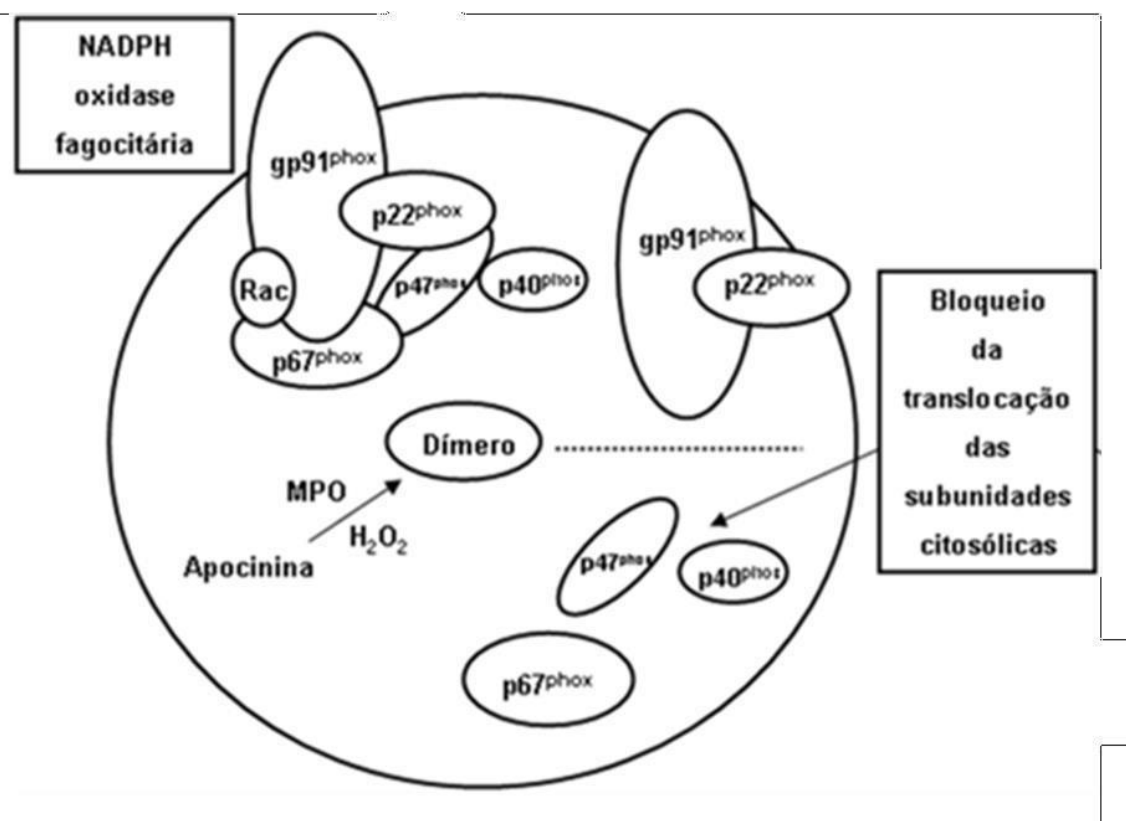


Figura 10. Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina. A apocinina inibe a NADPH oxidase impedindo a translocação para a membrana da p47^{phox} do citosol, em leucócitos, monócitos e células endoteliais. Ocorre oxidação pela mieloperoxidase (MPO) na presença de peróxido de hidrogênio formando um dímero 39. Fonte: Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal*, v. 10, p. 1041-4, 2008 (adaptado).

Em asmáticos leves a apocinina atua como antioxidante nas células endoteliais e nas células do músculo liso vascular, associado a uma ação anti-inflamatória causando efeitos clínicos importantes (HU et al., 2017). Nos vasos, ela age sobre a calcificação induzida pela angiotensina II (FENG et al., 2016) assim como nas alterações na reatividade vascular (FAN et al., 2017). Bem como efeitos cardioprotetores, prevenindo a fibrose e o remodelamento cardíaco (LI et al., 2013).

Os efeitos colaterais da apocinina não são conhecidos, mas sabe-se que a toxicidade é muito baixa o que foi visto após administração oral em camundongos (GAJWESKA e GRZYBOWSKI, 1981; LUCHTEFELD et al, 2008). Tornando-se um alvo importante no tratamento de doenças que causem inflamação e estresse oxidativo.

Sistema imune

As respostas imunes inatas e adaptativas estão presentes na lesão isquêmica, sendo o componente inato responsável pela resposta precoce à lesão de uma forma não específica do antígeno e compreendem neutrófilos, monócitos/macrófagos e células natural killers (Figura 11) (BOVENTRE e YANG, 2011). A ligação do ligante aos receptores toll-like (TLR) leva à ativação de vias de sinalização, incluindo NF- κ B, proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e vias de interferon tipo I, resultando na indução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (CHEN e NUNEZ, 2010).

Alguns padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são normalmente “sequestrados” intracelularmente e após lesão tecidual, são liberados no compartimento extracelular, onde podem ativar uma resposta imune (MC DONALD et al., 2010). Citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α desempenham papel importante na disfunção renal da IR (VOSS, BODE e KERKHOFF; 2012).

O componente adaptativo, ativado por antígenos específicos, é iniciado em poucas horas e perdura vários dias após a lesão. A resposta adaptativa inclui maturação das células dendríticas, apresentação de antígenos, proliferação e ativação de linfócitos T e interações de linfócitos T com B (BOVENTRE e YANG, 2011).

Os mecanismos pelos quais as células T são ativadas durante a inflamação não são bem compreendidos, mas sabe-se que há uma contribuição de mecanismos de ativação específicos e independentes do antígeno (STAPUT et al., 2009). Diversos estudos mostraram que as células T CD4⁺ e CD8⁺ têm um papel prejudicial e que se acumulam durante isquemia e reperfusão (DAY et al., 2006).

Durante a fase inicial da reperfusão, as células imunes inatas dominam a composição celular dos infiltrados. A proteção proporcionada pelas células dendríticas depende da produção da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10), resultando em níveis atenuados do TNF- α , IL-6 e EROs (ELTZSCHIG e ECKLE, 2011).

Na reperfusão, as células endoteliais iniciadas por isquemia são propensas à adesão de leucócitos e plaquetas, aumentando ainda mais a permeabilidade das células endoteliais e a ativação celular. Os leucócitos aderentes liberam EROs e uma variedade de citocinas, aumentando a reação inflamatória. Em seguida, os leucócitos transmigram e entram no espaço subendotelial. Essa cascata inicial de eventos tem um efeito profundo na função inicial do enxerto (BOROS e BROMBERG, 2006).

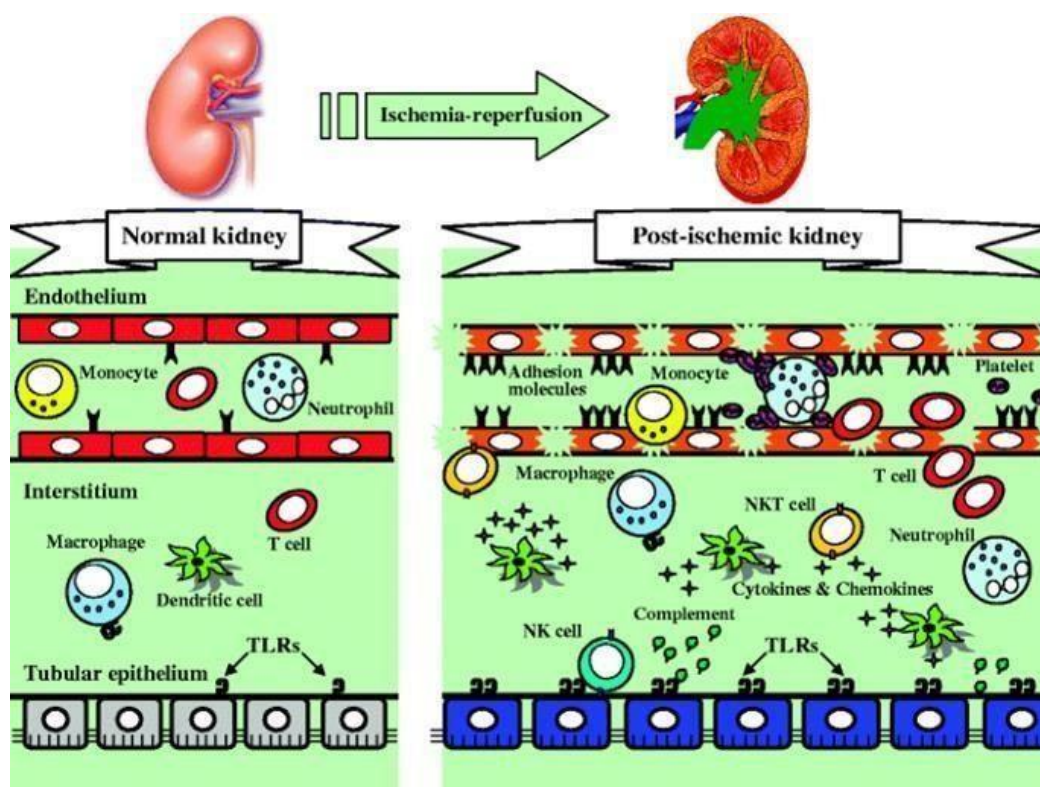


Figura 11. A lesão de isquemia-reperfusão renal envolve as respostas imunes inatas e adaptativas. Os rins pós-isquêmicos expressam níveis aumentados de moléculas de adesão nas células endoteliais e receptores toll-like nas células epiteliais tubulares. Componentes solúveis do sistema imunológico, como proteínas de ativação do sistema complemento e citocinas, também participam da lesão/reparo dos rins. Fonte: Jang, H.R. et al. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med*, v. 87, p. 859–864, 2009.

Alguns mediadores inflamatórios, parecem estar envolvidos na patogênese da IR. Uma interação entre os eicosanóides e a geração de óxido nítrico (NO) foi recentemente sugerida (WEIGHT et al., 2001). Uma relação direta foi demonstrada entre um alto índice de prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TxA₂) e a preservação da função renal após a isquemia. Seguindo o mesmo raciocínio, foi observado que o precursor do NO (L-arginina), e a prostaglandina E₁ (PGE₁), demonstram um efeito nefroprotetor na lesão por IR (LELCUK et al., 1985; MAHMOUD et al., 2007).

A IR renal resulta na ativação da NF- κ B e na subsequente expressão de genes pró-inflamatórios, especificamente, expressão renal do iNOS e ICAM-1, que dependem da ativação do NF- κ B, foi visto pela primeira vez in vivo, que 15-Deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ reduz a ativação do NF- κ B e a expressão de genes alvo (CHATTERJEE et al., 2003).

A IR renal ativa o óxido nítrico sintase (NOS) e aumenta a expressão das proteínas NOS (VINÃS et al., 2006). Existem três isoformas diferentes da NOS: a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS), que produzem NO em baixas

concentrações para fins fisiológicos, enquanto a forma indutível de NOS (iNOS) produz NO em altas concentrações. Foi sugerido que o NO produzido pelo iNOS é um agente tóxico, enquanto o eNOS é visto como uma enzima protetora (CHANG et al., 2002). O NO produzido nos túbulos renais proximais em resposta à lesão isquêmica é mediado pela iNOS (PERESLENI et al., 1996). E sua eliminação produz peroxinitrito, o que causa dano tubular durante a isquemia (VINÃSet al., 2001). Além disso, a própria isquemia pode fornecer disfunção endotelial e alterar a formação da forma endotelial de NO para a forma eNOS (MILSON et al., 2010).

O ânion nitrito é um produto final do metabolismo do NO. Nas condições de hipóxia e isquemia, o nitrito é convertido em NO pelas enzimas NOS e xantina oxidase (MILLAR et al., 1998). Assim, o nitrito armazenado durante a normóxia e convertido em NO em condições de hipóxia pode ser considerado um tampão de NO. Vários estudos recentes demonstraram citoproteção mediada por NO e nitrito em modelos de IR. Além disso, o nitrito pode atuar por via independente (TRIPATARA et al., 2007).

O NO produzido pelo iNOS ativa a COX-2 elevando a produção de EROs no cérebro isquêmico, como também em outros órgãos vitais durante a inflamação (Dolgart et al., 2014). Reafirmando no estudo de Kocak (2019) em que os níveis de RNAm do iNOS e COX-2 aumentaram em resposta à lesão de IR cerebral. E a redução dessas citocinas demonstrou atenuar efetivamente a lesão de IR nos membros posteriores (MO et al., 2017). Níveis elevados de NO ainda estão associados a indução de iNOS podendo ser prejudicial para os tecidos alvo (KATADA et al., 2009). Corroborando com outra pesquisa agora no tecido renal a IR aumentou significativamente os níveis de expressão da proteína iNOS em comparação ao grupo controle (GAO et al., 2018).

Em um modelo de lesão testicular de IR, os níveis de iNOS, eNOS, nNOS aumentaram após o insulto causando apoptose e estresse oxidativo, esse mecanismo possivelmente ocorreu pela redução da síntese de NO (LI et al., 2019). Já em uma pesquisa com ratas fêmeas ovariectomizadas, submetidas a IR os autores demonstraram uma diminuição significativa na expressão proteica do eNOS em comparação com o grupo OVS que não foi submetido ao insulto, o que pode acelerar a transdução de sinalização intracelular e é atribuído a um efeito marcante de lesão anti IR (TANG et al., 2016).

Por outro aspecto o NO exerce um outro papel na patogênese da insuficiência renal aguda isquêmica (GOLIGORSKY e NOIRI, 1999). Em baixas concentrações é considerado renoprotetor contra a isquemia renal devido a suas propriedades

vasodilatadoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, além de seus efeitos benéficos na sinalização celular e inibição de proteínas nucleares (PHILIPS et al., 2009). A produção de NO derivado do iNOS, desempenha um papel fundamental no remodelamento vascular das artérias colaterais e na recuperação da perfusão em resposta à isquemia de membros posteriores (SARI et al., 2014).

Diante disso, inúmeras pesquisas descrevem uma íntima relação entre o sistema imune e o sistema renal. Os rins contribuem para a homeostase do sistema imunológico removendo citocinas e toxinas bacterianas circulantes (TECKLENBORG et al., 2018).

Os DAMPs, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), TLRs, estresse oxidativo, fator induzível por hipóxia (HIF), sistema complemento, moléculas de adesão, morte celular, células dendríticas residentes (DCs), neutrófilos, linfócitos T e B, macrófagos, células T natural killer (NKT), citocinas secretadas e quimiocinas participam da fisiopatologia da LRA (RADI, 2018).

Sistema imune e micofenolato de mofetila (MMF)

O micofenolato de mofetil (MMF), imunossupressor (ALLISON, 2005; FISCHER, 2013), é uma pró droga que passa para a forma ativa após convertida em ácido micofenólico no trato gastrointestinal (SALOMÃO, 2007). Inibe a inosina monofosfato desidrogenase, bloqueando a proliferação de linfócitos T e B através da alteração da síntese de nucleotídeos de guanosina e dessa forma inibe o TGF- β , garantindo também seu efeito antifibrótico (ZEGARSKA, 2005) (Figura 12). Foi aprovado para tratamento da rejeição aguda no transplante renal em 1995, nos E.U.A. (TRIEMER et al., 2000).

Diversos estudos têm demonstrado o benefício do MMF no tratamento de doenças renais (LU et al., 2017), na IR renal inibindo as respostas inflamatórias (JANG et al., 2009). Quando administrado durante a reperfusão renal, modula células T reduzindo assim a lesão tubular, proliferação e tráfico de linfócitos e produção de citocinas (GANDOLFO et al., 2010). Assim como em doenças glomerulares (HUSEN e KEMPER, 2011; BAUDOUIN, 2012), doenças pulmonares (OMAIR e ALHAMAD, 2017), foi visto também redução na dosagem de glicocorticóide em algumas patologias, promovendo a redução de proteinúria sem aumentar os efeitos adversos (LU et al., 2017).

Os medicamentos a base de micofenolato são comuns e já são utilizados na medicina de transplante há pelo menos 20 anos. É muito empregado em pacientes que realizam transplantes, tanto no primeiro ano pós-transplante, como para tratamento de manutenção de longo prazo (GELDER e HESSELINK, 2015). Seu alto consumo se dá por não ser nefrotóxico, por ter poucos efeitos adversos (ALLISON, 2005; ZEGARSKA, 2005; SALOMÃO, 2007) e interagir farmacologicamente com menos medicamentos quando comparado com outros inibidores (GASTON, 2001).

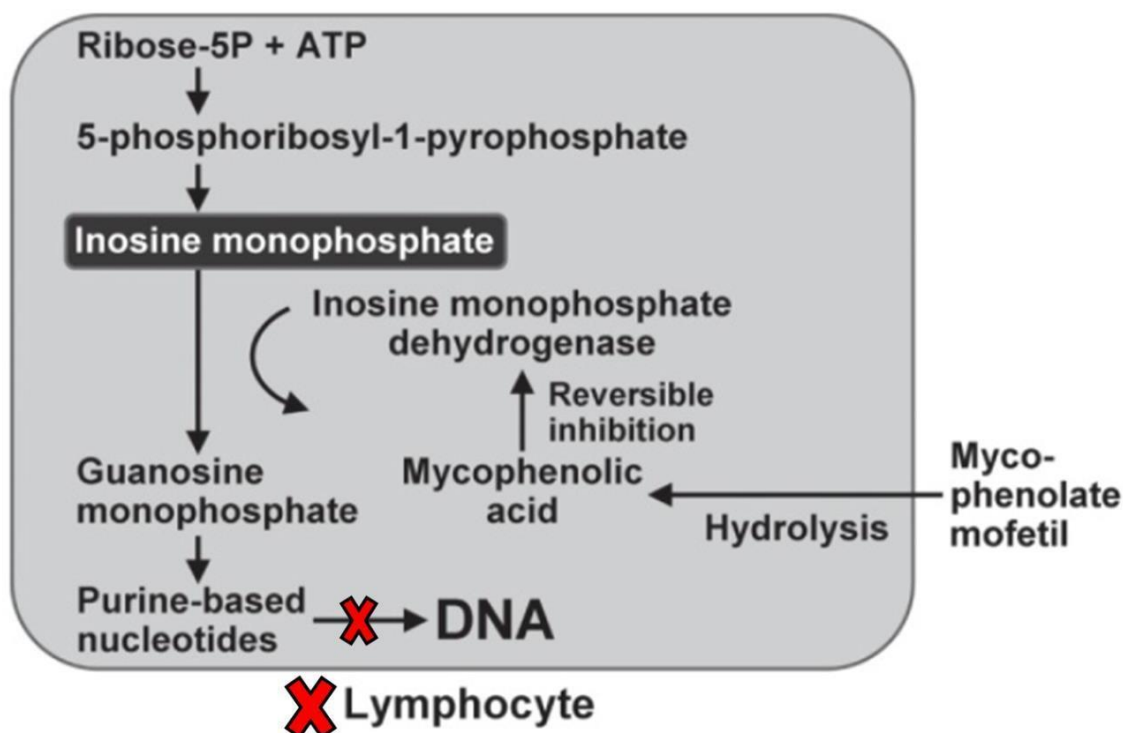


Figura 12. O micofenolato de mofetil é hidrolisado em ácido micofenólico que é um inibidor potente e reversível da inosina monofosfato desidrogenase, prejudicando a síntese de nucleotídeos à base de purinas, inibindo a criação de novo DNA e prejudicando a proliferação de linfócitos ativados. O ácido micofenólico tem efeito citostático maior nos linfócitos T e B do que em outras células, pelo fato desses linfócitos serem extremamente dependentes da via das purinas para a sua proliferação. Isso impede a oxidação da inosina monofosfato, que é um passo fundamental na síntese de novo do nucleotídeo guanosina. Fonte: CZAJA, A.J. Autoimmune hepatitis: focusing on treatments other than steroids. *Can J Gastroenterol.*, v. 26, n. 9, p. 615-20, 2012. (Adaptado)

Fibrose renal

A fibrose tubulointersticial consiste na substituição da arquitetura normal dos túbulos sendo substituída por matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno I (COL I) e fibronectina (FN) (ZEISBERG e NEILSON, 2010; MERAN e STEADMAN, 2011; EDDY, 2013). A deposição de colágeno é fundamental para a reparação dos tecidos,

porém, quando a lesão for intensa ou repetitiva, esse processo de cicatrização pode ser desregulado evoluindo assim para uma resposta fibrótica progressiva e irreversível (KOBUSIAK-PROKOPOWICZ et al., 2018). O acúmulo de MEC em torno do tecido lesionado causa mau funcionamento ou até perda de função de determinados órgãos, como nas doenças hepáticas em estágio avançado, fibrose pulmonar idiopática (WYNN e RAMALINGAM, 2013), doença cardíaca e renal (KOBUSIAK-PROKOPOWICZ et al., 2018).

O principal tipo de célula produtora de MEC é o miofibroblasto (LEVEY e CORESH, 2012) que produz uma grande quantidade de COL I e FN (MERAN e STEADMAN, 2011; EDDY, 2013). Sendo os pericitos (ou fibroblastos perivasculares) os principais responsáveis pela produção de miofibroblastos na fibrose renal (HUMPHREYS et al., 2010). A origem da fibrose tubulointersticial envolve citocinas, fatores de crescimento, leucócitos, ativação de fibroblastos, transição epitélio-mesenquimal (EMT) que contribuem para o desenvolvimento da fibrose tubulointersticial progressiva (LIU, 2011; DUFFIELD, 2014).

A LRA causada por IR pode seguir-se em regeneração tubular inadequada, inflamação crônica, infiltração de macrófagos e ativação de fibroblastos, levando à deposição excessiva de MEC e fibrose (YANG et al., 2010; BONVENTRE e YANG, 2011; JANG et al., 2014; ZHOU et al., 2014; KIM e PADANILAM, 2015). O microambiente inflamatório do rim, decorrente de uma lesão renal tem uma função importante na determinação do equilíbrio dinâmico, entre a destruição e o reparo do tecido e a inflamação contínua, entre eles a infiltração de células inflamatórias e a produção/liberação local de moléculas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas que estimulam o processo de fibrose (Figura 13) (MENG, NIKOLIC-PATERSON e LAN, 2014). Quando ocorre esse processo no glomérulo, ele é denominado de glomeruloesclerose e quando ocorre no espaço túbulo intersticial é chamada de fibrose túbulo-intersticial (LIU, 2004).

Os fatores indutores da fibrose induzem o aumento da produção de EROs. E essa elevação está relacionada com a produção e ativação de vários fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas por um mecanismo de feedback. Sob condições normais, a ativação transitória da inflamação por EROs vem em sequência uma regeneração tecidual. Entretanto, níveis elevados de EROs influenciam de forma direta e indireta (através da inflamação, por exemplo) para o desenvolvimento e a progressão da fibrose. Também a fibrose por si só leva a uma maior produção de EROs, que

contribui para a progressão da fibrose, disparando um ciclo de retroalimentação positiva (RICHTER et al., 2016).

Estudos demonstraram que a LRA por IR ativa a via do receptor C5aR1 tendo um papel significativo na origem e progressão da fibrose tubulointersticial (GUELER F, 2008; PENG et al, 2012; LI e ZHOU, 2013). O C5aR1 atua mediando respostas inflamatórias locais, estimulando de maneira direta os fibroblastos renais. No modelo de IR a resposta inflamatória local, ativa a proliferação de macrófagos M1 induzindo a progressão de fibrose tubulointersticial (WANG, 2007; LECH, 2014; PENG, 2019).

Um processo contínuo e progressivo do estresse oxidativo e inflamação cursa com danos na estrutura e nos componentes moleculares do rim atingindo um estágio de fibrose e como consequência a perda da função renal (Figura 13). Em conjunto esses acontecimentos causam uma superposição de mecanismos de lesão, esses levam a uma progressão precoce e acelerada da lesão renal aguda para a doença renal dialítica (TURKMEN, 2016).

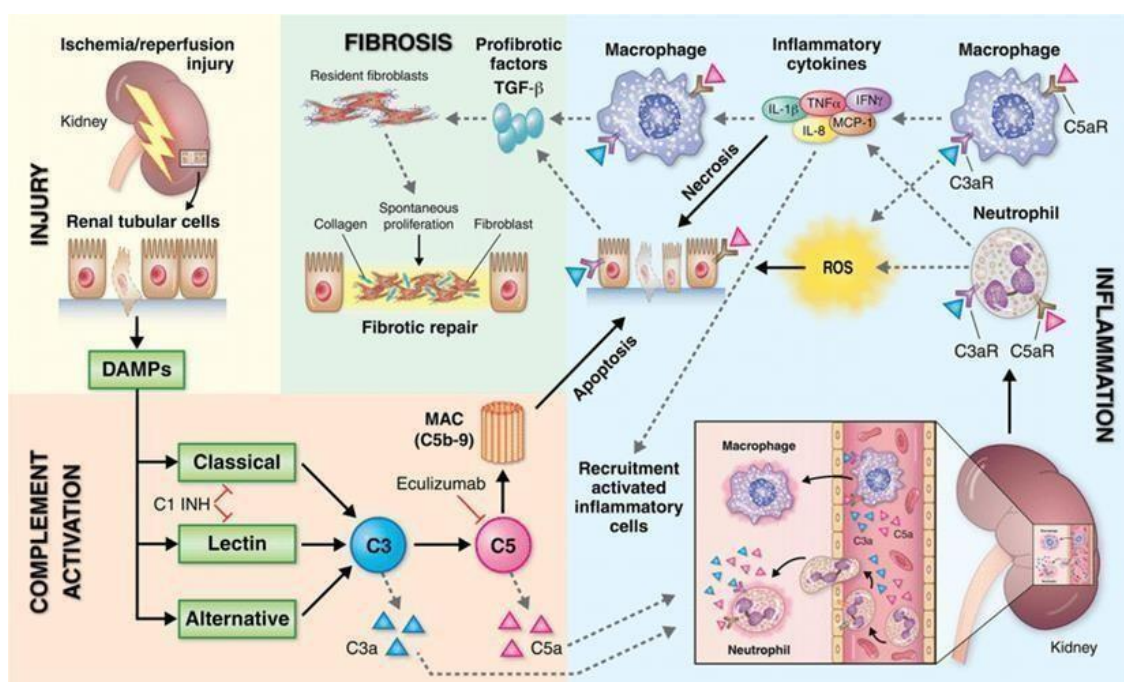


Figura 13. Participação de mediadores imunes no mecanismo de reparo fibrótico induzido pela isquemia-reperfusão renal. A lesão de IR ativa o sistema do complemento pela liberação de DAMPs do tecido. A formação do complexo de ataque à membrana (MAC) resulta em lesão direta do rim por indução da apoptose nas células tubulares epiteliais. Além disso, a clivagem de C3 e C5 e subsequente liberação de anafilatoxinas (C3a e C5a) promovem o recrutamento de células inflamatórias e a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e EROs, intensificando a resposta imune e ampliando o nível de necrose tubular e apoptose. O endotélio ativado, monócitos e epitélio tubular lesado secretam TGF-β e PDGF em resposta à ligação C3aR e C5aR por C3a e C5a, respectivamente, que por sua vez ativa fibroblastos locais induzindo deposição de colágeno e tecido de reparação. Fonte: Danobeitia, S; Djarnili, A; Fernandez, L.A. The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, v. 7, n. 1, p. 16, 2014.

Metaloproteinase de matriz e regulação da deposição de matriz extracelular

A fibrose renal pode ser oriunda também de alterações no sistema que participa da degradação da MEC, entre eles estão as metaloproteinases de matriz (MMPs), que são enzimas fundamentais no remodelamento da MEC (NAGASE e WOESSNE, 1999; CREEMERS et al., 2001; SPNALE, 2002; KOBUSIAK-PROKOPOWICZ et al., 2018).

Essas enzimas são inicialmente expressas como pró-forma latente denominadas zimogênios ou pró-MMPs. Quando seus domínios pró-peptídeos são clivados por outras proteases, como a plasmina ou até por outras MMPs (NAGASE e WOESSNE, 1999; MANNELLO e MEDDA, 2012), assim como por tratamentos químicos com ureia, detergentes e radicais livres elas passam para forma ativada (GEURTS, OPDENAKKER e VAN DEN STEEN, 2011). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco, compostas por uma família multigênica com cerca de 23 membros, entretanto, especificamente no rim a degradação da MEC é realizada principalmente pelas gelatinases as MMP-2 e 9.

A MMP-2 é produzida por fibroblastos, células epiteliais e células mesangiais (CMs) (KEELING e HERRERA, 2008). Tendo como substratos os colágenos IV e V, elastina, fibronectina e gelatina (RYDLOVA et al., 2008). Já a MMP-9 é produzida por células mesangiais e células epiteliais glomerulares (KEELING e HERRERA, 2008). E tem como substratos colágenos IV e V, elastina e gelatina I (RYDLOVA et al., 2008).

As MMPs em células normais são expressas em níveis baixos ou mesmo ausentes, sendo induzidas no momento em que necessita de remodelação tecidual (POLETTE et al., 2004; BARROS, 2006). Fazem parte de diversos processos biológicos, tendo como exemplo embriogênese, remodelamento tecidual normal, cicatrização de feridas, angiogênese (KEELING e HERRERA, 2008), morfogênese, mobilização de células tronco, entre outros (NAGASE, VISSE e MURPHY, 2006). Alterações na regulação dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPS), alterações na expressão gênica, ativação de suas pró-formas latentes, o TGF- β (ZHAO et al., 2008; ZHANG et al., 2009), hormônios, fatores de crescimento, citocinas, fatores genéticos e epigenéticos, e interações célula-célula e célula-matriz são fatores que controlam a ação das MMPs (KUPAI et al., 2010; GEURTS, OPDENAKKER e VAN DEN STEEN, 2011).

A desregulação na atividade das MMPs, tanto na ativação como na inibição estão relacionados com inúmeras patologias como, doença renal crônica, infarto do

miocárdio (KOBUSIAK-PROKOPOWICZ et al., 2018), esclerose múltipla, ulceração de tecidos, inflamação, nefrite, fibrose (KEELING e HERRERA, 2008) aneurisma, doenças pulmonares, artrite, doenças oculares, cutâneas (SQUIRE et al., 2004; FINGLETON, 2007; BAGHIROVA et al., 2016) e câncer (BURDUK et al., 2012; NOWAK, et al., 2013; WAJNER et al., 2014; HEO et al., 2014). Pesquisas têm elucidado a ação das MMPs no rompimento da membrana basal e na degradação do estroma intersticial, possibilitando a invasão de células neoplásicas e como consequência a metástases (HRABEC et al., 2007; NOWAK et al., 2013).

Os TIMPs são os principais inibidores teciduais endógenos das metaloproteinases e se ligam às pró-MMPs por meio da ligação de seu domínio C-terminal com o domínio hemopexina da pró-enzima. Essa ligação é de certa forma específica onde o TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 se ligam à MMP-2, e TIMP-1 e TIMP-3 à MMP-9 (MANELLO e MEDDA, 2012). Tendo como função mais importante controlar a degradação, o desenvolvimento e a remodelação da membrana basal e da MEC (NOWAK et al., 2013; RIES, 2014). Esses inibidores também realizam outras funções, que podem ser ou não decorrentes da mediação de sua atividade inibitória sobre as MMPs dentre eles estão a modulação do crescimento, proliferação, migração, invasão celular, atividade anti-angiogênica e pró e anti-apoptótica (BREW e NAGASE, 2010; RIES, 2014).

O TGF- β é um fator de crescimento que atua de forma autócrina e parácrina se liga a receptores de membrana específicos, onde em condições normais é controlado por um mecanismo de “feedback” (GOUMENOS et al., 2002). Em condições patológicas, a expressão do TGF- β está correlacionada com uma acentuada produção de MEC e deposição de colágeno desencadeada pela ativação de fibroblastos, células mesangiais ou pela transição epitélio-mesênquima (EMT). Dessa forma desempenha ação central de regulação da atividade das MMP e consequentemente no desenvolvimento da fibrose renal (MEHROTRA et al., 2017; CONDE et al., 2017; LIANG et al., 2018; WU et al., 2018; CORTES et al., 2018). De maneira mais amena fatores como, o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) também podem desencadear a deposição de MEC, de maneira sinérgica a ação do TGF- β (SENE et al., 2013).

Em uma lesão renal por IR foi visto que após a reperfusão, houve uma elevação importante na concentração de MMP (WINN et al., 1997) e a inibição desse aumento reduziu esse dano renal (BERGERS et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2006). Em seu

estudo em humanos, Kobusiak-Prokopowicz (2018) constatou no soro de pacientes com doença renal crônica, níveis elevados de MMP-2 e TIMP-2 e também níveis séricos de MMP-2 foram correlacionados com o grau de insuficiência renal.

O estresse oxidativo influencia na modulação das atividades das MMPs 2 e 9, essa ativação ocorre por meio de reações do grupamento tiol (RAJAGOPALAN et al., 1996) (Figura 14). Em um modelo de ratos hipertensos foi visto que uma exacerbação do estresse oxidativo ocasionou o aumento da expressão das MMPs, inflamação e da lesão renal, passando a ser mais um mecanismo de como a hipertensão induz a DRC via estresse oxidativo (KARANOVIC et al., 2016). Em um outro estudo, pesquisadores mostraram a interferência do estresse oxidativo em mecanismos transcricionais sobre a expressão tanto do RNA da MMP-2, como do RNA da enzima que ativa a MMP-2 (BEN-YOSEF et al., 2002).

Por outro lado, a MMP-9 ativa a IL-8 (importante fator quimiotático de neutrófilos) e ativa os neutrófilos, via ativação de um peptídeo oriundo de células endoteliais, ocasionando uma propagação da inflamação (LIPKA e BORATYŃSKI, 2008; AWAD et al., 2009). Foi visto também uma concentração elevada de TGF- β nas primeiras horas após a reperfusão, estimulando e ativando a MMP-9 (KALEMBEYI et al., 2003; WANG, 2006).

Em relação a MMP-2, sua inibição reduziu a proteinúria nas lesões crônicas de rins transplantados, mostrando sua influência em lesões crônicas (LUTZ et al., 2005). O aumento dos níveis de TGF- β associado a elevação da MMP-2, via células mesangiais, levou a um espessamento da membrana basal glomerular e da matriz mesangial (KEELING e HERRERA, 2008).

O acúmulo exagerado de matriz extracelular pode decorrer de sua maior produção por fibroblastos no interstício e por células mesangiais glomerulares ou de uma menor degradação que é realizada, sobretudo, pelas MMPs. Tendo a citocina pró-fibrótica TGF- β apresentando ação central na regulação do processo de desenvolvimento da fibrose renal. (BADID et al., 2000; MARTIN et al., 2001; LEE e JANG et al, 2014).Essa modulação pode sofrer interferência de vários fatores como estresse oxidativo (ZHAO et al., 2008), citocinas, angiotensina II, aldosterona (VISSE E NAGASE, 2003), fatores de necrose tumoral (TNFs), proteínas quimioatraentes de monócitos (MCPs), fatores de crescimento (GFs), entre outros (Figura 14) (CHENG, et al. 2017).

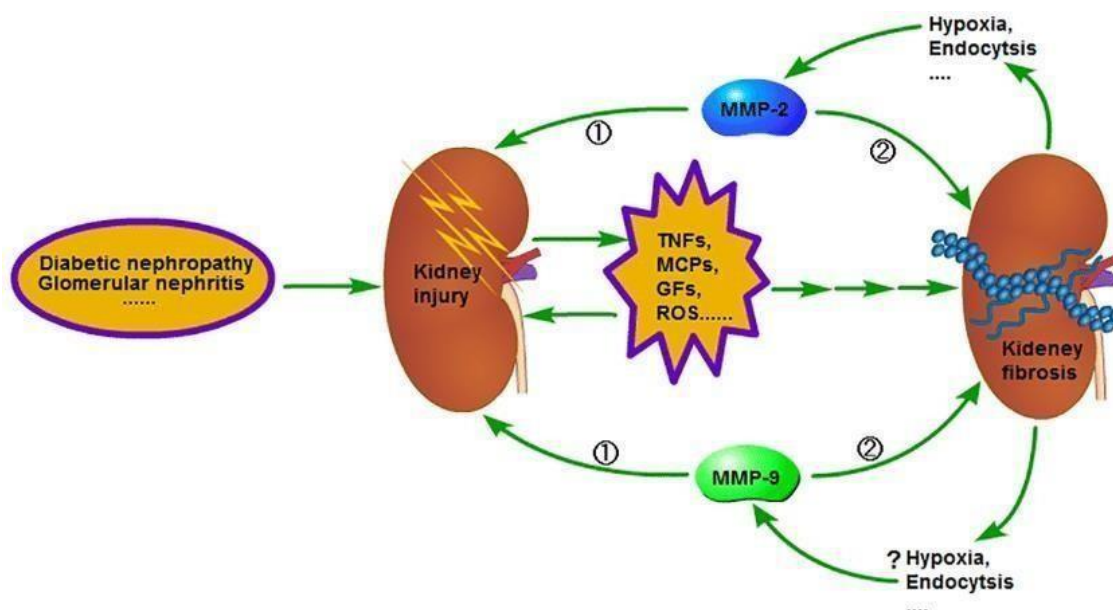


Figura 14. No estágio inicial da doença renal crônica, quando o rim é lesado, as células lesadas e as células inflamatórias renais secretam citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, levando a fibrose intersticial renal. Simultaneamente, a atividade das MMP-2 e 9 é elevada lesando a membrana basal renal, promovendo a transformação do fenótipo das células epiteliais tubulares renais, ocasionando agravamento da deposição de matriz extracelular. No entanto, no estágio avançado da doença renal crônica, a atividade das MMP-2 e 9 está diminuída causando degradação inadequada da MEC. A razão para a diminuição da atividade da MMP-2 no estágio avançado da doença está relacionada ao aumento da endocitose, que é causada por hipóxia. ① Estágio inicial; ② Estágio avançado; TNFs: Fatores de necrose tumoral; MCPs: Proteínas quimioatraentes de monócitos; GFs: Fatores de crescimento; MMP-2: Metaloproteinase de matriz 2; MMP-9: Metaloproteinase de matriz 9. Fonte: CHENG, Z. et al. MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*, v. 18, n. 4, p. 776, 2017.

Impactos da IR renal em órgãos distantes

A LRA está associada a altos índices de mortalidade que pode ser ainda mais grave quando combinados com lesões em outros órgãos. A lesão de um órgão remoto, pode surgir em vários órgãos distantes do tecido principal que sofreu a injúria como pulmão, coração, cérebro, fígado e intestinos (BAKKER et al, 2015; LEE, et al., 2018; HUSAIN-SYED, et al., 2020). Indícios crescentes mostram a lesão renal como indutora e propagadora de disfunções nesses órgãos (GRAMS e RABB, 2012) (Figura 15).

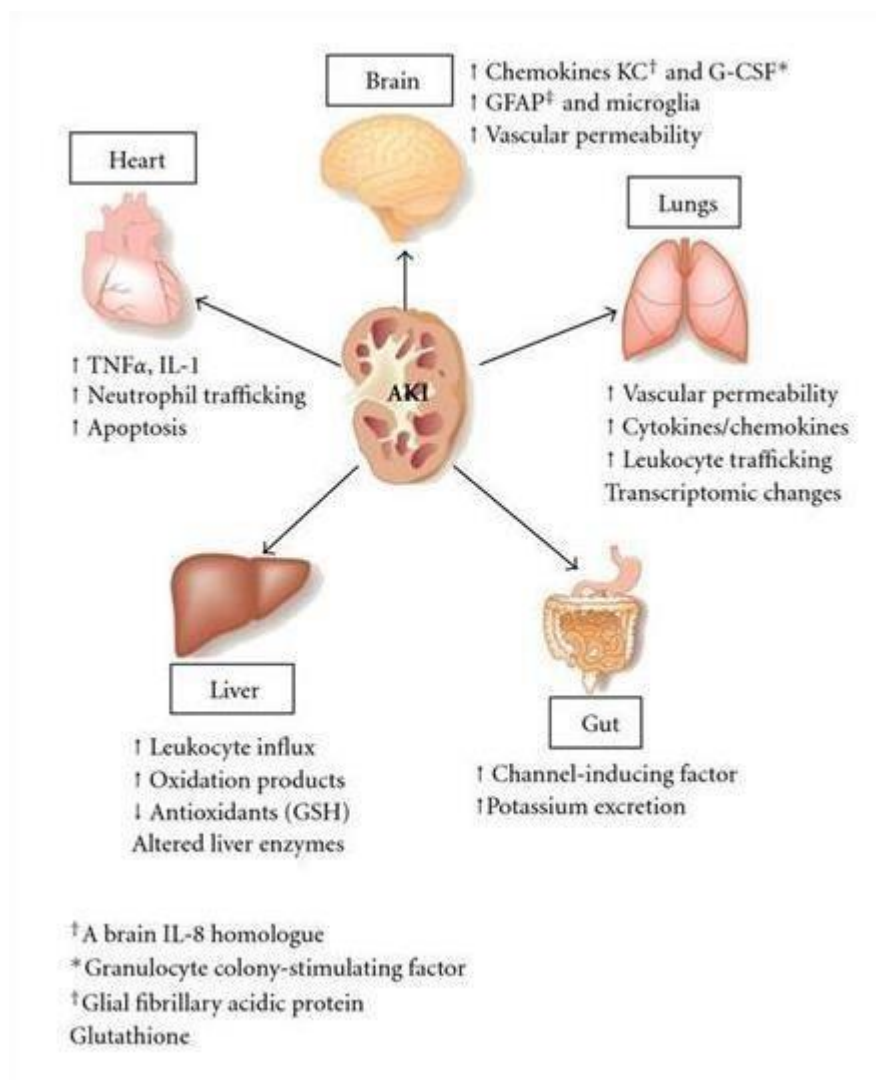


Figura 15. Lesão renal aguda e crosstalk de órgãos. A lesão renal aguda induz lesões em órgãos remotos: coração, cérebro, pulmões, fígado e intestino. Envolve diversas vias inflamatórias, entre eles aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios solúveis, imunidade inata e adaptativa, apoptose celular, distúrbios fisiológicos e alterações genômicas. Fonte: WHITE L.E.; HASSOUN H.T. Inflammatory Mechanisms of Organ Crosstalk during Ischemic Acute Kidney Injury. Int J Nephrol., v. 2012, n. 505197, 2012.

O *crosstalk* de órgãos pode ocorrer em decorrência de vários tipos de LRA, mas ainda não se sabe ao certo se a base da LRA influencia na dimensão da disfunção de órgãos distantes. A uma maior probabilidade de disfunção em órgãos distantes em pacientes com lesão renal mais grave, porém em pacientes que apresentam a forma leve a moderada da doença também podem apresentar disfunção de múltiplos órgãos (KELLUM e MURUGAN, 2016). Essa injúria pode ocorrer devido a uma situação de

IR que está relacionado com episódios de choque, sepse, transplante e cirurgia vascular (BAKKER et al, 2015).

A IR renal tem causas decorrentes de alterações da combinação de vários fatores, que muitas vezes se comportam de forma interdependentes como fatores inflamatórios, alterações na histologia e função do tecido, (BAKKER et al, 2015) e estresse oxidativo. Essas complicações podem ocorrer em órgãos distantes, devido aos diferentes mediadores que são liberados na corrente sanguínea sistêmica, como citocinas pró-inflamatórias, EROs, infiltração de leucócitos, ativação de vias pró-apoptóticas, lesão endotelial (CIZ et al., 2001; GRAMS e RABB, 2012; LEE, et al., 2018; HUSAIN-SYED, et al., 2020) e alteração do equilíbrio imunológico normal (LANE, et al., 2013).

Coração

Síndrome cardiorenal

Uma lesão em um órgão, na maioria dos casos interfere na disfunção ou lesão de outro órgão. Nesse contexto é sabido que há uma importante relação entre a função renal e a cardíaca, denominada, síndrome cardiorenal, esse termo foi proposto para caracterizar essa complexa correlação. Um dos tipos é a síndrome renocárdica aguda, também chamada de tipo 3 (RONCO, et al., 2011). Participando do processo fisiopatológico dessa síndrome, mediadores inflamatórios (SCHRIER, 2006; ICOGLU AKSAKAL et al., 2021), mediadores de estresse oxidativo (ICOGLU AKSAKAL et al., 2021), respostas imunes inatas e adaptativas que funcionam em conjunto com a geração de citocinas (SCHRIER, 2006; JANG et al., 2009). A LRA colabora ou inicia a disfunção cardíaca, por meio de sobrecarga de volume, acidose metabólica, distúrbios eletrolíticos, entre outros mecanismos (DI LULLO et al., 2019) (Fig. 17).

CRS type 3

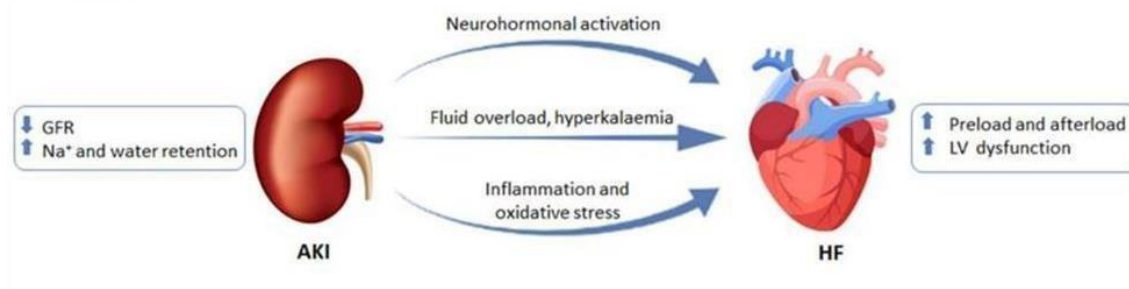


Figura 17. Síndrome renocárdica aguda ou tipo 3. A LRA pode produzir eventos cardíacos como consequência da sobrecarga hídrica, hipercalemia, acidose metabólica, inflamação e estresse oxidativo. GFR: taxa de filtração glomerular; HF: ventrículo esquerdo. Fonte: DELGADO-VALERO, B.; CACHOFEIRO, V.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E. Fibrosis, the Bad Actor in Cardiorenal Syndromes: Mechanisms Involved. *Cells*, v. 10, n. 7, p. 1824, 2021. (Adaptado)

Estudos têm demonstrado que a IR renal está associada a estresse oxidativo em órgãos distantes como o coração (WANG et al., 2010; KARIM et al., 2015; ELSHAZLY e SOLMAN, 2019). O aumento da peroxidação lipídica comprometeu a função da membrana e ocasionou danos oxidativos no DNA (MARNETT, 2000). Esses fatos são apoiados nos achados de diversos pesquisadores que vêm evidenciando que a I/R renal aumentou os níveis de MDA no rim e no coração e inibiu os níveis dos antioxidantes SOD (YOUSSEF et al. 2015), GSH, GST e catalase (PRUD'HOMME et al., 2019). Além disso, observou-se também no mesmo modelo experimental uma elevação nos níveis de MPO no coração e redução dos níveis de eNOS (ICOGLU AKSAKAL et al., 2021). Em acordo com esses dados também constataram alterações estruturais graves, tanto no rim isquêmico como no coração, um órgão distante, observações que foram vistas em avaliações histológicas, sendo também um indicativo de estresse oxidativo e inflamação após IR renal (ICOGLU AKSAKAL et al., 2021).

Por sua vez, a resposta inflamatória se mostra presente no tecido cardíaco após um episódio de IR renal. O NF- κ B no endotélio vascular desencadeia a migração e adesão de leucócitos, que é aumentado pela superexpressão de moléculas de adesão (RAO et al., 2007; KATO et al., 2009). Em seguida, a ativação de leucócitos resulta na obstrução dos capilares, produção exagerada de citocinas exacerbando uma resposta inflamatória (BONVENTRE e ZUC, 2004). Youssef et al (2015) detectaram neutrófilos infiltrando rim e coração após reperusão renal. Um outro mediador inicial de inflamação é o TNF- α que tem um papel primordial na lesão causada por IR renal, não só no rim como também em órgãos remotos (GOLAB et al., 2009).

Além disso, a IR renal aumentou a expressão de IL-1 β e IL-6 no coração, envolvendo as respostas imunes inatas e adaptativas funcionando juntamente com a geração de citocinas dentro do rim (JANG et al., 2009). Em um outro experimento com a mesma injúria renal em diversos tempos de reperfusão (6, 24 e 48 horas), esse processo induziu as expressões de mRNA de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no coração e o ecocardiograma confirmou disfunção ventricular esquerda, que é um provável sinal de insuficiência cardíaca (MITAKA et al. 2014), e está associado a mortalidade (DESWAL et al., 2001; VASAN et al, 2003).

Alterações da função cardíaca derivadas de perturbações do balanço de Ca²⁺

Alguns eletrólitos decorrentes da dieta como Ca²⁺ podem influenciar na pressão arterial (PA), no início de doenças cardíacas e cerebrovasculares, nos índices de lipídios no sangue e até no desenvolvimento de aterosclerose. Observado a redução de cálcio presente em indivíduos com hipertensão, uma dieta com restrição desse mineral eleva o risco de espoliação de nutrientes que podem ser essenciais para manter a pressão arterial normalizada (DAS, 2001).

Dessa forma a influência do balanço iônico relacionado com uma dieta inadequada observou-se alterações bioquímicas tendo relação com a redução da síntese proteica, da relação RNA/DNA e da ativação da proteinase dependente do cálcio, como também da homeostase intracelular do cálcio, esses fatores podem acarretar prejuízo no função do miocárdio (GUT et al., 2003). Sendo muito utilizado na suplementação dietética como forma terapia alternativa (GELEIJNSE et al., 1994), prevenindo doenças cardiovasculares hipertensivas, provavelmente pela estabilização da membrana celular e relaxamento da musculatura lisa dos vasos (DAS, 1985).

Várias patologias cardíacas alteram a função dos cardiomiócitos. Na sepse por exemplo, em sua fase inicial a função dos cardiomiócitos esta prejudica por meio das células imunes inatas ativando receptores do tipo toll (BROWN e JONES, 2004).

Estudos em animais demonstraram que após o reconhecimento do patógeno, os cardiomiócitos expressam altos níveis de moléculas de adesão celular, secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, iniciando a ativação da inflamação local, moléculas reguladoras de cálcio que por sua vez diminuem a concentração de cálcio intracelular, influenciando no acoplamento excitação-contração e com isso causando

deficiência contrátil (GODDARD et al., 1996). Ainda sobre a sepse os canais de cálcio tipo L estão diminuídos explicando sua resposta reduzida ao receptor de rianodina ao cálcio e a via RhoA/ROCK, a qual parece estar envolvida no processo do surgimento da hipertrofia cardíaca e do remodelamento ventricular. Também observou-se nas horas iniciais da sepse em animais experimentais que a capacidade de bombeamento de sangue está reduzida já nas horas iniciais da sepse, o débito cardíaco, estava diminuído em até 45% nos animais sépticos em relação ao grupo de animais controle (LIU et al., 2017).

Um outro estudo, com cardiomiócitos cultivados e tratados com doxorubicina - um antineoplásico que tem como efeito adverso a cardiotoxicidade - demonstraram uma liberação aumentada de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático, via canais rianodina, isso causando danos estruturais e diminuição da contratilidade cardíaca (LEINONEN, 2022).

As concentrações deste íon no citosol são baixas durante a diástole e aumentam cerca de dez vezes durante a sístole. Porém, a sobrecarga de cálcio ativa proteases, tais como a calpaína, que degradam proteínas do citoesqueleto e da membrana plasmática, inclusive a distrofina, proteína do complexo distrofina-glicoproteína que liga o citoesqueleto da fibra muscular matriz extramuscular através da membrana celular, lesando a estrutura do miocárdio e sua contratilidade (LIM et al., 2004; WILLIS et al., 2009; CONNELLY ET AL., 2014).

Essas disfunções cardíacas de função sistólica e diastólica podem ocorrer em humanos (POELAERT et al., 1997; EHRMAN et al., 2018) e em animais experimentais evoluindo para choque séptico (LV e WANG, 2016; KAKIHANA et al., 2016), principalmente na fase inicial da doença, em que diversas pesquisas mostraram problemas na contração coordenada do coração (GODDARD et al., 1996; PEAK et al., 2014).

Em uma revisão de literatura autores relataram que o tratamento de primeira escolha para esse tipo de insuficiência cardiocirculatória, ocasionado pela sepse, com a dobutamina, uma catecolamina agonista dos receptores β -1-adrenérgicos do coração, capaz de aumentar o cálcio intracelular e a força de contração do músculo cardíaco e consequentemente o débito cardíaco. Mesmo ainda estando em estudo se os efeitos positivos prevalecem em relação aos negativos (DUBIN et al., 2017; RHODES et al., 2017).

A morte súbita é comum em doentes renal terminal em hemodiálise. Diversos estudos têm mostrado a bradicinesia e a assistolia como o mecanismo fisiopatológico para a morte súbita em pacientes renal terminal (WONG et al., 2015). LOEWEE et al., (2019) supõem que exista um papel do sistema de marcapasso cardíaco natural e que a taxa de batimento espontâneo do nó sinusal em humanos é modulada de uma forma que pode levar a bradicardia grave por alterações da concentração de eletrólitos no espaço extracelular, como ocorre frequentemente em pacientes com DRT em hemodiálise. Nesses pacientes foi visto que a frequência cardíaca diminui muito antes que os pacientes sofram de morte súbita, ainda não se sabe ao certo o motivo pelo qual isso ocorre. Esses autores usaram um modelo computacional, para mostrar que a hipocalcemia tem um efeito bradicárdico exacerbado em células isoladas do nó sinusal humano com eletrofisiologia saudável. A taxa de batimento foi reduzida em 46 bpm ao reduzir a concentração de cálcio ionizado extracelular $[Ca^{2+}]$ em 1 mM do valor de referência *in vitro* (LOEWE et al., 2019).

A bradicardia decorrente da hipocalcemia foi aumentando proporcionalmente com o avanço da idade de pacientes em hemodiálise, isso pode indicar uma perda gradual da função do controle autonômico da frequência cardíaca com a idade, nesta população que apresenta uma hiperatividade simpática crônica impulsionada por nervos sensoriais renais aferentes estimulados pela lesão renal (KOTANKO, 2006; DI LULLO et al., 2016). Esses pacientes com baixas concentrações de Ca^{2+} associou-se a um maior risco de parada cardíaca súbita intradiálise (PUN et al., 2013), eles também apresentaram uma menor taxa de batimento do nó sinusal basal (ZHAO et al., 2016).

Fígado

A disfunção hepática é fortemente observada em pacientes críticos com LRA (ZARBOCK et al., 2006). Diversos estudos demonstraram o surgimento de lesões hepáticas em pacientes com LRA, eles apresentavam alterações na síntese proteica, aumento de respostas inflamatórias, alterações no metabolismo de lipídios, proteínas e de alguns medicamentos (Vilay, et al., 2008; LANE, et al., 2013).

O fígado é um importante órgão regulador, responsável pela produção, armazenamento, metabolismo e degradação de diversas substâncias e hormônios. Promovendo também a regulação de carboidratos, proteínas e lipídios (Guyton, 2011). Foram observadas no fígado alterações estruturais e funcionais após episódios de LRA,

acredita-se que por fatores humorais ou celulares, como estresse oxidativo, inflamação, apoptose e dano tecidual em hepatócitos, consequentemente aumentando a permeabilidade vascular como também a infiltração de leucócitos no tecido hepático, mas fisiopatologicamente ainda não está bem esclarecido (ZARBOCK et al., 2006; GOLAB, et al., 2009). A LRA também causa alterações no metabolismo hepático de fármacos, provavelmente por uma interação associada a toxinas urêmicas, citocinas inflamatórias e ativação de fatores neuro humorais (LANE, et al., 2013).

Tem-se evidenciado que a isquemia renal causa alterações nocivas na histologia, função, estresse oxidativo e estado inflamatório do fígado, levando a uma redução na capacidade antioxidante hepática (GOLAB et al, 2009; KADKHODAEI et al., 2009; GHOLAMPOUR e KEIKHA, 2018; AMINI et al., 2019) (Figura 18).

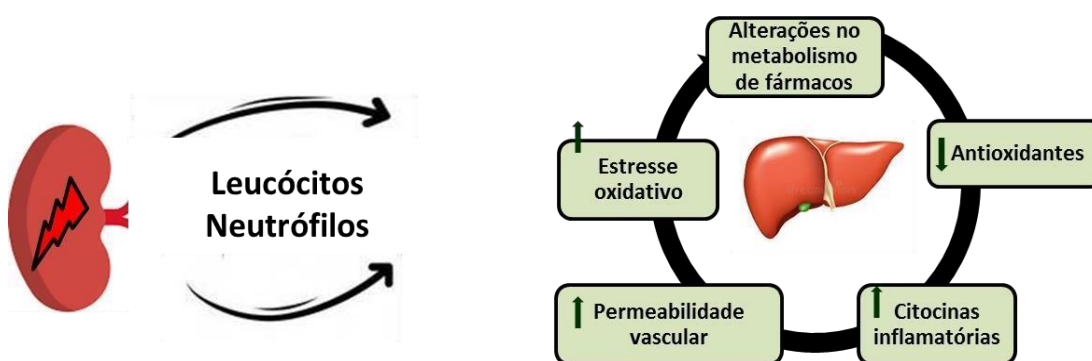


Figura 18. A lesão renal aguda causada pela infiltração de leucócitos e neutrófilos leva a alterações no metabolismo de fármacos, aumento do estresse oxidativo, da permeabilidade vascular, de citocinas inflamatórias e redução de antioxidantes no fígado. Fonte: Figura da autora.

A ALT (alanina aminotransferase) é uma enzima que catalisa a reação de transaminação reversível de alanina e 2-cetoglutarato em piruvato e glutamato, e utiliza como cofator o piridoxal-fosfato. Quando os hepatócitos são lesados, a permeabilidade da membrana celular aumenta, com isso a ALT das células hepáticas são liberadas no sangue, levando ao aumento dos seus níveis no soro (CAO, et al., 2015; THRALL et al., 2015). É uma enzima de elevação aguda, mas o seu aumento é proporcional a lesão encontrada e o seu ponto máximo de liberação é detectado entre 3 e 4 dias após a lesão, retornando aos seus níveis basais em até 14 dias (GONZALEZ e SILVA, 2006). Por ser uma enzima mais específica e preferida no diagnóstico de lesão hepática (BERGMEYER, 1977; LIU et al., 2017). Está mais relacionada com as doenças de gordura hepática (SALIGRAM et al, 2012) e hepatobiliares (BERGMEYER, 1977).

Já a AST (aspartato aminotransferase) promove a catalisação de transaminação reversível de aspartato e 2-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, e tem como cofator piridoxal-fosfato (GONZALEZ e SILVA, 2006). O Aumento desses níveis, pode também estar relacionado com lesões no coração ou no músculo esquelético, assim como no parênquima hepático. Por isso a importância de se mensurar simultaneamente a ALT e AST para diferenciar lesões hepáticas, do coração e da musculatura esquelética (BERGMEYER, 1977).

Tanto a ALT como a AST estão localizadas principalmente nas células hepáticas (CAO et al, 2015). Seus níveis séricos são marcadores bioquímicos importantes e sensíveis para a avaliação da função hepática (COATES, 2011; CAO et al., 2015; FARAG et al., 2016; AMINI et al., 2019) e podem indicar lesões precoce (CHEN Qi et al., 2016), desse modo o aumento anormal pode ser um indicador de dano e necrose das células hepáticas (SEDAGHAT et al., 2014; CAO et al., 2015). Estudos vêm demonstrando que a ALT e AST plasmática aumentam em modelos experimentais de LRA por isquemia renal, ressaltando que a IR renal pode causar lesão hepática remota (FARAG et al., 2016; AMINI et al., 2019; GHOLAMPOUR e SADIDI, 2018; BAKKER PJ, 2015).

Kadkhodae et al., 2009 mostraram que ratos submetidos a 60 minutos de isquemia seguida de 1 hora de perfusão renal houve uma redução significativa no GSH do fígado em comparação com o grupo controle (FARAG et al., 2016; AMINI et al., 2019). Revelando que um mínimo de 45 minutos de isquemia é suficiente para causar danos no fígado como órgão remoto, evidenciando a importância de proteção de órgãos distantes do local de IR. Os níveis de glutathione total também estavam diminuídos no fígado do grupo de animais que sofreram isquemia renal (GOLAB et al., 2009), assim como a atividade da glutathione peroxidase e da catalase estavam reduzidos (GHOLAMPOUR e SADIDI, 2018). Lesão de IR renal em que 45 minutos de isquemia e 4 horas de perfusão foi suficiente para reduzir a atividade de SOD (AMINI et al., 2019), constatando a deficiência no sistema antioxidante hepático.

De outro modo, foi visto que leucócitos e neutrófilos também estão envolvidos na indução de estresse oxidativo (Figura 18) em camundongos submetidos a IR sugerindo assim o envolvimento na indução da lesão oxidativa hepática.

Em estudos anteriores, foi claramente demonstrado que os leucócitos estão envolvidos na lesão de órgãos, como rins, fígado e coração como resultado de IR (HARADA et al., 2000; CIZ et al., 2001; LIPTON et al., 2001; KHASTAR et al.,

2011MIZUTANI et al., 2003). Ativação e migração de leucócitos no rim e fígado foram vistos na lesão renal de IR. Os leucócitos ativados produzem EROs, citocinas pró-inflamatórias e TNF- α (RABB et al., 2000; GOLAB et al., 2009; KHASTAR et al., 2011) (Figura 18). Khastar et al, 2011 constataram em sua pesquisa uma elevação dos níveis hepáticos do TNF- α após isquemia renal.

Os neutrófilos têm um papel importante na indução de insuficiência renal. Quando ativados aderem às células endoteliais vasculares nos vasos retos da medula externa, se infiltrando no tecido liberando diversas citocinas, enzimas inflamatórias, como elastase e mieloperoxidase, proteases, causando dessa maneira disfunção hepática. (YOSHITOMI et al., 2011) (Figura 18).

A IR renal causou um aumento na permeabilidade vascular, infiltração de linfócitos T e quantidade de neutrófilos no fígado (OLOGUNDE et al. 2014), sendo as espécies reativas de oxigênio um dos principais fatores gerados por tecidos isquêmicos e a ativação de neutrófilos após reperfusão renal (YOSHITOMI et al., 2011).

A disfunção do fígado de forma remota causada pela IR renal também foi observada pelo aumento de agentes oxidantes como o malondialdeído, um índice de peroxidação lipídica (GULEC et al., 2008; GOLAB et al., 2009; FARAG et al., 2016 GHOLAMPOUR e SADIDI, 2018; AMINI et al., 2019).

Os dados clínicos ainda são limitados em relação ao efeito da LRA sobre a função do fígado, mesmo sendo tão comum a lesão hepática decorrente da LRA. Tornando-se um importante fator para o aumento do risco de mortalidade (FAUBEL e EDELSTEIN, 2016).

Fígado X modulação do balanço oxidativo sistêmico

O tecido hepático gera níveis baixos de EROs, o ânion radical superóxido na mitocôndria, e peróxido de hidrogênio como uma função normal das várias oxidases. Isso ocorre pelos diversos processos metabólicos que o fígado desempenha. Cada hepatócito expressa SOD, glutathione peroxidase, CAT, tioredoxinas e peroxiredoxinas e contém glutathione em todos os compartimentos celulares, além de manter íons de ferro redox-ativos ligados a proteína de armazenamento ou de transporte. Além do mais, a glutathione parece ser o principal antioxidante hepático e/ou o mais precoce em exercer essa função (HORTON e BROWNING, 2004; CHEN et al., 2013). Por esse motivo o fígado passa a ser um sistema de defesa importante contra o acúmulo de EROs,

prevenindo assim o estresse oxidativo. Devido a isso, uma lesão hepática pode prejudicar essa função (RAMACHANDRAN et al., 2011).

As células de kupffer (CK), são os macrófagos residentes no fígado, e representam o maior conjunto de macrófagos do corpo. Estão localizadas no lume dos sinusóides hepáticos, por cima das células endoteliais. Tem característica heterogênea, algumas vezes apresentando extensões para dentro do espaço existente entre a camada de células endoteliais e hepatócitos.

São as primeiras células do sistema fagocítico e encontram material antigênico proveniente do trato gastrointestinal. Mesmo sua capacidade de processamento de antígenos ser bem menor do que a de outros macrófagos, elas são altamente fagocíticas, atuando como ativos sequestradores na defesa do hospedeiro. Daí sua importância no processamento de endotoxinas (KAWSER et al 1998). Quando essas células entram em contato com material fagcitável ocorre um “burst” oxidativo, tendo como o principal produto desse processo o radical ânion superóxido (ARLT e DIETER, 1993).

A NADPH oxidase é a enzima que catalisa a produção de ânion superóxido nas CK durante a fagocitose, assim como em outros fagócitos, que só torna-se ativa após o estímulo, momento em que a NADPH oxidase é montado na membrana plasmática dessas células (ARLT e DIETER, 1993). A ativação dessa enzima é responsável pelo aumento de consumo de O_2 por fagócitos ativados. O aumento NADPH oxidase ativa a $NADP^+$, que por sua vez ativa a via das pentoses, onde o NADPH é regenerado. O ânion superóxido, formado pela NADPH oxidase, é rapidamente convertido em outras espécies reativas, como H_2O_2 e HO , que são, em conjunto com proteínas liberadas dos grânulos citoplasmáticos, responsáveis por lesar microorganismos e o tecido circundante (McPhail e harvath, 1993). A regulação da fosfolipase C ativa a proteína C e altera o fluxo intracelular de cálcio, esses processos de sinalização celular estão envolvidos na ativação da NADPH oxidase das CK (DIETER e FITZKE, 1993).

O NO produzido dentro do sinusóide hepático tem ação relaxante no endotélio, desempenhando uma ação na regulação do fluxo sanguíneo hepático. Por outro lado, esta produção de NO pelas CK também tem um papel citotóxico, pois juntamente com o ânion superóxido produzido pela NADPH oxidase pode formar um potente oxidante, o peroxinitrito. Na necrose hepática há liberação de EROs, prostaglandinas e leucotrienos, de citocinas e enzimas proteolíticas lisossomais, sugerindo que as CK possam ter um papel patológico direto ou indireto no dano tecidual.

Muitos modelos de lesão hepática, como os induzidos por endotoxinas ou IR, fornecem evidências dessa função (WINWOOD e ARTHUR, 1998). No caso da IR hepática há evidências da produção $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, EROs que desencadeiam uma cascata inflamatória e apoptose celular (SELZNER et al., 2003; PERALTA et al., 2013; WANG et al., 2021) produzida pelas CK que podem interagir com o hepatócito interferindo no fluxo de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, estimulando ainda mais a produção de EROs (CUTRIN et al., 1998). Diante disso, durante uma lesão hepática há uma elevação de aglomerados de CK tornando essas células um importante alvo terapêutico (Wang L. et al., 2021).

O direcionamento correto da IR continua sendo um grande problema na prática clínica. A IR ativa as CK, e elas quando ativadas podem ser polarizadas em dois subtipos. A CK do tipo M1 (pró-inflamatória) e as CK do tipo M2 (anti-inflamatória). Os efeitos da CK na apoptose decorrente da IR são controversos. Mas sabe-se que a IL-10 desempenha um papel para amenizar a IR do fígado, provavelmente através da regulação da apoptose das CK, bem como da modificação de sua polarização (YE et al., 2020).

3. JUSTIFICATIVA

As doenças não-comunicáveis compõem 7 das 10 principais causas de morte no mundo. Nessa lista estão incluídas afecções do sistema cardiovascular, renal e hepático. A isquemia-reperfusão renal é um evento que pode ser deflagrado por inúmeras situações clínicas e pode estabelecer um quadro de lesão renal aguda (LRA), que por sua vez, é um fator de risco para pior prognóstico clínico. A LRA pode sensibilizar o rim ao desenvolvimento de lesões adicionais posteriores e levar a uma cronificação da doença, e também pode promover o surgimento de lesões em órgãos distantes. A deposição de matriz extracelular é um processo-chave na cronificação da injúria renal, que é modulado pelo sistema imune e pelo balanço-redox. Esses dois últimos elementos também podem apresentar um papel relevante em mecanismos de disfunção hepática e cardíaca.

Dessa forma, é importante que se estude mais profundamente o impacto da imunomodulação e da inibição da produção de espécies reativas do oxigênio sobre mecanismos moduladores da deposição de matriz extracelular em modelos animais de LRA induzida por isquemia-reperfusão, bem como investigar o possível papel protetor sobre lesões em órgãos distantes, tal qual coração e fígado.

4. OBJETIVOS

Geral

Investigar, em ratos, o impacto da isquemia-reperfusão renal em vias modulatórias da deposição de matriz extracelular renal, em mecanismos associados à lesão cardíaca e hepática, bem como, os efeitos do tratamento com um imunossupressor e com um inibidor da NADPH oxidase.

Objetivos específicos

Investigar em ratos Wistar adultos submetidos à lesão renal aguda (LRA) por isquemia renal bilateral seguida de 24h de reperfusão, na presença e ausência de tratamento prévio com apocinina (inibidor da NADPH oxidase) ou micofenolato de mofetila (imunossupressor):

Marcadores séricos de lesão/função renal;

Estresse oxidativo renal;

Produção renal *in situ* de radicais livres;

Atividade e conteúdo proteico das MMP-2 e 9 no córtex renal;

Conteúdo proteico da TIMP 1 e 2, TGF- β e nefrina no córtex renal;

Imunodeteção de α -SMA no córtex renal;

4.2.1.7. Deposição de colágeno no túbulo intersticial e no glomérulo renal.

Avaliar, em ratos Wistar, a repercussão da LRA induzida por isquemia-reperfusão renal bilateral na indução de alterações cardíacas e hepáticas, bem como o impacto do tratamento prévio com apocinina (inibidor da NADPH oxidase) ou micofenolato de mofetila (imunossupressor):

Marcadores séricos de lesão cardíaca;

Marcadores séricos de lesão hepática;

Atividade das ATPases transportadoras de Na^+ e Ca^{2+} no ventrículo esquerdo;

Estresse oxidativo no ventrículo esquerdo e fígado;

Atividade da NADPH oxidase, da SOD e da catalase no ventrículo esquerdo e fígado.

5. REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, R.S. Protective effect of apocynin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 37, n.1, p. 27-37, 2017.
- ALLISON, A.C. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. **Lupus**, v. 14, p.2-8, 2005.
- ALTENHÖFER S. et al. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. **Antioxid Redox Signal**, v. 23, n. 5, p. 406-27, 2015.
- ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 39, p. 6540, 2013.
- AMINI, N. et al. Protective effects of naringin and trimetazidine on remote effect of acute renal injury on oxidative stress and myocardial injury through Nrf-2 regulation. **Pharmacol Rep.**, v. 71, n. 6, p. 1059-1066, 2019.
- ARRELLANO, J.L.P. Manual de Patologia Geral, Sisínio de Castro. 7ª Ed. Elsevier Masson, 2013.
- ARLT, U.; DIETER, P. Characterization of NADPH oxidase in rat liver macrophages. **Cells of the hepatic sinusoid**, v. 4, p. 45-47. 1993.
- ASABA, K. et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. **Kidney Int**, v. 67, n. 5, p. 1890-8, 2005.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.
- AWAD, A.S. et al. Compartmentalization of neutrophils in the renal and lung following technology ischemic graves. **Kidney Int**, v. 75, p. 689-698, 2009.
- BADID, C. et al. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. **Histology & Histopathology**, v. 15, p. 269-280, 2000.
- BAGSHAW, S.M. et al. Acute kidney in critical illness. **Can J Anaesth**, v. 57, n. 11, p. 985-998, 2010.
- BAGSHAW, S.M. et al. A multi-centre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, n. 4, p. 1203-1210, 2008.
- BACH, P. H. Acute renal failure associated with occupational and environmental settings. Acute renal failure: a companion to Brenner and Rector's the kidney, 1st edn. **Philadelphia: WB Saunders**, p. 414-24, 2001.
- BAGHIROVA, S. et al. Nuclear matrix metalloproteinase-2 in the cardiomyocyte and the ischemic-reperfused heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 94, p. 153-161, 2016.

- BAKKER, P.J. et al. Mediates Remote Liver Injury following Severe Renal Ischemia Reperfusion. **PLoS One**, v. 10, n. 9, 2015.
- BROWNING, J.D.; HORTON, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 147-52, 2004.
- BAUDOUIN, V. et al. Mycophenolate mofetil for steroid-dependent nephrotic syndrome: A phase II Bayesian trial. **Pediatr Nephrol**, v. 27, p. 389–96, 2012.
- BARDAWEEL, S.K. et al. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. **Eurasian Journal of Medicine**, v. 50, n. 3, p. 193-201, 2018.
- BARROS, S. S. L. V. Expressão imuno-histoquímica de metaloproteinases em carcinomas epidermoide de lábio inferior e língua. 2006. 130 p. **Tese (Doutorado em Patologia)**-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.
- BAEK, J.H. et al. IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. **J Clin Invest**, v. 125, p. 3198-3214, 2015.
- BEN YOSEF, Y. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. **Circ.Res.** v. 90, p. 784–791, 2002.
- BERGERS, G. Efeitos dos inibidores da angiogênese na multistagecarcinogênese em camundongos. **Science**, v.284, p. 808-812, 1999.
- BERGMEYER, Bowers and cols., **Clin. Chim., Acta.**, 1.976, 70, 19 - 42, , 21 1977
- BLANTZ, R.C. Pathophysiology of pre-renal azotemia. **Kidney Int**, v. 53, p. 512–23, 1998.
- BONVENTRE, J.V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. **Kidney Int**, v. 43, p. 1160–78, 1993.
- BONVENTRE, J.V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J Clin Invest**, 2 v. 121, n. 11, p. 4210-4221, 2011.
- BOROS, P.; BROMBERG J.S. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. **Am J Transplant**, v. 6, n. 4, p. 652-658, 2006.
- BREZIS M.; ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. **N Engl J Med**, v. 332, p.647–55, 1995.
- BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam**, v. 1803, n. 1, p. 55-71, 2010.
- BERRY, M.; CLATWORTHY, M.R. Immunotherapy for acute kidney injury. **Immunotherapy**, v. 4, p. 323–334, 2012.
- BETTAIEB, A. et al. Hepatocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 4 regulates stress signaling, fibrosis, and insulin sensitivity during development of steatohepatitis in mice. **Gastroenterology**, v. 149, n. 2, p. 468–480, 2015.

BRYK, D.; OLEJARZ, W.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D. Rola stresu oksydacyjnego i oksydazy NADPH w patogenezie miażdżycy. **Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 71, 2017.

BROWN, M.A.; JONES, W.K. NF- κ B action in sepsis: the innate immune system and the heart. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 1201-1217, 2004.

BRITO, R. et al. Oxidative stress in hypertension: mechanisms and therapeutic opportunities. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, p. 123, n. 6, p. 325–335, 2015.

BONVENTRE, J.V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?. **Kidney international**, v. 66, n. 2, p. 480-5, 2004.

BURDUK, P.K. et al. Expression of metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors 1 and 2 as predictors of lymph node metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **European Conference on Head and Neck Oncology in Poznan, Poland**, p. 18–21, 2012.

CAI, H.; GRIENDLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 471–478, 2003.

CAI, S.M. et al. Angiotensin-(1-7) improves liver fibrosis by regulating the NLRP3 inflammasome via redox balance modulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 24, n. 14, p. 795–81, 2016.

CANTELE, C. F; LANARO, R. Biochemical Indicators of Acute Myocardial Infarction. **Revista Ciências em Saúde**, v. 1, n. 3, 2011.

CAO Y. W.; JIANG, Y.; ZHANG, D. Y., et al. Protective effects of *Penthorum chinense* Pursh against chronic ethanol-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 92–98, 2015.

CARILLO, C. et al. Evaluation of renal function in patients undergoing lung transplantation. **Transplant Proc**, v. 49, p. 699–701, 2017.

CHANG, B. et al. Nitric oxide in obstructive uropathy: role of endothelial nitric oxide synthase. **J Urol**, v. 168, p. 1801-4, 2002.

CHAMORRO, A.M.D. et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **Lancet neurology**, v. 15, n. 8, p. 869–881, 2016.

CHATTERJEE, P.K. et al. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. **Cardiovascular research**, v. 61, n. 3, p. 630-643, 2004.

CHAWLA, L.S.; KIMMEL, P.L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. **Kidney Int**, v. 82, p. 516–524, 2002.

CHEN, Y. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. **Food Chem Toxicol**, v. 60, p. 38-44, 2013.

CHEN, G.Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat. Rev. Immunol**, v. 10, p. 826–837, 2010.

- CHENG, Z. et al. MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 4, p. 776, 2017.
- CHEN, Q. et al. Longitudinal Changes in Liver Aminotransferases Predict Metabolic Syndrome in Chinese Patients with Nonviral Hepatitis. **Biomed Environ Sci**, 2016; v. 2, n. 4, p. 254-266, 2016.
- CHENG, X. et al. Apocynin attenuates renal fibrosis via inhibition of NOXs-ROS-ERK-myofibroblast accumulation in UUO rats. **Free Radic Res**, v. 50, n. 8, p. 840-52, 2016.
- CHOUCHANI, E.T. et al. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. **Cell Metab**, v. 23, n. 2, p. 254–263, 2016.
- CHOI, E.K. et al. Effects of allopurinol and apocynin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Transplant Proc**, v. 47, n. 6, p. 1633–1638, 2015.
- CHUANG, P.Y.; MENON, M.C.; HE, J.C. Molecular targets for treatment of kidney fibrosis. **J Mol Med (Berl)**, v. 91, n. 5, p. 549-59, 2013.
- CHUNG, H.Y. et al. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. **Age (Omaha)**, v. 20, n. 3, p. 127-40, 1997.
- CIFUENTES-PAGANO, E.; MEIJLES, D.N.; PAGANO, P.J. The quest for selective Nox inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls. **Antioxid. Redox. Signal.** v. 20, n. 17, p. 2741–2754, 2014.
- CIZ, M. et al. Ischemiareperfusion injury of rat small intestine: The effect of allopurinol dosage. **Transplant Proc**, v. 33, p. 2871-3, 2001.
- CLEF, N.L. Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. **PLoS One**, v. 11, n. 3, 2016.
- COATES, P. Liver function tests. **Australian Family Physician**, v. 40, n. 3, p. 113–115, 2011.
- COCA, S.G.; SINGANAMALA, S.; PARIKH, C.R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Kidney International**, v. 81, n. 5, p. 442-448, 2012.
- CONNELLY, K.A. et al., Dipeptidyl peptidase-4 inhibition improves left ventricular function in chronic kidney disease, **Clin. Invest. Med. Med. Clin. Exp.** v. 37, 2014.
- CREEMERS, E.E. et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? **Circ Res**, v. 89, n. 3, p. 201-10, 2001.
- CONDE, E. et al. HIF-1 α induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p. **Sci Rep**, v. 7, n. 41099, 2017.
- CONTI-RAMSDEN, F.I. et al. Pregnancy-Related Acute Kidney Injury in Preeclampsia. **Hypertension**, v. 74, n. 5, p. 1144-1151, 2019.

CRUZ-ÁLVAREZ, S. et al. Apocynin protects against neurological damage induced by quinolinic acid by an increase in glutathione synthesis and Nrf2 levels. **Neuroscience**, v. 350, p. 65-74, 2017.

CORTES, A.L. et al. Protective Outcomes of Low-Dose Doxycycline on Renal Function of Wistar Rats Subjected to Acute ischemia/reperfusion Injury. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 1, p. 102-114, 2018.

COSTA, C.A. et al. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, v. 22, n. 12, p. 1242-9, 2009.

CUTRIN, J. C. et al. Primary role of Kupffer cell-hepatocyte communication in the expression of oxidative stress in the post-ischaemic liver. **Cell Biochem. Funct.**, v. 16, p. 65-72, 1998.

CZAJA, A.J. Autoimmune hepatitis: focusing on treatments other than steroids. **Can J Gastroenterol.**, v. 26, n. 9, p. 615-20, 2012.

DANOBEITIA, S; DJAMILI, A; FERNANDEZ, L.A. The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 7, n. 1, p. 16, 2014.

DAS, U.N. Nutritional factors in the pathobiology of human essential hypertension. **Nutrition**, v.17, n. 4, p. 337-46, 2001.

DAY, Y. J. et al. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4⁺ T cells and IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3108-3114, 2006.

DELGADO-VALERO, B.; CACHOFEIRO, V.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E. Fibrosis, the Bad Actor in Cardiorenal Syndromes: Mechanisms Involved. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1824, 2021.

DESWAL, A. et al. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST) **Circulation**, v. 103, p. 2055–2059, 2001.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J. Am. Soc. Nephrol.** 17:1503–1520, 2006.

DI LULLO, L. et al. Cardiorenal syndrome in acute kidney injury. In: Seminars in nephrology. **WB Saunders**, p. 31-40, 2019.

DIETER, P.; FITZKE, E. Relationship between intracellular changes of Ph and calcium, activation of phospholipase C and protein kinase C and the synthesis and release of eicosanoids and superoxid in cultured rat Kupffer Cells. **Cells of the Hepatic Sinusoid**, v. 4, p. 8-12, 1993.

DILLON, J.J. Nephrotoxicity from antibacterial, antifungal, and antiviral drugs. In: Molitoris BA, Finn WF, eds. Acute renal failure: a companion to Brenner and Rector's the kidney. **WB Saunders**, v.1, p. 349–64, 2001.

DI LULLO L.; RIVERA, R.; RONCO, C. Sudden cardiac death and chronic kidney disease: from pathophysiology to treatment strategies. **Int. J. Cardiol.**, v. 217, p. 16–27, 2016.

DUBIN, A; LATTANZIO, B; GATTI, L. The spectrum of cardiovascular effects of dobutamina – from healthy subjects to septic shock patients. **Rev. Bras. Ter. Intensiva.** v. 29, n. 4, p. 490-498. 2017.

DUFFIELD, J.S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. **J Clin Invest**, v.124, p. 2299–2306, 2014.

EDDY, A.A. The origin of scar-forming kidney myofibroblasts. **Nat Med**, v. 19, p. 964–966, 2013.

EHRMAN, R.R. et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature. **Crit Care**, v. 22, n. 1, p. 112, 2018.

ELTZSCHIG, H.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. **Nat Med**, v. 17, p. 1391–1401, 2011.

ELSHAZLY, S.; SOLIMAN, E. PPAR gamma agonist, pioglitazone, rescues liver damage induced by renal ischemia/reperfusion injury. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 362, p. 86-94, 2019.

EVENEPOEL, P. Acute toxic renal failure. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, p. 37–52, 2004.

FAN, L.M. et al. Aging-associated metabolic disorder induces Nox2 activation and oxidative damage of endothelial function. **Free Radic Biol Med**, v. 108, p. 940–951, 2017.

FARAG, M.M. et al. Hepatorenal protection in renal ischemia/reperfusion by celecoxib and pentoxifylline. **J Surg Res**, v. 20, n. 1, p. 183-91, 2016.

FARRIS, A.B.; COLVIN, R.B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 21, n. 3, p. 289-300, 2012.

FAUBEL, S.; EDELSTEIN, C.L. Mechanisms and mediators of lung injury after acute kidney injury. **Nat Rev Nephrol**, v. 12, n. 1, p. 48-60, 2016.

FENG, W. et al. Apocynin attenuates angiotensin II-induced vascular smooth muscle cells osteogenic switching via suppressing extracellular signal-regulated kinase 1/2. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 83588–83600, 2016.

FINGLETON, B. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. **Curr Pharm Des**, v. 13, n. 3, p. 333-46, 2007.

FISCHER, A. et al. Mycophenolate mofetil improves lung function in connective tissue disease-associated interstitial lung disease. **J. Rheumatol**, v. 40, n. 5, p. 640–646, 2013.

FUJII, K. et al. Xanthine oxidase inhibitor ameliorates postischemic renal injury in mice by promoting resynthesis of adenine nucleotides. **JCI Insight**, v.4, n. 22, 2019.

- GAI, Z. et al. Farnesoid X receptor activation protects the kidney from ischemia-reperfusion damage. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9815, 2017.
- GAJEWSKA, Z.G. e GRZYBOWSKI, J. Analysis of an industrial smoke preparation. **Bromatologia i Chemia Toksykologiczna**, v. 14, p. 3–4, 1981.
- GANDOLFO, M.T. et al. Mycophenolate mofetil modifies kidney tubular injury and Foxp3⁺ regulatory T cell trafficking during recovery from experimental ischemia-reperfusion. **Transplant Immunology**, v. 23, n. 1-2, p. 45–52, 2010.
- GAO, D. et al. Pterostilbene protects against acute renal ischemia reperfusion injury and inhibits oxidative stress, inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in rats via the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway. **Exp Ther Med**, v. 15, n. 1, p. 1029–1035, 2018.
- GASTON, R. S. Current and evolving immunosuppressive regimens in kidney transplantation. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 47, n. 4, p. 3-21, 2006.
- GRAMS, M.E.; RABB H. The distant organ effects of acute kidney injury. **Kidney Int**, v. 81, n. 10, p. 942-948, 2012.
- GELDER, T.V.; HESSELINK, D.A. Mycophenolate revisited. **Transpl Int**, v. 28, n. 5, p. 508-15, 2015.
- GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P.E. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, n. 3, p. 257-79, 2012.
- GHOLAMPOUR, F.; KEIKHA, S. Berberine protects the liver and kidney against functional disorders and histological damages induced by ferrous sulfate. **Iran J Basic Med Sci**. v. 21, n. 5, p. 476-482, 2018.
- GHOLAMPOUR, F.; SADIDI, Z. Hepatorenal protection during renal ischemia by quercetin and remote ischemic preconditioning. **J Surg Res.**, v. 231, p. 224-233, 2018.
- GOLAB, F. et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. **Kidney Int.**, v. 75, n. 8, p. 783–792, 2009.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: **Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2006, 357p.
- GRANGERA, D.N.; KVIETYS, P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p.524-551, 2015.
- GOLIGORSKY, M.S.; NOIRI, E. Duality of nitric oxide in acute renal injury. **Semin Nephrol**, v. 19, p. 263–71, 1999.
- GORIN, Y.; BLOCK, K. Nox as a target for diabetic complications. **Clin Sci (Lond)**, v. 125, n. 8, p. 361-82, 2013.

GODDARD, C.M. et al. Myocardial morphometric changes related to decreased contractility after endotoxin. **Am. J. Physiol.**, v. 270.1446-1452, 1996.

GOUMENOS, D.S. et al. Transforming growth factor-beta1 in kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. **Nephrol Dial Transplant**, v.17, n.1, p.2145-2152, 2002.

GRANGER, D.N. e KVIETYS, P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. **Redox biology**, v. 6, p. 524-551, 2015.

GELEIJNSE, J.M. et al. Reduction in blood pressure with a low sodium, high potassium, high magnesium salt in older subjects with mild to moderate hypertension. **BMJ.**, v. 309, n. 6952, p. 436-40, 1994.

GUELER, F. et al. Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, p. 2302–2312, 2008.

GULEC, B. et al. Ischemiareperfusion injury in the liver during renal transplantation: does perfusion solution play any role? **Transplant Proc**, v. 40, p. 59–62, 2008.

GUT, A.L. et al. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and β -adrenergic system changes. **Nutrition Research**, v. 23, n. 7, p. 911-919, 2003.

GUO, M. et al. Biochanin A provides neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by Nrf2-mediated inhibition of oxidative stress and inflammation signaling pathway in rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 25, p. 8975, 2019.

HAF AZEH, L. et al. Stem Cell Therapy Ameliorates Ischemia-reperfusion Induced Kidney Injury After 24 Hours Reperfusion. **Iran J Kidney Dis**, v. 13, n. 6, p. 380-388, 2019.

HAGA, Y. et al. Disruption of xanthine oxidoreductase gene attenuates renal ischemia reperfusion injury in mice. **Life Sci**, v. 1, n. 182, p. 73-79, 2017.

HANLEY, M. J. Isolated nephron segments in a rabbit model of ischemic acute renal failure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 239, p. 17-23, 1980.

HARADA, N. et al. Adenosine and selective A2A receptor agonists reduce ischemia/reperfusion injury of rat liver mainly by inhibiting leukocyte activation. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 294, p. 1034–1042, 2000.

HE, L.A. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 532–553, 2017.

HEO, D. S. et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict lymph node metastasis in breast cancer patients. **Oncology Reports**, v. 31, n. 4, p. 1567-1572, 2014.

HEUMÜLLER, S. et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211-7, 2008.

HEUNG, M. e CHAWLA, L.S. Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 21, p. 628–634, 2012.

HEUNG M. et al. Centers for Disease Control and Prevention CKD Surveillance Team. Acute Kidney Injury Recovery Pattern and Subsequent Risk of CKD: An Analysis of Veterans Health Administration Data. **Am J Kidney Dis**, v. 67, p. 742-52, 2016.

HOSTE, E.A. et al. Acute renal failure in patients with sepsis in a surgical ICU: predictive factors, incidence, comorbidity, and outcome. **J Am Soc Nephrol**, 2v. 14, p. 1022–30, 2003.

HOUGEE, S. et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, n. 1–3, p. 264–269, 2006.

HIRSCH, J.S. et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. **Kidney Int**, v. 98, n. 1, p. 209–218, 2020.

HRABEC, E. et al. Collagenases IV (MMP-2 and MMP9) and their substrates – intracellular proteins, cytokines, chemokines and their receptors. **Postepy Biochemii**, v. 53, n.1, p. 37-45, 2007.

HSU, H.T. et al. Resveratrol prevents nanoparticles-induced inflammation and oxidative stress via downregulation of PKC- α and NADPH oxidase in lung epithelial A549 cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 18, p. 211, 2018.

HU, B. et al. Apocynin Alleviates Renal Ischemia/Reperfusion Injury Through Regulating the Level of Zinc and Metallothionein. **Biol Trace Elem Res**, v. 178, n. 1, p. 71-78, 2017.

HUMPHREYS, B.D. et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Am J Pathol**, v. 176, n. 1, p. 85-97, 2010.

HUSAIN-SYED, F.; ROSNER, M.H.; RONCO, C. Distant organ dysfunction in acute kidney injury. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 228, n. 2, 2020.

ICOGLU AKSAKAL F. et al. Ameliorative effect of umbelliferone in remote organ injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. **J Food Biochem**, v. 45, n.2, 2021.

JANG, H.R. et al. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney. **J Mol Med**, v. 87, p. 859–864, 2009.

JANG, H.R.; RABB, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. **Clin Immunol**, v. 130, n. 1, p. 41-50, 2009.

JANG, H.R. et al. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney. **J Mol Med**, v. 87, p. 859–864, 2009.

JANG, H.S. et al. Recruitment and subsequent proliferation of bone marrow-derived cells in the postischemic kidney are important to the progression of fibrosis. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 306, n. 12, p. 1451-61, 2014.

JHA, A.R. et al. Shared Genetic Signals of Hypoxia Adaptation in Drosophila and in High-Altitude Human Populations. **Mol. Biol. Evol.**, v. 33, n. 2, p. 501—517, 2016.

JOHNSTON, P. A.; RENNKE, H.; LEVINSKY, N.G. Recovery of proximal tubular function from ischemic injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 246, p. 159-166, 1984.

JOHNSON, D. K. et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v. 9, n. 3, p. 191–203, 2002.

JOSHI, S.; KHAN, S.R. NADPH oxidase: a therapeutic target for hyperoxaluria-induced oxidative stress - an update. **Future Med Chem**, v. 11, n. 23, p. 2975-2978, 2019.

KADKHODAEI, M. et al. Effects of different periods of renal ischemia on liver as a remote organ. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 9, p. 1113-8, 2009.

KADKHODAEI, M. et al. Effects of different periods of Sedaghat Z et al. organ. **World J Gastroenterol**, v. 15, p. 1113–1118, 2009.

KHASTAR, H. et al. Leukocyte involvement in renal reperfusion-induced liver damage. **Ren Fail**, v. 33, n. 1, p. 79-83, 2011.

KALEMBEYI, I. et al. Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor β 1. **Int J Cancer**, v. 105, p. 53-60, 2003.

KAR, F. et al. In Vivo Assessment of the Effect of Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles on Biochemical, Histopathological, Oxidant and Antioxidant Status. **Journal of Cluster Science**, 2020.

KARIM, A.S. et al. Nox2 is a mediator of ischemia reperfusion injury. **Am J Transplant.**, v.15, n. 11, p. 2888-99, 2015.

KARANOVIC, D. et al. Effects of Single and Combined Losartan and Tempol Treatments on Oxidative Stress, Kidney Structure and Function in Spontaneously Hypertensive Rats with Early Course of Proteinuric Nephropathy. **Plos One**, v. 11, n. 8, p. 53-60, 2016.

KAKIHANA, Y. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **J Intensive Care.**, v. 23, n. 4, p. 22, 2016.

KATADA, K. et al. Hindlimb Ischemia/Reperfusion-Induced Remote Injury to the Small Intestine: Role of Inducible Nitric-Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, n. 3, p. 919-27, 2009.

KATO, N. et al. The E-selectin ligand basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/ reperfusion, **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, 1565–1576, 2009.

KAWSER, C. A. et al. Rat hepatic stellate cell expression of alpha2-macroglobulin is a feature of cellular activation: implications for matrix remodelling in hepatic fibrosis. **Clin Sci**, v. 95, n. 2, p. 179-86, 1998.

KHALID, U. et al. A Localized Ischemic Preconditioning Regimen Increases Tumor Necrosis Factor α Expression in a Rat Model of Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. **Exp Clin Transplant**, v. 13, n. 6, p. 535-42, 2015.

KRATZ, A.; LEWANDROWSKI, K.B.; SIEGEL, A.J. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. **Am J Clin Pathol**, v. 118, p. 856–63, 2002.

KEELING, J.; HERRERA, G.A. Human matrix metalloproteinases: characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis. **Microsc Res Tech**, v.71, n.1, p. 371-379, 2008.

KELLUM, J.A.; UNRUH, M.L.; MURUGAN, R. Acute kidney injury. **BMJ Clin.Evid**, v. 2001, n. 2001, 2011.

KELLUN, J.A.; MURUGAN, R. Effects of non-severe acute kidney injury on clinical outcomes in critically ill patients. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p.159, 2016.

KEZIC, A. et al. Mitochondria-targeted antioxidants: future perspectives in kidney ischemia reperfusion injury. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

KIM, J. e PADANILAM, B.J. Renal denervation prevents long-term sequelae of ischemic renal injury. **Kidney Int**, v. 87, n. 2, p. 350-8, 2015.

KITADA, M. et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C- β activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 52, p. 2603–2614, 2003.

KRATZ, A.; LEWANDROWSKI, K. B.; SIEGEL, A. J. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. **Am J Clin Pathol.**, v. 118, p. 856–63, 2002.

KOBUSIAK-PROKOPOWICZ, M. et al. MMP-2 and TIMP-2 in Patients with Heart Failure and Chronic Kidney Disease. **Open Med**, v. 13, p. 237–246, 2018.

KOCAK, Z. et al. Modulation of oxidative/nitrosative stress and inflammatory response by rapamycin in target and distant organs in rats exposed to hindlimb ischemia/reperfusion: The role of mTOR. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 97, n.12, 2019.

KOTANKO, P. Cause and consequences of sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease. **Blood Purif.**, v. 24, p. 95–99, 2006.

KOVACIC, P. et al. Natural monophenols as therapeutics, antioxidants and toxins; electron transfer, radicals and oxidative stress. **The Natural Products Journal**, v. 5, n. 3, p. 142-151, 2015.

KOCAK, Z. et al. Modulation of oxidative-nitrosative stress and inflammatory response by rapamycin in target and distant organs in rats exposed to hindlimb ischemia-reperfusion: the role of mammalian target of rapamycin. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 97, n. 12, p. 1193-1203, 2019.

KUPAI K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zimography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, p. 205-209, 2010.

KURIAN G. A. et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.14, 2016.

LAFFEBER, F. P. J. G. et al. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 38, n. 11, p. 1088–1093, 1999.

LAMIERE, N.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. **The Lancet**, v. 365, n. 9457, p. 417–430, 2005.

LAN, T.; KISSELEVA, T.; BRENNER, D.A. Deficiency of NOX1 or NOX4 prevents liver inflammation and fibrosis in mice through inhibition of hepatic stellate cell activation. **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015.

LANE, K. et al. Renohepatic crosstalk: does acute kidney injury cause liver dysfunction? **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, n. 7, p. 1634-1647, 2013.

LEBLEU, V.S. et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Nat Med**, v. 19, n. 8, p.1047-53, 2013.

LECH, M. et al. Macrophage phenotype controls longterm AKI outcomes–kidney regeneration versus atrophy. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, p. 292–304, 2014.

LEE, S.Y.; KIM, S.I.; CHOI, M.E. Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. **Translational Research**, v. 14, p. 1931-5244, 2015.

LEE, S.A. et al. Distant Organ Dysfunction in Acute Kidney Injury: A Review. **Am J Kidney Dis.**, v.72, n. 6, p. 846-856, 2018.

LEINONEN, J. V. Structural and Functional Support by Left Atrial Appendage Transplant to the Left Ventricle after a Myocardial Infarction. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 9, p. 4661, 2022.

LELCUK, S. et al. Prostacyclin and thromboxane A2 moderate postischemic renal failure. **Surgery**, v. 98, n. 207, 1985.

LEVEY, A. S. et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Annals of internal medicine**, v. 139, p. 137-147, 2003.

LEVEY, A.S.; CORESH, J. Chronic kidney disease. **Lancet**, v. 379, n. 9811, p. 165-80, 2012.

LI, K.; ZHOU, W. Anaphylatoxins in organ transplantation. **Semin Immunol**, v. 25, p. 20–28, 2013.

LI, C.; JACKSON, R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 282, n. 2, p. C227-41, 2002.

LI, Y. et al. Picroside II attenuates ischemia/reperfusion testicular injury by alleviating oxidative stress and apoptosis through reducing nitric oxide synthesis. **Acta Cir Bras**, v. 34, n. 11, 2019.

LIANG, H. et al. Pharmacological inhibition of Rac1 exerts a protective role in ischemia/reperfusion-induced renal fibrosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, p. 2517e2523, 2018.

LIM, H.S. et al. Clinical management of atrial fibrillation - rate control versus rhythm control. **Crit Care**, v. 8, n. 4, p. 271-9, 2004.

LIPKA, D.; BORATYŃSKI, J. [Metalloproteinases. Structure and function]. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 62, p. 328-336, 2008.

LIU, Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. **J Am Soc Nephrol**, v.15, n.1, p.1-12, 2004.

LIPTON, B.; DELCARPIO, J.; MCDONOUGH, K. Effects of endotoxin on neutrophil-mediated ischemia/reperfusion injury in the rat heart in vivo. **Exp Biol Med.**, v. 226, p. 320–327, 2001.

LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. **Nat Rev Nephrol**, v. 7, p. 684–696, 2011.

LIU, Y. et al. Sepsis-induced cardiomyopathy: mechanisms and treatments. **Front. Immunol.**, v.8, n. 1021, p. 1-8. 2017.

LIU, F.C.; TSAI, H.; YU, H.P. Organ-Protective Effects of Red Wine Extract, Resveratrol, in Oxidative Stress-Mediated Reperfusion Injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 5, n. 568634, 2015.

LIU Y. et al. CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. **Hepatology International**, v. 11, n. 3, p. 221–241, 2017.

LIU, Y. Shengzhong et al. Allicin Attenuates Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats by Inhibition of Inflammation and Oxidative Stress. **In: Transplantation proceedings**, p. 2060-2065, 2019.

LO, W. et al. NADPH oxidase inhibition improves neurological outcomes in surgically-induced brain injury. **Neuroscience Letters**, v. 414, n. 3, p. 228–232, 2007.

- LOEWE, A. et al. Patient-Specific Identification of Atrial Flutter Vulnerability-A Computational Approach to Reveal Latent Reentry Pathways. **Front Physiol.**, v. 9, n. 1910, 2019.
- LOU, Z. et al. Salviaolate Protects Rat Brain from Ischemia-Reperfusion Injury through Inhibition of NADPH Oxidase. **Planta Med.**, v. 81, n. 15, p. 1361-9, 2015.
- LU, Z. et al. Evaluation of Mycophenolate Mofetil and Low Dose Steroid Combined Therapy in Moderately Severe Henoch-Schönlein Purpura Nephritis. **Med Sci Monit.**, v. 23, p. 2333-2339, 2017.
- LUANGMONKONG, T. et al. Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.**, v. 175, p. 71-102, 2018.
- LUCHTEFELD, R. et al. Dose formulation and analysis of diapocynin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 301–306, 2008.
- LUTZ, J. et al. Inibição de metaloproteinases de matriz durante a nefropatia de aloenxerto crônica em ratos. **Transplantation**, v. 79, p. 655-661, 2005.
- LV, X; WANG, H. Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction. **Military Med. Res.**, v. 3, n. 30, 2016.
- MA, M.W. et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. **Mol Neurodegener.**, v. 12, n. 1, p. 7, 2017.
- MAHMOUD, I.M. et al. Role of Combined L-Arginine and Prostaglandin E¹ in Renal Ischemia Reperfusion Injury. **Nephron Physiology**, v. 105, p. 57–65, 2007.
- MALEK, M.; MEHDI, N. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of renal injury prevention**, vol. 4, n. 2, p. 20-7, 2015.
- MANNELLO, F.; MEDDA, V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. **Progress in Hist and Cytoc**, v. 47, p. 27-58, 2012.
- MARTIN, J. et al. Induction of metalloproteinases by glomerular mesangial cells stimulated by proteins of the extracellular matrix. **Journal of The American Society of Nephrology**, v. 12, p. 88–96, 2001.
- MATTSON, D.L. Infiltrating immune cells in the kidney in salt-sensitive hypertension and renal injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 307, p. F499–F508, 2014.
- MC DONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-366, 2010.
- MENG, X.M.; NIKOLIC-PATERSON, D.J.; LAN, H.Y. Inflammatory processes in renal fibrosis. **Nat Rev Nephrol**, v. 10, n. 9, p. 493-503, 2014.
- MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage, **Carcinogenesis**, v. 21, p. 361–370, 2000.

- MARTIN, M, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. **Nat Immunol**, v. 6, n. 8, p. 777-84, 2005.
- MATSUMOTO, H. et al. Blockade of tumor necrosis factor- α -converting enzyme improves experimental small intestinal damage by decreasing matrix metalloproteinase-3 production in rats. **Scand J Gastroenterol**, v. 41, n. 11, p. 1320-1329, 2006.
- MEHTA, R.L. et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Crit Care**, v. 11, n. 2, p. 31, 2007.
- MEHROTRA, P. et al. IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 44, n. 2, p. 294-304, 2017.
- MERAN, S.; STEADMAN, R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. **Int J Exp Pathol**, v. 92, p. 158–167, 2011.
- MILLAR, T.M. et al. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. **FEBS Lett**, v. 427, n. 2, p. 225-8, 1998.
- MITAKA, C. et al. Effects of atrial natriuretic peptide on inter-organ crosstalk among the kidney, lung, and heart in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2014.
- MIZUTANI, A. et al. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production. **Blood**, v. 101, p. 3029–3036, 2003.
- MOHAMMED, A.; OMAIR, A.M.; ALHAMAD, E.H. Mycophenolate mofetil is an effective therapy for connective tissue disease-associated interstitial lung disease. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v.12, n. 3, 2017.
- MURALIKRISHNA, A.R. e HATCHER, J.F. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 3, p. 376–387, 2006.
- NAGASE, H.; WOESSER, J.R. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v.274, n.31, p.21491-4, 1999.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardio Research**, v. 69, p. 562-573, 2006.
- NISHIMURA, A. et al. Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 36, n. 6, p. 1143-54, 2016.
- NOWAK, E. et al. MMP-9 directed shRNAs as relevant inhibitors of matrix metalloproteinase 9 activity and signaling. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, v. 5, n. 67, p. 742-749, 2013.
- OGURI, A. et al. Registry investigators Impact of chronic kidney disease on the outcomes of trans-catheter aortic valve implantation: results from the France 2 registry. **EuroIntervention**, v. 10, n. 9, p. e1–e9, 2015.

OLOGUNDE, R. et al. Organ cross talk and remote organ damage following acute kidney injury. **International Urology and Nephrology**, v. 46, n. 12, p. 2337–2345, 2014.

PALM, F.; NORDQUIST, L. Renal tubulointerstitial hypoxia: cause and consequence of kidney dysfunction. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 38, n. 7, p. 474-80, 2011.

PARADIS, S. et al. Chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 310, n. 11, p. C968-C982, 2016.

PATSCHAN, D.; PATSCHAN, S.; MULLER, G. A. Inflammation and Microvasculopathy in Renal Ischemia Reperfusion Injury. **Journal of Transplantation**, v. 2012, 2012.

PRAKASH J. et al. Acute kidney injury in pregnancy with special reference to pregnancy-specific disorders: a hospital based study (2014-2016). **J Nephrol**, v. 31, p. 79–85, 2018.

PEAK, S.L. et al. Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. **N. Engl. J. Med.** v. 371, p. 1496-1506. 2014.

PENG, Q. et al. C3a and C5a promote renal ischemia/reperfusion injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, p. 1474–1485, 2012.

PENG, Q. et al. The C5a/C5aR1 axis promotes progression of renal tubulointerstitial fibrosis in a mouse model of renal ischemia/reperfusion injury. **Rim Int**, v. 96, n. 1, p. 117-128, 2019.

PERALTA, C.; JIMÉNEZ-CASTRO, M.B.; GRACIA-SANCHO, J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. **J. Hepatol.**, v. 59, p. 1094–106, 2013.

PERESLENI, T. et al. Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. **American Journal of Physiology-Renal Fluid and Electrolyte Physiology**, v. 39, p. 971, 1996.

POLETTE, M. et al. Tumour invasion and matrix metalloproteinase. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, n. 3, p. 179-186, 2004.

POELAERT, C. et al. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. **Intensive Care med.**, v. 23, p. 553-560. 1997.

PRIETO-MOURE, B. et al. Allopurinol in renal ischemia. **J Invest Surg**, v. 27, n. 5, p. 304-16, 2014.

PRUD'HOMME, M. et al. Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway. **JACC Basic Transl Sci.**, v. 4, n. 6, p. 717-732, 2019.

PUN, P.H., HORTON, J.R., MIDDLETON, J.P. Dialysate calcium concentration and the risk of sudden cardiac arrest in hemodialysis patients. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v.8, p. 797–803, 2013.

RABB, H. et al. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. **Am J Physiol Renal**, v. 279, p. 525–531, 2000.

RADI, Z.A. Immunopathogenesis of Acute Kidney Injury. **Toxicologic Pathology**, v. 46, n. 8, p. 930-943, 2018.

RAO, R.M. et al. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall, **Circ. Res.**, v. 101, p. 234–247, 2007.

RAHMAN, M.M. et al. Apocynin prevented inflammation and oxidative stress in carbon tetra chloride induced hepatic dysfunction in rats. **Biomed Pharmacother**, v. 92, p. 421-428, 2017.

RAJAGOPALAN, S. et al. Reactive oxygen species produced by macrophage derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. **J Clin Invest**, v. 98, n. 11, p. 2572-9, 1996.

RANJBAR, K. et al. Cardioprotective effect of resistance training and Crataegus oxyacantha extract on ischemia reperfusion-induced oxidative stress in diabetic rats. **Biomed Pharmacother**, v. 100, p. 455-460, 2018.

RASTOGI, R. et al. NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 10, p. 301, 2017.

RAMACHANDRAN, A. et al. The impact of partial manganese superoxide dismutase (SOD2)-deficiency on mitochondrial oxidant stress, DNA fragmentation and liver injury during acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 251, n. 3, p. 226-33, 2011.

RATNAM, D.V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J Control Release**, v. 113, p. 189-207; 2006.

RICCI, Z.; CRUZ, D.; RONCO, C. The RIFLE criteria and morality in acute kidney injury: a systematic review. **Kidney Int**, v. 73, n. 5, p. 538-546, 2008.

RICHTER, V.F. The role of maternal nutrition, metabolic function and the placenta in developmental programming of renal dysfunction. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 43, n. 1, p. 135-41, 2016.

RIES, C. Cytokine functions of TIMP-1. **Cellular Molecular Life Science**, v. 71, n. 4, p. 659-672, 2014.

RHODES, A. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Med.**, v. 43, p. 304–377, 2017.

ROCHA, P.N. et al. Acute renal failure after lung transplantation: incidence, predictors and impact on perioperative morbidity and mortality. **Am J Transplant**, v. 5, p. 1469–76, 2005.

RODRÍGUEZ-LARA, S.Q. et al. Alternative interventions to prevent oxidative damage following ischemia/reperfusion. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

ROMANINI, C.V. et al. 4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone-mediated long-lasting memory recovery, hippocampal neuroprotection, and reduction of glial cell activation after transient global cerebral ischemia in rats. **J Neurosci Res**, v. 93, n. 8, p. 1240–1249, 2015.

RONCO, C. et al. Cardiorenal syndrome. **Journal of the American college of cardiology**, v. 52, n. 19, p. 1527-1539, 2008.

RYDLOVA, M. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. **Anticancer research**, v. 28, p. 1389-1398, 2008.

SALIGRAM, S.; WILLIAMS, E.; MASDING, M. Raised liver enzymes in newly diagnosed Type 2 diabetes are associated with weight and lipids, but not glycaemic control. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 6, p. 1012–1015, 2012.

SALOMÃO, A. Imunossupressão em transplante renal de adultos: conceitos básicos e aplicação clínica. **Prática Hospitalar**, n.52, p. 177-182, 2007.

SANTOS, P.C.; KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C. Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. **Journal of Pharmacology Science**, v. 120, p. 77–88, 2012.

SANTOS, E.S. et al. Comparação entre Troponina I Cardíaca e CK-MB Massa em Síndrome Coronariana Aguda sem Supradesnívelamento ST. **Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia**, 2011.

SARI, A.N. et al. Contribution of RhoA/Rho-kinase/MEK1/ERK1/2/iNOS pathway to ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative stress and inflammation leading to distant and target organ injury in rats. **Eur. J. Pharmacol**, v. 723, n. 234-245, 2014.

SAWHNEY, S. et al. Intermediate and Long-term Outcomes of Survivors of Acute Kidney Injury Episodes: A Large Population-Based Cohort Study. **Am J Kidney Dis**, v. 69, p. 18-28, 2017.

SCHMITT, R. et al. Recovery of kidney function after acute kidney injury in the elderly: a systematic review and meta-analysis. **Am J Kidney Dis**, v. 52, p. 262–271, 2008.

SCHRIER R. W. Role of diminished renal function in cardiovascular mortality: marker or pathogenetic factor? **J Am Coll Cardiol**, v. 47, p. 1–8, 2006.

SEDAGHAT Z, et al. Hepatoprotective effects of remote preconditioning during renal ischemia. **Bratisl Lek Listy**, v. 115, n. 11, p. 675-9, 2014.

SELZNER, N. et al. Protective strategies against ischemic injury of the liver. **Gastroenterology**, v. 125, p. 917–36, 2003.

SENE, L.B. et al. Envolvement of Renal Corpuscle microRNA Expression on Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Maternal Low Protein Diet in Adult Programmed Rats. **PLoS One**, v.8, n. 8, p. e71310, 2013.

SIKMA, M.A. et al. High tacrolimus blood concentrations early after lung transplantation and the risk of kidney injury. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 73, p. 573–80, 2017.

SÍLVA, H; et al. Cardiac biomarkers in acute coronary syndromes. **Revista da sociedade portuguesa de medicina interna**, v.13, n. 2, 2006.

SINGRI, N.; AHJA, S.N.; LEVIN, M.L. Acute renal failure. **JAMA**, v. 289, p. 747–51, 2003.

SQUIRE, I.B. et al. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. **J Card Fail**, v. 10, n. 4, p. 328-33, 2004.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol**. Fev:1-48, 2010.

Sociedade Brasileira de Nefrologia. Diretrizes da AMB. **Comitê de Insuficiência Renal Aguda da Sociedade Brasileira de Nefrologia**, 2007.

SOUZA, A.C.S.V. et al. Epidemiological profile of morbimortality and public expenditure by Renal Insufficiency in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, 2020.

STOLK, J. et al. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 95–102, 1994.

SINGH, S.P. et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition attenuates fibroblast activation and development of fibrosis following renal ischemia-reperfusion in mice. **Dis Model Mech**, v. 8, n. 8, p. 931–940, 2015.

SHI, S. et al. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Biosci Rep**, v. 39, n. 1, 2019.

SINGH, A.P. et al. Animal models of acute renal failure. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 31–44, 2012.

SPINALE, F.G. et al. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. **Circ Res**, v. 90, n. 5, p. 520-30, 2002.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators inflamm**, v. 2008, 2008.

SIMONS, J.M. et al. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 251–258, 1990.

SLEPCHENKO, K.G.; LU, Q.; LI, Y.V. Zinc wave during the treatment of hypoxia is required for initial reactive oxygen species activation in mitochondria. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 44–51, 2016.

TAMAY-CACH, F. et al. A review of the impact of oxidative stress and some antioxidant therapies on renal damage. **Journal Renal Failure**, v.38, n. 2, p. 171–175, 2016.

TANG, L.L. et al. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. **Journal of International Medical Research**, v. 35, n. 4, p. 517–522, 2007.

TANG, Y. et al. Soy Isoflavone Protects Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through Increasing Endothelial Nitric Oxide Synthase and Decreasing Oxidative Stress in Ovariectomized Rats. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, 2016.

TECKLENBORG, J. et al. The role of the immune system in kidney disease. **Clin Exp Immunol**, v. 192, p. 142–50, 2018.

T' HART, B. A. et al. Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. **Free Radic Biol Med**, v.9, n.2, p.127–31, 1990.

THRALL, M.A. et al. Hematologia e bioquímica clínica veterinária, 2 ed., **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 349 a 360, 2015.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 1041–4, 2008.

TRIPATARA, P. et al. Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: role for xanthine oxidoreductase. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 570–80, 2007.

TSUDA, H. et al. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 427, n. 2, p. 266–72, 2012.

TUO, Y.H. et al. NADPH oxidase inhibitor improves outcome of mechanical reperfusion by suppressing hemorrhagic transformation. **Journal of neurointerventional surgery**, v. 9, n. 5, p. 492–498, 2017.

TURKMEN, K. Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse. **Nephrology**, v. 49, n. 5, p. 837–844. 2016.

TURNEY, J. H. Acute renal failure associated with recreational drug use. Acute renal failure: a companion to Brenner and Rector's the kidney, **WB Saunders**, p. 397–405, 2001.

UCHINO, S.K.J.A. et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. **JAMA**, v. 294, p. 813–818, 2005.

VASAN, R.S. et al. Framingham Heart Study Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 107, n. 1486–1491, 2003.

VIEIRA-FILHO, L.D. et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1932–1944, 2014.

VIEIRA FILHO, L.D. et al. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 12, p. 3577–3587, 2018.

VIÑAS, J.L. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 992–1003, 2006.

VISSE, R.; NAGASSE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circ Res**, v.92, n.1 p.8, 2003.

VILAY, A.M.; CHURCHWELL, M.D.; MUELLER, B.A. Clinical review: drug metabolism and nonrenal clearance in acute kidney injury. **Crit Care**, v. 12, n. 6, p. 235, 2008.

VOSS, A.; BODE, G.; KERKHOFF, C. Double-Stranded RNA Induces IL-8 and MCP-1 Gene Expression via TLR3 in HaCaT-Keratinocytes. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation Allergy)**, v. 11, p. 397–405, 2012.

WAJNER, S.M. et al. Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase2 expression is associated with advanced medullary thyroid carcinoma. **Oncology Letters**, v. 7, n. 3, p. 731–737, 2014.

WANG, Q.K.D. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. **Brain Research**, v. 1090, n. 1, p. 182–189, 2006.

WANG, H.; BROWN, J.; MARTIN, M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 130–40, 2011.

WANG, Y. et al. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. **Kidney Int**. v. 72, p. 290–299, 2007.

WANG, G. et al. N-Acetylcysteine protects against trichloroethene-mediated autoimmunity by attenuating oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 273, p. 189–195, 2013.

WANG, B. et al. Liver injury following renal ischemia reperfusion in rats. **Transplant Proc**, v.42, p. 3422–3426, 2010.

- WANG, L. et al. Resolving the graft ischemia-reperfusion injury during liver transplantation at the single cell resolution. **Cell Death Dis.**, v. 12, n. 6, p. 589, 2021.
- WEHBE, E. et al. Short-term and long-term outcomes of acute kidney injury after lung transplantation. **J Heart Lung Transplant**, v. 31, p. 244–51, 2012.
- WEIGHT, S.C. et al. Interaction of eicosanoids and nitric oxide in renal reperfusion injury. **Transplantation**, v. 72, p. 614–619, 2001.
- WINWOOD, P. J.; ARTHIR, M.J.P. Kupffer cells and endothelial cells. **Liver growth and repair.**, p. 482-511.
- WILLIS, M. S. et al. Cardiac muscle ring finger-1 increases susceptibility to heart failure in vivo. **Circ Res.**, v. 105, n. 1, p. 80-8, 2009.
- WHITE L.E.; HASSOUN H.T. Inflammatory Mechanisms of Organ Crosstalk during Ischemic Acute Kidney Injury. **Int J Nephrol.**, v. 2012, n. 505197, 2012.
- WHO, Noncommunicable diseases country profiles 2013, **W.H. Organization**, Editor 2013, World Health Organization.
- WIJERMARS, L.G.M. et al. The hypoxanthine-xanthine oxidase axis is not involved in the initial phase of clinical transplantation-related ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 312, n. 3, p. F457-F464, 2017.
- WILSON, T. et al. Risk prediction models for acute kidney injury following major noncardiac surgery: systematic review. **Nephrol Dial Transplant**, v. 31, n. 32, p. 231–240, 2016.
- WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nat Med**, v.18, n.7, p.1028–1040, 2013.
- WU, X. et al. Micro-vesicles Derived From Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells Mitigate Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats After Cardiac Death Renal Transplantation. **J Cell Biochem**, v. 119, n. 2, p. 1879-1888.
- WU, W. et al. Collectin-11 Promotes the Development of Renal Tubulointerstitial Fibrosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 29, n. 1, p. 168–181, 2018.
- YANG, L. et al. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. **Nat Med**, 2010 May; v.16, n. 5, p. 535-43, 2010.
- YAMAMOTO, M. et al. Dynamics of Oxidative Stress Evoked by Myocardial Ischemia Reperfusion After Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting Elucidated by Bilirubin Oxidation. **Circ J**, v. 81, n. 11, p. 1678-1685.
- YAO, W. et al. SERPINB1 ameliorates acute lung injury in liver transplantation through ERK1/2-mediated STAT3-dependent HO-1 induction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 108, p. 542–553, 2017.

YAP, S.C.; LEE, H.T. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. **Anesthesiology**, 116, 1139–1148, 2012.

YARGER, W. E. Obstructive urinary tract disease in the elderly. Hypertension and renal disease in the elderly. **Blackwell Scientific Publications**, p. 272-308, 1992.

WINN, R.K. et al. Interação leucócito-célula endotelial em lesão de isquemia-reperusão. **Ann NY Acad Sci**, v. 832, p. 311-321, 1997.

WONG, M.C.; KALMAN, J.M.; MORTON, J.B. Temporal distribution of arrhythmic events in chronic kidney disease: highest incidence in the long interdialytic period. **Heart Rhythm**, v. 12, p. 2047–2055, 2015.

YOSHITOMI, T.; HIRAYAMA, A.; NAGASAKI, Y. The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 8021–8028, 2011.

YOUSSEF, M.I.; MAHMOUD, A.A.; ABDELGHANY, R.H. A new combination of sitagliptin and furosemide protects against remote myocardial injury induced by renal ischemia/reperfusion in rats. **Biochem Pharmacol.**, v. 96, n. 1, p. 20-9, 2015.

ZARBOCK, A.; SINGBARTL, K.; LEY, K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 12, p. 3211-9, 2006.

ZAPPITELLI, M. Epidemiology and diagnosis of acute kidney injury, **Seminars in Nephrology**, v. 28, n. 5, p. 436–446, 2008.

YE, L. et al. Effect of Hepatic Macrophage Polarization and Apoptosis on Liver Ischemia and Reperfusion Injury During Liver Transplantation. **Front Immunol.**, v. 11, n. 1193, 2020.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E.G. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, p. 1819–1834, 2010.

ZHANG, Y. et al. Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 7, p. 910–916, 2005.

ZHANG, X. et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. **Histopathology**, v. 55, p. 250–260, 2009.

ZHAO Y.; CHEN, N.X.; CHEN, P.S. Subcutaneous nerve activity and mechanisms of sudden death in a rat model of chronic kidney disease. **Heart Rhythm**, v. 13, p. 1105–1112, 2016.

ZHAO, W. et al. Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. **Am J Nephrol**, v. 28, p. 548–554, 2008.

ZHAO, L. Reactive oxygen species contribute to lipopolysaccharide-induced teratogenesis in mice. **Toxicological Sciences**, v. 103, p. 149-157, 2008.

ZHENG, J.S. et al. Inhibition of NADPH oxidase attenuates vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. **Stroke**, vol. 36, n. 5, p. 1059–1064, 2005.

ZHOU, D. et al. Sonic hedgehog is a novel tubule-derived growth factor for interstitial fibroblasts after kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 10, p. 2187-200, 2014.

ZUK, A.; BONVENTRE, J. V. Acute kidney injury. **Annual review of medicine**, v. 67, p. 293-307, 2016.

6. RESULTADOS

Manuscrito 1

O MICOFENOLATO DE MOFETILA E A APOCININA ATENUAM A DEPOSIÇÃO RENAL DE COLÁGENO INDUZIDA PELA ISQUEMIA-REPERFUSÃO ATRAVÉS DE REGULAÇÃO DA VIA TGF- β 1/MMP-2

Shirley Maria Sousa¹, Jeoadã Karollyne Silva¹, Jéssica Santos Schirato Albuquerque¹, Lucas Cristiano da Silva Siqueira¹, Leucio Duarte Vieira¹

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Autor correspondente:

Leucio Duarte Vieira; e-mail: leucio.vieirafo@ufpe.br

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) pode se estabelecer de maneira rápida, porém é potencialmente reversível. Contudo, quando não controlada e tratada adequadamente, a LRA pode evoluir para doença renal crônica (DRC), que é um dos principais fatores de risco para hipertensão arterial e apresenta a deposição de tecido fibrótico como fator chave para progressão. Por outro lado, o sistema imune e a NADPH oxidase apresentam grande impacto na modulação da deposição de matriz extracelular (MEC). Diante disso, investigamos se a LRA induzida por isquemia-reperfusão (IR) promove alterações na produção de MEC em ratos adultos, que são sensíveis ao tratamento com o imunossupressor micofenolato de mofetila (MMF) e com o inibidor da NADPH oxidase apocinina. Ratos Wistar (300-400 g) foram submetidos a LRA induzida por 30 minutos de isquemia renal bilateral seguida de 24h de reperfusão (IR). Esses animais foram divididos em três grupos: um grupo tratado com veículo (IR, n=8); um grupo tratado com micofenolato de mofetila (MMF) (30 mg/kg de peso corpóreo, via gavagem) (IRM, n=8); e um grupo tratado com apocinina (100 mg/kg de peso corpóreo, na água de beber) (IRA, n=8). Os tratamentos com apocinina e MMF foram administrados em dose única 24 horas antes da indução da LRA pela IR. Um grupo de animais foi submetido a uma simulação da cirurgia (grupo Sham, n=8). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, foram realizadas as avaliações da função renal, do estresse oxidativo e marcadores de fibrose e inflamação renal. O grupo submetido a IR apresentou elevação dos níveis séricos de creatinina, da excreção urinária de proteína, da deposição renal de colágeno e da marcação para α -actina de músculo liso. Além disso, foi observado elevação da peroxidação lipídica e dos níveis de espécies reativas do oxigênio nos ratos submetidos a IR, juntamente com aumento da atividade e conteúdo proteica da MMP-2, da atividade da MMP-9 e conteúdo proteico de TGF- β 1. Os tratamentos com MMF e apocinina preveniram, pelo menos parcialmente, as alterações induzidas pela IR. Nossos dados sugerem um papel proeminente do sistema imune e da NADPH oxidase em mecanismos de deposição de tecido fibrótico mediados pela via TGF- β 1/MMP-2 e -9.

Palavras-chave: Apocinina, Fibrose Renal, Isquemia/reperfusão, Lesão Renal Aguda, Micofenolato de Mofetila.

INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é um distúrbio clínico no qual ocorre a perda rápida da função renal, levando ao acúmulo de compostos nitrogenados e como consequência a perda da homeostase de fluidos corporais e eletrólitos (Heung e Chawla, 2012). ALRA está associada à alta morbidade, mortalidade e custos com saúde. Estima-se que 1,7 milhão morrem anualmente por conta da LRA, sendo diabetes hipertensão, fatores comportamentais e de estilo de vida importantes fatores de risco. A LRA pode ocorrer em 8-16% das admissões hospitalares (Sawhney et al., 2017). Embora a LRA seja uma situação reversível, ela pode evoluir para doença renal crônica (DRC) (Heung e Chawla, 2012; Chawla e Kimmel, 2012), assim como sua ocorrência representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Sawhney et al., 2017).

A LRA pode se estabelecer por distúrbios hemodinâmicos que induzem uma injúria por isquemia-reperfusão (IR). Dentre as alterações causadas pela isquemia, destaca-se o encolhimento dos lúmens tubulares (Li et al., 2017), glomerulosclerose, fibrose intersticial, perda endotelial, dano tubulointersticial (inflamação, formação de fibrose e necrose) e espessamento da cápsula glomerular (Khalid et al., 2015; Gai et al., 2017). Durante a reperfusão, a restauração do fluxo sanguíneo começa com uma série de alterações deletérias nas células, resultando em inflamação, morte celular e falência orgânica, ativação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, alterando várias estruturas inclusive a mitocôndria (Bonventre, 1993; Bonventre e Yang, 2011; Rodríguez-Lara et al., 2016).

O acúmulo excessivo de matriz extracelular (MEC) é um importante fator na lesão renal (Eltzschig e Eckle, 2011) que, por sua vez, pode ser decorrente de sua maior produção ou de sua menor degradação. Fibroblastos no interstício e células mesangiais glomerulares são as principais células produtoras de MEC, enquanto a degradação da matriz extracelular no rim é realizada principalmente pelas metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e 9), que são produzidas pelas células mesangiais (Martin et al., 2001). A citocina pró-fibrótica TGF- β (transforming growth fator β) tem uma ação central na regulação desse processo (Gore-Hyer et al., 2002; Chin et al., 2004; Zeisberg et al., 2008; Sato e Yanagita, 2017).

Além da diálise, nenhuma intervenção terapêutica melhora de forma confiável a sobrevida, limita a lesão ou acelera a recuperação da LRA (Zuk e Bonventre, 2016), porém a terapia antioxidante apresenta grandes efeitos protetores. As espécies reativas

de oxigênio (EROs) prejudicam a função renal parcialmente, promovendo a apoptose das células epiteliais e a proliferação das células intersticiais, o que aumenta a produção de MEC (Bonventre, 1993; Adibhatla e Hatcher, 2006; Kurian et al., 2016). Além disso, as EROs estão ligadas à modulação de MMPs por TGF- β 1 (Richter et al., 2015; Turkmen, 2016). A NADPH oxidase (NOX) pode ser uma das fontes mais importantes de EROs na lesão renal e sua expressão e atividade têm sido associadas a várias condições onde ocorre fibrose renal (Farias et al., 2020).

Por outro aspecto, uma abordagem terapêutica estudada para reversão da lesão renal é o uso de imunossupressores. As respostas imunes inatas e adaptativas estão presentes na lesão isquêmica (Boventre e Yang, 2011). Além disso, na lesão de IR, há uma interrelação entre a formação de EROs e a resposta imune, onde EROs parece ser responsável pela geração de atividade quimiotática de neutrófilos. Uma vez aderidos ao endotélio, os neutrófilos controlam a lesão secretando EROs, bem como liberando enzimas proteolíticas (Welbourn, et al., 1991).

Diante do exposto, é possível que a IR renal leve a alterações agudas na deposição de MEC que contribui para a fibrose renal e pode ser responsável pelo aumento do risco de hipertensão e aparecimento de DRC. Além disso, que essas alterações podem ser dependentes de alterações na sinalização de TGF- β 1/MMPs/NADPH oxidase e sistema imune. Sendo assim, o objetivo do artigo foi investigar as alterações agudas na produção de MEC induzidas por IR renal em ratos adultos, avaliando o papel das MMPs e o impacto de um inibidor da NADPH oxidase e tratamentos imunossupressores sobre essas alterações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Apocinina (acetovanilona), anticorpo α -SMA (Sigma - A5228), fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF), N,N'-dimetil-9,9'-biacridínio dinitrato (lucigenina), *DirectRede CoomassieBrillantBlue* foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A membrana de *blotting* de nitrocelulose, o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (NA934V) e o sistema de blotting ECL Prime foram adquiridos de GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). O micofenolato de mofetila foi obtido da IntasBiopharmaceuticals (Ahmedabad, Índia). Os anticorpos primários anti-MMP-2 (SC-13595), anti-MMP9 (SC-13520), anti-TIMP-1 (SC-21734), anti-TGF- β 1 (SC-146), anti-nefrina (SC-377246) e anti- β -actina (SC-47778) foram obtidos na Santa-Cruz Biotechnologies (Dallas, EUA). O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Ab6728) foi adquirido na Abcam (Cambridge, Reino Unido) e o anticorpo primário anti-TIMP-2 foi obtido da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha). Todos os outros reagentes foram da mais alta pureza disponível.

Animais

Todos os protocolos e procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (nº 0053/2018), que seguem as normas definidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Ratos Wistar pesando cerca de 300 a 400 g foram utilizados por 90 a 100 dias, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas a 22 °C, com livre acesso a água e ração comercial.

Para indução da LRA, os ratos foram submetidos a isquemia renal bilateral seguida de 24h de reperfusão. Após anestesia (cetamina e xilazina, 80 e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente), foi feita incisão na cavidade abdominal para expor os rins e a isquemia foi realizada pelo posicionamento bilateral de pinças nas artérias renais por 30 min. Após esse período, a perfusão renal foi restaurada, sendo sequencialmente realizada a sutura da incisão na região abdominal. O grupo sham foi submetido a um procedimento cirúrgico semelhante ao grupo experimental, mas as artérias não foram pinçadas (grupo Sham, n = 8). Uma parte dos ratos submetidos à lesão por IR foi tratada com dose única do imunossupressor micofenolato de mofetil (30 mg/kg de peso corporal, gavagem; grupo IRM, n = 8) 24 horas antes da cirurgia, enquanto outro grupo recebeu um inibidor da NADPH oxidase, apocinina (100 mg/kg

de peso corporal, na água de beber; IRA, n = 8). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados para coleta de sangue (veia cava inferior), de urina (bexiga) e de rins. Uma fração do rim foi separado para estudos imuno/histoquímicos e o tecido remanescente foi fracionado, congelado rapidamente e armazenado a -80°C. Ao final da coleta das amostras de órgãos, os ratos foram sacrificados por exsanguinação, ainda anestesiados.

Medições bioquímicas

A função renal foi avaliada a partir da mensuração dos níveis séricos de creatinina e excreção urinária de proteína. As amostras de urina foram coletadas por punção da bexiga e as amostras de sangue foram coletadas por punção da veia cava inferior nos ratos anestesiados, no mesmo momento da coleta dos rins. A creatinina foi mensurada através de sistema comerciais colorimétricos. A proteína urinária foi mensurada usando o método de Folin fenol (Lowry et al., 1951).

Medição da deposição de colágeno renal

A densidade de colágeno no córtex renal foi avaliada por histoquímica usando coloração de Picro-Sirius. Os rins foram fixados em metacarn (metanol, clorofórmio e ácido acético; 6: 3: 1) por 24 horas e mantidos em álcool 70% até o processo de parafinização. Fatias de 5 µm foram coradas com tinta Hematoxilina de Weigert por 8 min, seguido por uma hora de coloração com Picro-Sirius (0,1% DirectRed 80 e soluções aquosas saturadas de ácido pícrico). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água acidificada e desidratadas em 3 banhos de etanol 100%, diafanizadas em xilol e montadas em meio resinoso.

A deposição de colágeno foi medida em 30 campos (70.700 µm²) usando o software Image-Pro Plus (versão 4.5.1, Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). A densidade foi expressa em porcentagem da deposição de colágeno em relação à área cortical tubulointersticial. As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Nikon, Eclipse Ni-U, Shanghai, China) acoplado a uma câmera (DS-i1C, Nikon).

Imunomarcaçãode α -SMA

Fatias de rim preparadas como acima foram usadas para imunomarcação de α -SMA de acordo com Vieira-Filho et al., 2011. A peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 10% de azida de sódio e 30% de peróxido de hidrogênio. As

lâminas foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) no microondas, lavadas com PBS 0,5% por 5 minutos e transferidas para câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti- α -SMA *overnight* (4°C). Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução contendo complexo avidina-biotina. Após lavagem com PBS, as lâminas foram coradas com DAB por 15 minutos, em seguida lavadas em água destilada e imersas em corante verde de metila por 5 minutos.

O conteúdo de proteína α -SMA foi estimado pela medição da área marcada por DAB em 20 campos (75'300 μm^2) do córtex renal de cada rato, utilizando o software Image-Pro Plus (versão 4.5.1, Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). Os valores da imunomarcação foram expressos em porcentagem da região tubulointersticial. As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Nikon, Eclipse Ni-U, Shanghai, China) acoplado a uma câmera (DS-i1C, Nikon).

Avaliação da peroxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com Ohkawa et al. (1979), e conforme descrito anteriormente (Vieira et al., 2018). O córtex renal foi homogeneizado com KCl 1,15% + EDTA 3 mM em banho de gelo. Em seguida foi adicionado um meio de reação contendo 0,3% de ácido tiobarbitúrico, 0,4% de SDS e 7,5% de ácido acético 20% (pH 3,5) e a mistura da reação foi aquecida a 95°C durante 60 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados e centrifugados por 10 minutos a 1.000 x g. A absorbância do sobrenadante foi medida a um comprimento de onda de 535 nm. Os valores foram corrigidos de acordo com a concentração de proteína do homogenato.

Produção *in situ* de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio em suspensões de córtex foram medidas usando a sonda fluorescente redox-sensível dihidroetídeo (DHE). O córtex renal foi homogeneizado em tampão RIPA contendo 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS e 50 mM de Tris (pH 8,0); suplementado por 2 mM de AEBSF, 1 mM de EDTA, 130 μM de bestatina, 14 μM de E-64, 1 μM de leupeptina e 0,3 μM de aprotinina. Posteriormente, o homogenato foi incubado com PBS/DTPA e DHE (5 μM), por 20 minutos, a 37°C, protegido da luz. A fluorescência

foi determinada em um comprimento de onda de excitação/emissão de 500/580 nm usando um leitor multimodular (Varioskan Flash, ThermoScientific). O resultado foi corrigido pela concentração de proteína da amostra.

Zimografia de metaloproteinases de matriz 2 e 9

A avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9 foi realizada por meio da técnica de zimografia com gelatina, conforme descrito anteriormente (Farias et al., 2020). Proteínas corticais renais (20 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo gelatina a 0,1% em condições não redutoras. Os géis foram lavados 2 vezes em 2,5% Triton X-100 durante 30 min para remover o SDS e então incubados por 18 horas em tampão Tris 50 mM (pH 7,4) contendo NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM e ZnCl₂ 1 µM. Os géis foram corados por Coomassie Blue R250 durante 1 hora e lavados em uma solução contendo metanol, ácido acético e água (50:10:40) para remover o excesso de corante. A atividade da gelatinase foi visualizada como bandas claras em um fundo azul e as atividades de MMP-2 e MMP-9 foram identificadas de acordo com seus respectivos pesos moleculares. As imagens do gel foram capturadas usando ChemiDoc MP (Bio-Rad) e a intensidade da banda foi determinada usando o software ImageLab (versão 5.2.1, Bio-Rad).

Western Blotting

A avaliação da expressão proteica em amostras do córtex renal foi realizada por *Western Blotting* (Farias et al., 2020). As proteínas (80 µg) das amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare). Após bloquear os sítios de ligação não específicos usando BSA 5%, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o anticorpo primário. As diluições de anticorpos foram as seguintes: anti-MMP-2 (1:500); anti-MMP-9 (1:500); anti-TIMP-1 (1:500); anti-TIMP-2 (1:500); anti-TGF-β1 (1:500); e anti-nefrina (1:500). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase. As marcações foram visualizadas usando um reagente de quimioluminescência (Luminata, MILLIPORE) e o sistema de aquisição de imagens ChemiDoc MP. A densitometria das bandas foi realizada no software ImageLab e os valores foram normalizados de acordo com a carga da proteína, estimada por immunoblotting de α-actina.

Análise estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A distribuição de cada conjunto de dados foi avaliada por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. As médias foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$. A análise estatística e a representação gráfica foram realizadas no software GraphPadPrism 5 (versão 5.01, La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

Níveis de creatinina sérica e proteinúria

O nível sérico de creatinina é um marcador importante da função renal. Observamos um aumento (~1000%, $P < 0,001$) na creatinina sérica do grupo IR em comparação ao grupo Sham. Ratos tratados com MMF e apocinina também apresentaram níveis elevados de creatinina sérica (~700%, $P < 0,001$), porém foram menores que o grupo IR, 19% ($P < 0,01$) e 14% ($P < 0,05$) respectivamente (Tabela 1).

O grupo IR apresentou um aumento de quase 10 vezes ($P < 0,001$) da excreção urinária de proteína em relação ao grupo Sham. O tratamento com MMF preveniu a elevação da proteinúria induzida pela IR. O grupo tratado com apocinina apresentou proteinúria maior que o grupo Sham, contudo, menores do que o grupo IR sem tratamento.

Massa renal, parâmetros morfométricos do corpúsculo e deposição renal de colágeno

Os grupos IR apresentaram aumento da massa renal e do índice renal em comparação ao grupo Sham, e os tratamentos com MMF ou apocinina não influenciaram essas alterações (Tabela 1). Por outro lado, a IR não influenciou a área corpuscular ou subcapsular, indicando que o motivo do aumento da massa renal é a extase sanguínea induzida pelo clampeamento dos pedículos renais.

Observamos que a IR induziu um aumento da deposição renal de colágeno na região tubulointersticial (60%, $P < 0,01$) e no glomérulo (120%, $P < 0,001$) (Figura 1). Os grupos submetidos a IR que receberam tratamento com MMF ou apocinina apresentaram marcação para o Picro Sirius semelhantes ao do grupo Sham.

α -SMA e nefrina

Além da deposição de colágeno, no córtex renal também foi avaliado a imunomarcação da α -SMA, que estima a ativação de fibroblastos, e o conteúdo de nefrina, um marcador de integridade estrutura das fendas de filtração (Figura 2). O grupo IR apresentou um aumento de 100% na marcação α -SMA na região tubulointersticial renal. Por outro lado, os grupos tratados com MMF não apresentaram elevação da marcação para α -SMA (Figura 2A). Interessantemente, o grupo tratado com apocinina apresentou níveis de α -SMA 80% inferiores ($P < 0,001$) ao grupo Sham.

O conteúdo proteico de nefrina apresentou-se 40% inferior ($P<0,05$) no grupo IR quando comparados ao grupo Sham (Figura 2B). Os tratamentos com MMF ou apocinina preveniram a diminuição de nefrina induzida pela IR.

Avaliação do estresse oxidativo renal

Conforme mostrado na Figura 3A, a peroxidação lipídica renal foi 40% maior ($P<0,05$) no grupo IR em comparação ao grupo Sham, enquanto que nos grupos IRM e IRA foi semelhante ao grupo Sham e menor do que o grupo IR. Os níveis renais de EROs apresentaram um perfil de diferença estatística semelhante ao da peroxidação lipídica: níveis maiores no grupo IR em relação aos demais grupos (Figura 3B).

Atividade das metaloproteinases de matriz 2 e 9

As MMPs são enzimas fundamentais no remodelamento da MEC tornando-se um importante marcador de fibrose renal (Figura 4). A atividade da MMP-2 foi mais de 8 vezes maior ($P<0,001$) no córtex renal do grupo IR do que no Sham. Os grupos tratados com MMF ou apocinina apresentaram atividade da MMP-2 cerca de 20-30% menor ($P<0,001$) do que o grupo IR, entretanto ainda superiores ($P<0,001$) ao grupo Sham.

A atividade da MMP-9 no córtex renal também se apresentou expressivamente maior no grupo IR, enquanto que os grupos tratados apresentaram valores semelhantes ao grupo Sham (Figura. 4 B).

Conteúdo proteico das MMP-2 e 9 e vias regulatórias

Além de avaliarmos a atividade das MMP-2 e 9, também investigamos o conteúdo proteico dessas enzimas no córtex renal (Figura 5A e B). Observamos que o grupo IR apresentou um aumento do conteúdo da MMP-2 em paralelo ao aumento de sua atividade. Adicionalmente, observamos que o MMF e a apocinina preveniram essa alteração. Apesar de termos observado uma elevação da atividade da MMP-9 no grupo IR, o seu conteúdo não foi alterado no córtex renal.

Em paralelo ao aumento do conteúdo proteico da MMP-2 no córtex renal, também observamos que a IR elevou (250%, $P<0,001$) o conteúdo do seu inibidor TIMP-2 (Figura 5C). Contudo, os tratamentos com MMF e apocinina não preveniram a elevação dos níveis de TIMP-2. O conteúdo proteico da TIMP-1 também foi estimulado pela IR, e não foi afetado pelos tratamentos experimentais (Figura 5D).

O conteúdo renal de TGF- β 1 foi mais de 2 vezes maior ($P < 0,01$) no grupo IR do que no grupo Sham (Figura 5E). O tratamento com apocinina preveniu completamente essa alteração. Por outro lado, o tratamento com MMF apresentou apenas um efeito parcial, isto é, os níveis de TGF- β 1 nesse grupo não foram diferentes do grupo IR mas também não foram diferentes do grupo Sham.

Tabela 1. Parâmetros de função renal, massa renal e parâmetros morfológicos do corpúsculo renal

	Sham	IR	IRM	IRA
Creatinina sérica, mg / dL	0,50 $\pm$ 0,01	5,03 $\pm$ 0,23 ***	4,10 $\pm$ 0,27 *** ^{††}	4,32 $\pm$ 0,09 *** [†]
Ptn^u/Creat^u	13 $\pm$ 2	120 $\pm$ 24 ***	39 $\pm$ 9 ^{††}	67 $\pm$ 13 * [†]
Massa renal, g	1,28 $\pm$ 0,07	1,51 $\pm$ 0,04 *	1,48 $\pm$ 0,04 *	1,66 $\pm$ 0,05 **
Índice renal (x100)	0,69 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,01 ***	0,84 $\pm$ 0,03 **	0,90 $\pm$ 0,03 ***
Área do corpúsculo, μ m²	6,65 $\pm$ 0,37	7,17 $\pm$ 0,31	7,69 $\pm$ 0,40	6,66 $\pm$ 0,41
Área subcapsular, μ m²	2,54 $\pm$ 0,44	1,99 $\pm$ 0,30	2,17 $\pm$ 0,23	1,73 $\pm$ 0,18

Sham = Simulação da cirurgia (n=8), IR = Isquemia/reperfusão (n=8), IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil (n=8), IRA = Isquemia/reperfusão + apocinina (n=8). Dados expressos como média $\pm$ EPM. Uma comparação entre as médias dos grupos foi realizada pela análise de variância unilaterial, seguida do teste de Tukey: *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 vs. Sham. †P < 0,05, ††P < 0,01 vs. IR.

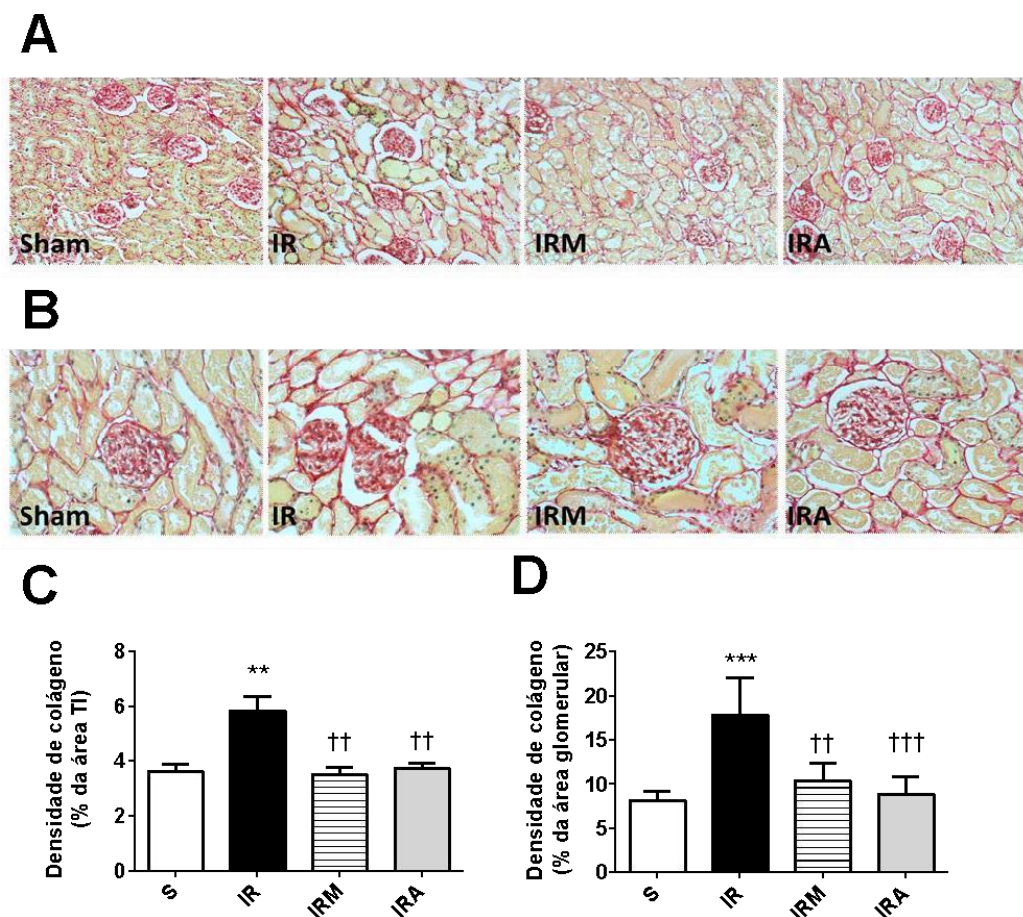


Figura 1. Efeitos do micofenolato de mofetil e apocinina na deposição de colágeno no túbulo intersticial renal e na deposição de colágeno no glomérulo no tecido renal de ratos adultos submetidos à IR. (A) Densidade de colágeno no túbulo intersticial.(B) Densidade de colágeno no glomérulo renal. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM = Isquemia / reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Dados expressos como média $\pm$ EPM. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada pela análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: **P < 0,01 e ***P < 0,001 Vs. Sham, ††P < 0,01 e †††P < 0,001 vs. IR.

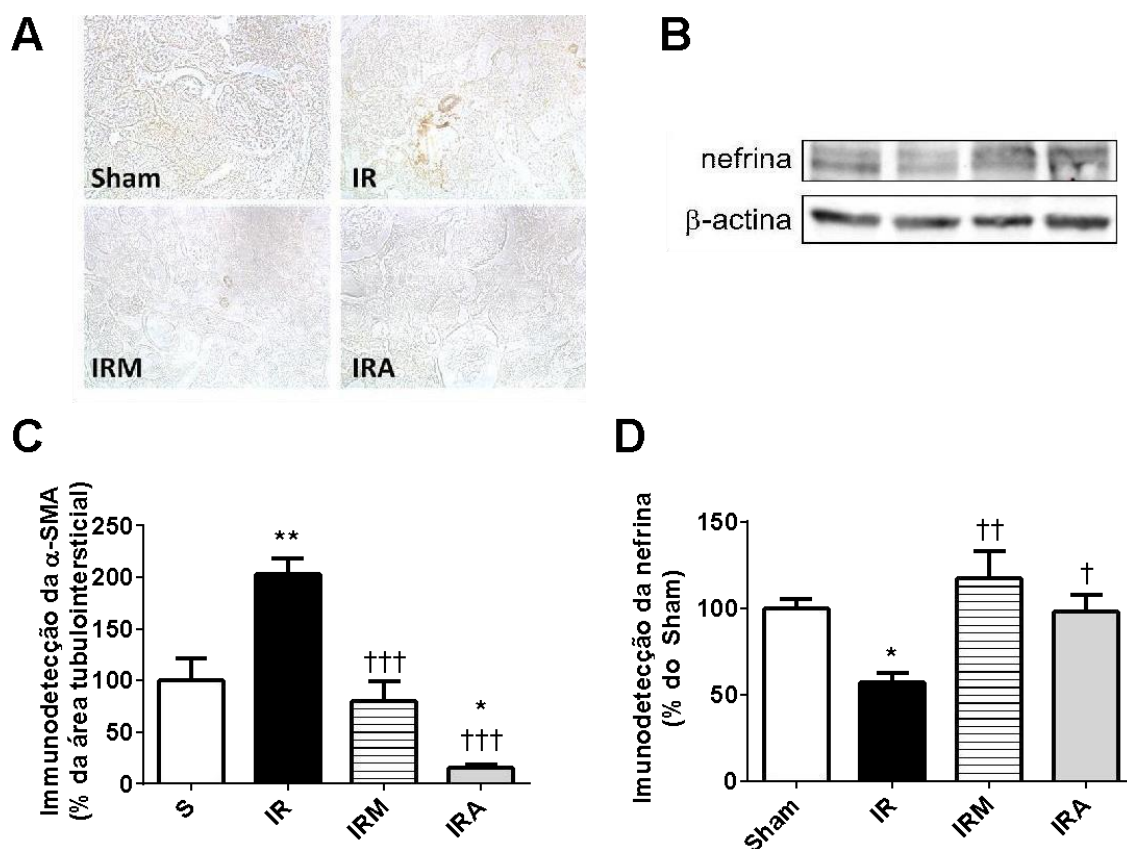


Figura 2. Efeito do micofenolato de mofetil e apocinina sobre a imunodeteção de α -actina de músculo liso do túbulo-intersticial enepirano tecido renal de ratos adultos submetidos a IR. (A) Imunodeteção de α -SMA no tubulointerstício. (B) Nefrina. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Dados expressos como média $\pm$ EPM. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ Vs. Sham, † $P < 0,05$, †† $P < 0,01$ e ††† $P < 0,001$ Vs. IR.

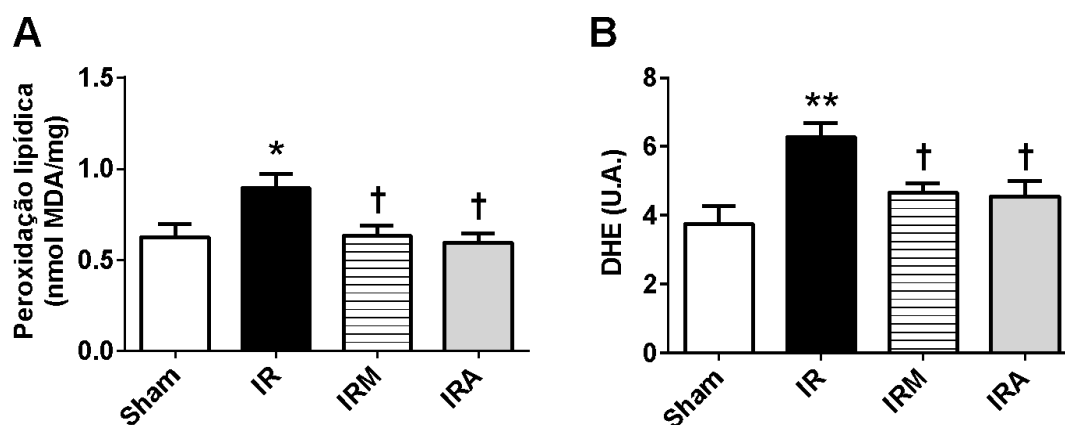


Figura 3. Efeitos do micofenolato de mofetil e apocinina na peroxidação lipídica e dos níveis de espécies reativas de oxigênio no córtex renal de ratos adultos submetidos à IR. (A) A peroxidação lipídica foi medida através da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico. MDA = malondialdeído. (B) Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram medidos usando a sonda dihidroetida fluorescente (DHE). Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Dados expressos como média $\pm$ EPM.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada pela análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ Vs.Sham, † $P < 0,05$ Vs.IR.

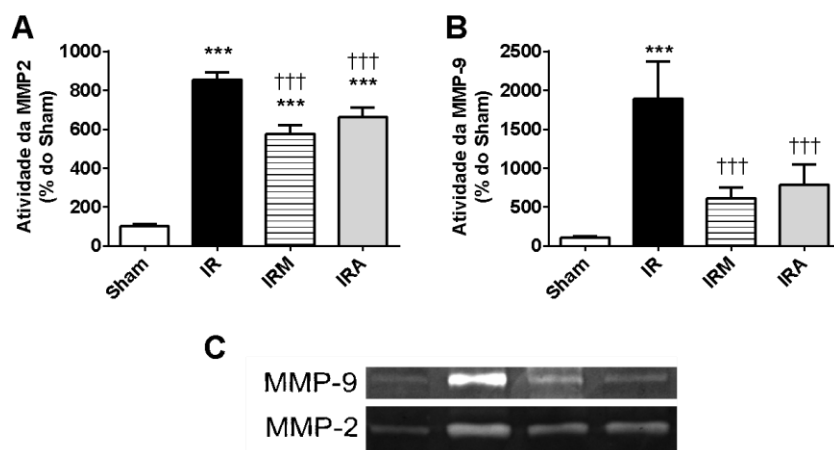


Figura 4. Efeitos do micofenolato de mofetil e apocinina na deposição de matriz extracelular no córtex renal de ratos adultos submetidos à IR. (A) MMP-2 (B) MMP-9. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Imagens representativas da zimografia de um único gel são apresentadas no painel C em escala de cinza. Dados expressos como média $\pm$ EPM. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: *** $P < 0,001$ e Vs.Sham, ††† $P < 0,001$ vs.IR.

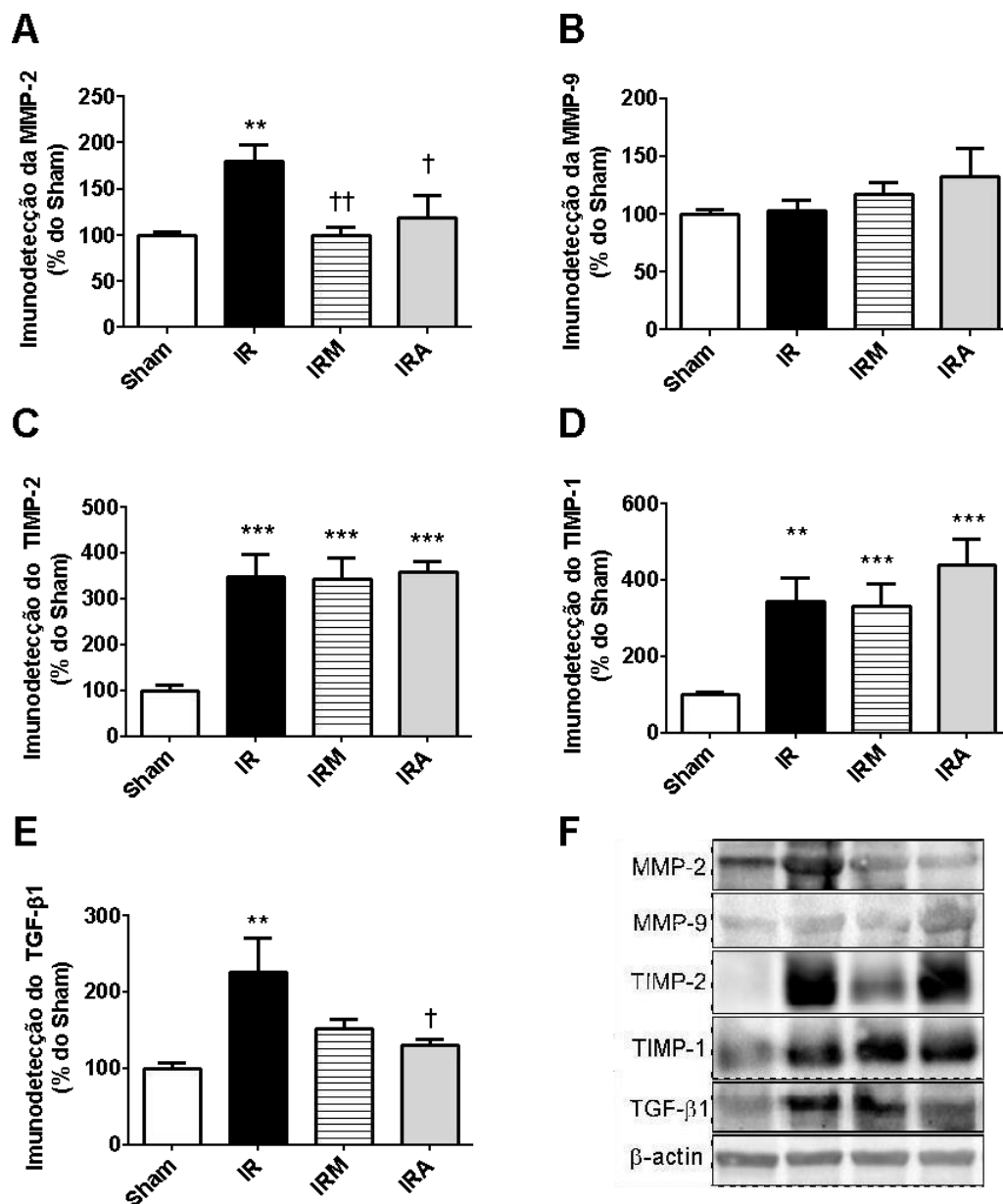


Figura 5. Efeitos do micofenolato de mofetil e apocinina sobre o conteúdo de proteína renal na deposição da matriz extracelular, inibidores da metaloproteína da matriz e proliferação e diferenciação celular no córtex renal de ratos adultos submetidos a IR. (A) MMP-2. (B) MMP-9. (C) TIMP-2. (D) TIMP-1. (E) TGF-β. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Imagens representativas de imunodeteção são mostradas no painel F. Dados expressos como média ± EPM. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada pela análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: **P < 0,01 e ***P < 0,001 Vs. Sham, †P < 0,05 e ††P < 0,01 Vs. IR.

DISCUSSÃO

A isquemia-reperfusão (IR) é um dos principais mecanismos envolvidos na indução da lesão renal aguda. Neste estudo, observamos que alterações agudas na função renal induzidas por IR foram prevenidas pelo tratamento prévio com MMF e apocinina, sugerindo um papel proeminente do sistema imunológico e da NADPH oxidase nesse processo. O efeito protetor do MMF e da apocinina envolveu redução da creatinina sérica, proteinúria e deposição cortical de colágeno (Ventura et al., 2002; Jiang et al., 2012; 20 Kovacevic 2020; e 21 LI e Wang 2015; Lima et al. 2021). Pela primeira vez, de acordo com nosso conhecimento, foi demonstrado que o MMF e a apocinina compartilham ações protetoras na lesão renal induzida por IR através da restauração da modulação da via EROs/TGF- β 1/MMP-2.

Apesar de ambos os tratamentos terem efeitos protetores sobre a função renal, foi possível identificar que o MMF teve maior potência em proteger a proteinúria induzida por IR, considerando que os valores estavam no patamar daqueles do grupo Sham (Tabela 1). O dano à barreira de filtração ocorre por mecanismos dependentes de vias oxidativas, como a ativação da NADPH oxidase, e por mecanismos dependentes de mediadores inflamatórios e resposta de células imunes (23 Abais et al. 2013; 24 Abais-Battad et al. 2020). Portanto, uma possível explicação para a diferença na potência do efeito entre as duas substâncias pode ser seus mecanismos de ação. Enquanto o MMF é um modulador direto do sistema imunológico e adicionalmente possui efeitos antioxidantes indiretos (Fischer, 2013) a apocinina atua apenas por meio de mecanismos antioxidantes diretos e indiretos dependentes da inibição da NADPH oxidase (Touyz e Schiffrin, 2008).

Por outro lado, tanto o MMF quanto a apocinina diminuíram na mesma proporção a deposição de colágeno no glomérulo e na área tubulointersticial. Além disso, os tratamentos também impediram as alterações induzidas por IR no conteúdo renal de nefrina e α -SMA. O conteúdo de nefrina está altamente correlacionado com danos renais precoces, envolvendo danos nos podócitos, esclerose de células mesangiais e espessamento da membrana basal glomerular (25, 26 LI et al., 2015; Chen et al., 2019; Liu et al., 2018), enquanto o conteúdo renal de α -SMA é um marcador de desdiferenciação celular e perda de função (Badid et al., 2001). Portanto, pode-se sugerir que a inibição da deposição de colágeno pode ser consequência da preservação da

integridade podocitária e da manutenção da diferenciação celular, ou seja, preservação do conteúdo renal de nefrina e α -SMA, respectivamente.

A diminuição dos níveis de EROs e estresse oxidativo no rim também pode ser fundamental para os efeitos protetores de MMF e apocinina na lesão induzida por IR. Outros trabalhos já demonstraram a importância do efeito antioxidante da apocinina no mecanismo da LRA (Li e Wang, 2015; Choi et al., 2015; Erosy et al., 2016; Lima et al., 2021). A apocinina diminui o estresse oxidativo ao inibir a ativação da NADPH oxidase através da prevenção da translocação de p47phox do citosol para a membrana (Stefanska e Pawliczak, 2008). a molécula de apocinina é uma pró-droga que é ativada pela oxidação mediada pela mieloperoxidase (Heumuller et al., 2008), porém, pode-se considerar que a molécula também possui ação antioxidante direta, por ser um aceptor de elétrons, principalmente em condições onde não há presença de mieloperoxidase.

Os efeitos protetores do MMF sobre a lesão renal podem estar relacionados à supressão da proliferação de linfócitos e monócitos, bem como à inibição do recrutamento e infiltração de células imunes (Ventura et al 2002). Aqui, observou-se que o tratamento com MMF diminuiu a peroxidação lipídica renal e os níveis de EROs na mesma proporção que o tratamento com apocinina, indicando que os efeitos protetores do MMF ocorreram parcialmente por meio de ações antioxidantes (Ridker & Luscher, 2014). Já foi demonstrado que o sistema imunológico pode danificar o tecido renal através da ativação de muitas vias pró-oxidativas (Abais-Battadet al., 2020). Além disso, vale ressaltar que as EROs podem estimular a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Holterman et al., 2019), que aumentam ainda mais a ativação das células imunes e a produção de citocinas.

Além de envolver mecanismos antioxidantes, a proteção renal exercida pelos tratamentos com MMF e apocinina pode ter envolvido a modulação da MMP-2 e MMP-9. Essas enzimas proteolíticas estão associadas à fisiopatologia da lesão renal através de mecanismos que envolvem modulação da deposição de matriz extracelular, regulação de proliferação celular e ativação de citocinas pró-inflamatórias (Basile et al., 2004; Cavdar et al., 2014). As metaloproteinase de matriz são enzimas sensíveis ao balanço redox e são reguladas e ativadas a partir de sua forma latente inativa quando expostas a um ambiente oxidativo (Tobar et al., 2010). A administração de MMF e apocinina atenuaram a elevação de MMPs induzida por IR no córtex renal, evidenciando o papel do sistema imunológico e do estado redox no mecanismo de lesão renal (Sutton et al., 2005; Reel et al., 2013). Por outro lado, o efeito do MMF também pode ter ocorrido

através da inibição da ação de células imunes e na inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias. A inibição do TNF- α é capaz de prevenir a elevação da MMP-2 em um modelo animal com remodelação vascular induzida por hipertensão (Sutton et al., 2005). De maneira semelhante ao observado no presente estudo, esse efeito ocorre simultaneamente à inibição da formação de EROs. Esse mecanismo pode indicar que o efeito do MMF seria parcialmente dependente da inibição da ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , sobre a ação de MMPs secretadas por células renais. Por outro lado, também é factível que a inibição do recrutamento de células imunes também seja importante no processo, considerando a capacidade dessas células em secretar MMP-9 e sua co-localização em sítios de lesão tecidual (Tan et al., 2013; Dong et al., 2021).

O aumento da atividade da MMP-2 na IR renal ocorreu paralelamente ao aumento do seu conteúdo proteico e ao aumento do conteúdo proteico da citocina pró-fibrótica TGF- β 1. Por outro lado, os efeitos protetores da apocinina e do MMF envolveram diminuição do conteúdo proteico da MMP-2 e do TGF- β 1 para níveis semelhantes ao do grupo Sham. Esses resultados sugerem que a modulação do TGF- β 1 seria fundamental para o efeito de ambos os tratamentos. O TGF- β 1 regula positivamente a transcrição gênica da MMP-2 e também é um importante modulador da resposta imune (Mehrotra et al., 2017). Da mesma forma como para as MMPs, as células imunes tanto podem produzir TGF- β 1, como podem ser alvo da citocina (Chung et al., 2018). Por exemplo, a secreção de TGF- β 1 é um fator químico atrativo de macrófagos na lesão isquêmica renal aguda (Wahl, 2007). Essas células são fundamentais para o reparo adequado do tecido mas podem ser potenciais mediadores da fibrose. Além disso, macrófagos e linfócitos Treg também são células que secretam TGF- β 1 em sua forma latente (Wahl, 2007).

A modulação do TGF- β 1 também poderia ser explicada por sua modulação mediada por vias sensíveis a EROs, principalmente no grupo tratado com apocinina. Sabe-se que a NADPH oxidase atua como sinalizador dos efeitos pró-fibróticos do TGF- β , contudo a relação também pode ocorrer de maneira inversa, funcionando como um mecanismo de retroalimentação positiva. A formação de EROs estimula a conversão da forma latente do TGF- β para sua forma ativa, resposta que é fundamental para a sinalização da citocina. Além disso, a NADPH oxidase é capaz de modular diretamente mediadores intracelulares canônicos e não-canônicos do TGF- β , amplificando o seu efeito (Jiang et al., 2014).

Diferentemente do que ocorreu com a MMP-2, o aumento da atividade da MMP-9 induzida pela IR não ocorreu paralelamente a elevação do aumento do seu conteúdo proteico no tecido renal. Além disso, o MMF e a apocinina preveniram o impacto da IR sobre a atividade da MMP-9 sem influenciar o seu conteúdo proteico. Esses resultados reforçam a sugestão de que o aumento da atividade da MMP-9 está associado ao distúrbio do balanço redox renal (Tobar et al., 2010). Adicionalmente, considerando que o TNF- α promove a ativação da MMP-9 (Hsieh et al., 2022), e que ambos o MMF e a apocinina são tratamentos associados a inibição da produção de TNF- α (Hu et al, 2017; Jang, 2009), é possível que a inibição da produção dessa citocina também tenha tido importância no mecanismo de proteção.

Adicionalmente, os inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs) também são fundamentais no controle da ação das MMPs, onde o TIMP-1 é mais seletivo para MMP-9, enquanto que o TIMP-2 é mais seletivo para a MMP-2 (Manello e Medda, 2012). Os TIMPs apresentam efeito duplo sobre as MMPs, um vez que eles podem tanto inibir quanto ativar a função catalítica dessas enzimas (Manello e Medda, 2012). Neste trabalho foi identificado um aumento do conteúdo proteico renal da TIMP-2 e da TIMP-1 nos animais submetidos a IR renal, em paralelo à estimulação da atividade da MMP-2 e MMP-9. Apesar dos tratamentos terem prevenido parcialmente a estimulação da atividade das MMPs, eles não tiveram impacto no conteúdo proteico renal dos TIMPs. Esse contraste de resultados torna difícil estabelecermos, no modelo estudado, se o aumento do conteúdo dos TIMPs é um mecanismo de proteção deflagrado pela deposição de material fibrótico ou se é um mecanismo envolvido com a etiologia da ativação das MMPs. De qualquer forma, pode-se perceber que o efeito protetor do MMF e da apocinina são independentes da modulação dos TIMP-2 e TIMP-1, mas que ainda prepondera uma alteração do balanço entre atividade das MMPs e conteúdo proteico das TIMPs (Hemmerlein et al., 2004).

Em conclusão, o presente estudo sugere que o sistema immune e a NADPH oxidase apresentam um papel proeminente na LRA induzida por IR através de mecanismos que estimulam a fibrose renal via EROs $\rightarrow$ TGF β -1 $\rightarrow$ MMP-2/MMP-9. O estudo também enfatiza o papel do estresse oxidativo, inclusive por modulação do sistema imune, como modulador-chave das alterações pró-fibróticas precoces induzidas pela isquemia-reperfusão. De maneira geral, esses resultados apresentam dados pré-clínicos que apontam que alterações pró-fibróticas surgem precocemente na lesão renal induzida por IR, e podem ser caracterizadas como um fator de risco para evolução da

lesão para um quadro de doença renal crônica. Dessa forma, torna-se importante que haja um maior esclarecimento das consequências em longo prazo da IR renal na via EROs→TGF- β 1→MMPs, inclusive para confirmar se estratégias terapêuticas antioxidantes e imunossupressoras são efetivas em longo prazo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Profa. Dayane Aparecida Gomes pelo acesso aos equipamentos localizados em seu laboratório (Plataforma Multiusuário em Biologia Celular e Molecular – FACEPE 16/2012; nº 1133-2.07/2012). Agradecemos também a Nielson T. Mello e Danielle Dutra pelo suporte técnico.

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq; 474004/2013-9 e 432468/2016-1); pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; números APQ-1072-2.07/15 e APQ-0409-2.07/14); e, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES).

REFERÊNCIAS

Abais JM, Zhang C, Xia M, Liu Q, Gehr TW, Boini KM, Li PL. "NADPH oxidase-mediated triggering of inflammasome activation in mouse podocytes and glomeruli during hyperhomocysteinemia." *Antioxid Redox Signal*. 1;18(2013):1537-48.

Abais- Battad JM, Lund H, Dasinger JH, Fehrenbach DJ, Cowley AW Jr, Mattson DL. NOX2-derived reactive oxygen species in immune cells exacerbates salt-sensitive hypertension. *Free Radic Biol Med*. 146 (2020):333-339.

Allison AC, Eugui EM. Mycophenolatemofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47 (2000):85-118.

Andrianova, NV, V., Zorova , LD, Babenko et al. "Rapamycin is not protective against ischemic and cisplatin-induced kidney injury." *Biochemistry (Moscow)* 84.12-13 (2019): 1502-1512.

Badid, C, Vincent M, Fouque D, Laville M, Desmoulière A. "Myofibroblast: a prognostic marker and target cell in progressive renal disease." *Ren Fail*. 2001 May-Jul;23 (3-4):543-9.

Bahremand , F., et al. "Matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress." *Lupus* 24.6 (2015): 597-605.

Bastone, Patrizia, Ignacio G. Bravo, and Martin Löchelt . "Feline foamy virus-mediated marker gene transfer: identification of essential genetic elements and influence of truncated and chimeric proteins." *Virology* 348.1 (2006): 190-199.

Basile DP, Fredrich K, Weihrauch D, Hattan N, Chilian WM. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 May;286(5):F893-902.

Bonventre, Joseph V. "Mechanisms of ischemic acute renal failure." *Kidney international* 43.5 (1993): 1160-1178.

Bonventre, Joseph V., and Li Yang. "Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury." *The Journal of clinical investigation* 121.11 (2011): 4210-4221.

Cavdar Z, Ozbal S, Celik A, Ergur BU, Guneli E, Ural C, Camsari T, Guner GA. The effects of alpha-lipoic acid on MMP-2 and MMP-9 activities in a rat renal ischemia and re-perfusion model. *Biotech Histochem*. 2014 May;89(4):304-14.

Chawla, LS; Kimmel, PL "Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome." *Kidney Int* 82, (2002): 516-524.

Chen, Yi, et al. "The role of podocyte damage in the etiology of ischemia-reperfusion acute kidney injury and post-injury fibrosis." *BMC nephrology* 20.1 (2019): 1-11.

Choi, EK, et al. "Effects of allopurinol and apocynin on renal ischemia-reperfusion injury in rats." *Transplantation proceedings*. Vol. 47.No. 6.Elsevier, 2015.

Chung S, Overstreet JM, Li Y, Wang Y, Niu A, Wang S, Fan X, Sasaki K, Jin GN, Khodo SN, Gewin L, Zhang MZ, Harris RC. TGF- β promotes fibrosis after severe acute kidney injury by enhancing renal macrophage infiltration. *JCI Insight*. 2018 Nov 2;3(21):e123563.

Conde, Elisa, et al. "HIF-1 α induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-15.

Cortes, Aline L., et al. "Protective outcomes of low-dose doxycycline on renal function of Wistar rats subjected to acute ischemia/reperfusion injury." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1864.1 (2018): 102-114.

Dong Y, Zhao H, Man J, Fu S, Yang L. MMP-9-mediated regulation of hypoxia-reperfusion injury-related neutrophil inflammation in an in vitro proximal tubular cell model. *Ren Fail*. 2021 Dec;43(1):900-910.

Eltzschig ,Holger K., and Tobias Eckle. "Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation." *Nature medicine* 17.11 (2011): 1391-1401.

Ergin, Bulent, et al. "Mycophenolatemofetil improves renal haemodynamics ,microvascular oxygenation, and inflammation in a rat model of adrenal aortic clamping-mediated renal ischaemia reperfusion injury." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 44.2 (2017): 294-304.

Erosy, GS "Mycophenolatemofetil attenuates uterine ishaemia /reperfusion injury in a rat model." *play _ Biomed*. Online (2016).

Farias, Juliane S., et al. "Maternal endotoxemia induces renal collagen deposition in adult offspring: Role of NADPH oxidase/TGF - β 1/MMP-2 signaling pathway." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 684 (2020): 108306.

Faustino, Viviane Dias, et al. "Simultaneous activation of innate and adaptive immunity participates in the development of renal injury in a model of heavy proteinuria." *Bioscience reports* 38.4 (2018).

Fischer A, Brown KK, Du Bois RM, Frankel SK, Cosgrove GP, Fernandez-Perez ER, Huie TJ, Krishnamoorthy M, Meehan RT, Olson AL, Solomon JJ, Swigris JJ. Mycophenolate mofetil improves lung function in connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *J Rheumatol*. 2013 May;40(5):640-6.

Gai, Zhibo , et al. " Farnesoid X receptor activation protects the kidney from ischemia-reperfusion damage." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-16.

Gluba-Brzózka , Anna, et al. "Markers of increased atherosclerotic risk in patients with chronic kidney disease: a preliminary study." *Lipids in health and disease* 15.1 (2016): 22.

Gore-Hyer, Elizabeth, et al. "TGF - β and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 283.4 (2002): F707-F716.

Granger, D. Neil, and Peter R. Kvietys . "Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept." *Redox biology* 6 (2015): 524-551.

Guvercin ,Guray, et al. "Matrix metalloproteinase-9, 10, and stress hyperglycaemia in acute kidney injury." *European Journal of Clinical Investigation* 48.7 (2018): e12963.

Hemmerlein B, Johannis U, Halbfass J, Böttcher T, Heuser M, Radzun HJ, Thelen P. The balance between MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 is shifted towards MMP in renal cell carcinomas and can be further disturbed by hydrogen peroxide. *Int J Oncol.* 2004 May;24(5):1069-76.

Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, Brandes RP. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* 2008 Feb;51(2):211-7.

Heung, M. and Chala, LS " Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. " *curr Opin Nephrol Hypertens* 21 (2012): 628–634.

Hsieh HL, Yu MC, Cheng LC, et al. Quercetin exerts anti-inflammatory effects *via* inhibiting tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in normal human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 2022;28(11):1139-1158.

Holterman CE, Boisvert NC, Thibodeau JF, Kamto E, Novakovic M, Abd-Elrahman KS, Ferguson SSG, Kennedy CRJ. Podocyte NADPH Oxidase 5 Promotes Renal Inflammation Regulated by the Toll-Like Receptor Pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2019 May 20;30(15):1817-1830.

HU, B. et al. Apocynin Alleviates Renal Ischemia/Reperfusion Injury Through Regulating the Level of Zinc and Metallothionein. *Biol Trace Elem Res*, v. 178, n. 1, p. 71-78, 2017.

Khalid, Usman, et al. "A Localized Ischemic Preconditioning Regimen Increases Tumor Necrosis Factor α Expression in a Rat Model of Kidney Ischemia-Reperfusion Injury." *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 13.6 (2015): 535.

Kobusiak- Prokopowicz, Malgorzata, et al. "MMP-2 and TIMP-2 in patients with heart failure and chronic kidney disease." *Open Medicine* 13.1 (2018): 237-246.

Kolodziejczyk, Steven M., and Brian K. Hall. "Signal transduction and TGF - β superfamily receptors." *Biochemistry and cell biology* 74.3 (1996): 299-314.

Kovacevic, Sanjin, et al. "Hyperbaric oxygen preconditioning and the role of NADPH oxidase inhibition in postischemic acute kidney injury induced in spontaneously hypertensive rats." *Plos one* 15.1 (2020): e0226974.

Kurian, Gino A., et al. "The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 (2016).

Kwiatkowska, Ewa , et al. "Urinary metalloproteinases-9 and-2 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 are markers of early and long-term graft function after renal transplantation." *Kidney and Blood Pressure Research* 41.3 (2016): 288-297.

JANG, H.R. et al. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med*, v. 87, p. 859–64, 2009.

Jiang S, Tang Q, Rong R, Tang L, Xu M, Lu J, Jia Y, Ooi Y, Hou J, Guo J, Yang B, Zhu T. Mycophenolatemofetil inhibits macrophage infiltration and kidney fibrosis in long-term ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2012 Aug 5;688(1-3):56-61.

Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. *Redox Biol*. 2014 Jan 20;2:267-72.

Li, Jiawei, et al. "Resveratrol alleviates inflammatory responses and oxidative stress in rat kidney ischemia-reperfusion injury and H₂O₂-induced NRK-52E cells via the Nrf2/TLR4/NF- κ B pathway." *Cellular Physiology and Biochemistry* 45.4 (2018): 1677-1689.

Li, Xuezhu , et al. "Nephrin preserves podocyte viability and glomerular structure and function in adult kidneys." *Journal of the American Society of Nephrology* 26.10 (2015): 2361-2377.

Li, Zhifang , et al. "Monitoring kidney microanatomy changes during ischemia-reperfusion process using texture analysis of OCT images." *IEEE Photonics Journal* 9.2 (2017): 1-10. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Oct; 26(10): 2361–2377.

Li, Zhiming , and Yumei Wang. "Effect of NADPH oxidase inhibitor-apocynin on the expression of Src homology-2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) exposed renal ischemia/reperfusion injury in rats." *Toxicology Reports* 2 (2015): 1111-1116.

Liang, Hua, et al. "Pharmacological inhibition of Rac1 exerts a protective role in ischemia/reperfusion-induced renal fibrosis." *Biochemical and biophysical research communications* 503.4 (2018): 2517-2523.

Liu X, Cao W, Qi J, Li Q, Zhao M, Chen Z, Zhu J, Huang Z, Wu L, Zhang B, Yuan Y, Xing C. Leonurine ameliorates adriamycin-induced podocyte injury via suppression of oxidative stress. *Free Radic Res*. 2018 Sep;52(9):952-960.

Lowry, O.H., et al. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1951): 265-275.

MANNELLO, F.; MEDDA, V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in Hist and Cytoc*, v. 47, p. 27-58, 2012.

Martin, John, et al. "Induction of metalloproteinases by glomerular mesangial cells stimulated by proteins of the extracellular matrix." *Journal of the American Society of Nephrology* 12.1 (2001): 88-96.

Mehrotra, Purvi, et al. "IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 312.3 (2017): F385-F397.

Mizui, M. et al. "Transcription factor Ets-1 is essential for mesangial matrix remodeling." *Kidney International* 70 (2006): 298–305.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction." *Analytical biochemistry* 95 (1979): 351-358.

Ortega, Luis M., and Michael Heung. "The use of cell cycle arrest biomarkers in the early detection of acute kidney injury. Is this the new renal troponin?." *nephrology* 38.4 (2018): 361-367.

Pushpakumar, Sathnur , et al. "DNA hypermethylation in hyperhomocysteinemia contributes to abnormal extracellular matrix metabolism in the kidney." *The FASEB Journal* 29.11 (2015): 4713-4725.

Reel B, Guzeloglu M, Bagriyanik A, Atmaca S, Aykut K, Albayrak G, Hazan E. The effects of PPAR- γ agonist pioglitazone on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 2013 Jun 1;182(1):176-84. doi: 10.1016/j.jss.2012.08.020. Epub 2012 Aug 25. PMID: 22981741.

Richter, VFI, et al. "The role of maternal nutrition, metabolic function and the placenta in developmental programming of renal dysfunction." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43.1 (2016): 135-141.

Ridker PM, Lüscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 14;35 (2014):1782-91.

Rodríguez-Lara, Simón Quetzalcoatl, et al. "Alternative interventions to prevent oxidative damage following ischemia/reperfusion." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016 (2016).

Samadi, Mahsan, et al. "Evaluating the effect of remote ischemic preconditioning on kidney ischemia–reperfusion injury." *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 25 (2020).

Sato, Yuki, and Motoko Yanagita . "Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation." *Inflammation and regeneration* 37.1 (2017): 17.

Sawhney, Simon, et al. "Intermediate and long-term outcomes of survivors of acute kidney injury episodes: a large population-based cohort study." *American Journal of Kidney Diseases* 69.1 (2017): 18-28.

Shang,Yue, et al. Kidney Ischemia-Reperfusion Elicits Acute Liver Injury and Inflammatory Response. *Frontiers Medicine* 7 (2020).

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:106507.

Sutton TA, Kelly KJ, Mang HE, Plotkin Z, Sandoval RM, Dagher PC. Minocycline reduces renal microvascular leakage in a rat model of ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jan;288(1):F91-7.

Tan TK, Zheng G, Hsu TT, Lee SR, Zhang J, Zhao Y, Tian X, Wang Y, Wang YM, Cao Q, Wang Y, Lee VW, Wang C, Zheng D, Alexander SI, Thompson E, Harris DC. Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. *Lab Invest.* 2013 Apr;93(4):434-49.

Tobar N, Villar V, Santibanez JF. ROS-NFkappaB mediates TGF- β 1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem.* 2010 Jul;340(1-2):195-202.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Jun;10(6):1041-4.

Turkmen, Kultigin . "Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse." *International urology and nephrology* 49.5 (2017): 837-844.

Velimirović ,Milica, et al. "Effects of vitamin D3 on the NADPH oxidase and matrix metalloproteinase 9 in an animal model of global cerebral ischemia." *Oxidative medicine andcellularlongevity* 2018 (2018).

Ventura CG, Coimbra TM, de Campos SB, de Castro I, Yu L, Seguro AC. Mycophenolatemofetil attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *J Am SocNephrol.* 2002 Oct;13(10):2524-33.

Vieira-Filho et al. "Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. " *Archives of Biochemistry and Biophysics* 505 (2011): 91–97.

Vieira, Leucio D., et al. "Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol." *BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1864.12 (2018): 3577-3587.

Villa, Luca, et al. "Ouabain contributes to kidney damage in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury." *International journal of molecular sciences* 17.10 (2016): 1728.

Ying Q, Wu G. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update. *Ren Fail.* 39. 1 (2017): 474-483.

Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol.* 2007 Feb;19(1):55-62.

Wang, Q.K.D. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. *Brain Research*, v. 1090, n. 1, p. 182–189, 2006.

Welbourn, CR, et al. "Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 260.6 (1991): H1852-H1856.

Wu, Xiaoqiang , et al. "Micro-vesicles derived from human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells mitigate renal ischemia-reperfusion injury in rats after cardiac death renal transplantation." *Journal of cellular biochemistry* 119.2 (2018): 1879-1888.

Zeisberg , Elisabeth M., et al. "Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition." *Journal of the American Society of Nephrology* 19.12 (2008): 2282-2287.

Zuk, Anna, and Joseph V. Bonventre. "Acute kidney injury." *Annual review of medicine* 67 (2016): 293-307.

Manuscrito 2**O MICOFENOLATO DE MOFETILA E A APOCININA PREVINEM O ESTRESSE OXIDATIVO E LESÃO HEPÁTICA E CARDÍACA INDUZIDOS POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO RENAL**

Shirley Maria Sousa¹, Jeoadã Karollyne Silva¹, Marry Aneyts de Santana Cirilo¹, Jéssica Santos Schirato Albuquerque¹, Leucio Duarte Vieira¹

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Autor correspondente:

Leucio Duarte Vieira; e-mail: leucio.vieirafo@ufpe.br

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) representa uma súbita queda da função renal consequente principalmente de uma redução no fluxo sanguíneo renal. A lesão em órgãos distantes tem sido implicada na alta mortalidade dos pacientes, principalmente por injúria cardíaca e hepática. O sistema imune e a produção de espécies reativas do oxigênio via NADPH oxidase são fatores chave na lesão cardíaca e hepática, contudo, não é conhecida sua importância na lesão secundária a isquemia-reperfusão (IR) renal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar se o tratamento prévio com o imunossupressor micofenolato de mofetila (MMF) ou com o inibidor da NADPH oxidase apocinina são capazes de prevenir o impacto da LRA induzida por isquemia-reperfusão na lesão cardíaca e hepática. Ratos Wistar (300-400 g) foram submetidos à indução de LRA através da isquemia renal bilateral por 30 minutos seguida de 24h de reperfusão (IR). Esses animais foram divididos em três grupos, onde um grupo foi tratado com veículo (IR, n=8), um grupo foi tratado com MMF (30 mg/kg de peso corpóreo, via gavagem) (IRM, n=8), e outro grupo foi tratado com apocinina (100 mg/kg de peso corpóreo, na água de beber) (IRA, n=8). Os tratamentos com apocinina e MMF foram administrados em dose única 24 horas antes da indução da LRA pela IR. Um grupo de animais foi submetido a uma simulação da cirurgia (grupo Sham, n=8). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os ratos foram anestesiados para coleta de sangue, fígado e ventrículo esquerdo. Foi evidenciado que a IR induziu elevação dos marcadores séricos de lesão renal (creatinina), hepática (aspartato e alanina aminotransferases) e cardíaca (creatina kinase total e isoforma MB da creatinina kinase). Além disso, foi observado que a IR renal elevou a peroxidação lipídica do fígado e do ventrículo esquerdo, simultaneamente a inibição da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, bem como com ativação da enzima pró-oxidante NADPH oxidase. No ventrículo esquerdo, a IR renal promoveu aumento da atividade das ATPases transportadoras de Na^+ , $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$, juntamente com inibição da atividade da SERCA e da PMCA, ATPases transportadoras de Ca^{2+} . Os tratamentos com MMF ou apocinina preveniram as alterações induzidas pela IR renal no ventrículo esquerdo e fígado. Em conclusão, os dados do presente trabalho indicam uma forte participação do sistema imune e da NADPH oxidase na lesão cardíaca e hepática secundária a IR renal, trazendo a luz uma possível rota integradora para os mecanismos de lesão no próprio tecido-alvo, bem como em órgãos distantes.

Palavras-chave: Apocinina; Coração; Fígado; Isquemia-reperfusão renal; Micofenolato de mofetila.

INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é uma condição patológica que ocorre no sistema renal principalmente devido a uma redução no fluxo sanguíneo renal (Rojas-Morales et al., 2019). Globalmente, estima-se que 41,2% dos pacientes não se recuperaram da LRA antes hospitalização, e apenas 20% deles recuperaram sua função renal normal (Hoste et al., 2018). Apesar de ser associada com alta mortalidade, a LRA não é normalmente a causa direta de morte nos pacientes (Kelly e Molitoris, 2000). A resposta inflamatória sistêmica induzida pela LRA e a progressão de danos a órgãos remotos têm sido implicadas na alta mortalidade dos pacientes, com uma ligação causal entre a LRA e a disfunção de órgãos distantes, como o coração (Gammelager et al. 2014, Parikh et al., 2017) e o fígado (Gholampour F, 2018; Amini N., 2019).

Acredita-se que fatores humorais e/ou celulares sejam as causas de falência de órgãos remotos induzida pela LRA, mas os exatos mecanismos fisiopatológicos não são completamente compreendidos (Kelly, 2003; Hoke et al., 2007). No fígado, há evidências de que a LRA induz alterações graves na histologia, função, estresse oxidativo e estado inflamatório do órgão, reduzindo assim a capacidade antioxidante hepática (Gholampour F, 2018; Amini N., 2019). Durante a IR renal, os índices funcionais do fígado, como AST e ALT no sangue, apresentam-se elevados (Golab et al., 2009). Além disso, a IR renal está relacionada ao aumento da atividade da mieloperoxidase e diminuição dos níveis de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Serteser et al., 2002).

A LRA também tem sido associada a eventos cardiovasculares (Gammelager et al. 2014, Parikh et al., 2017), sendo caracterizada a síndrome cardiorrenal tipo 3 (ou síndrome renocárdica aguda) (Ronco et al., 2010). Além disso, a lesão cardiovascular remota pode contribuir para desfechos ruins após LRA (Yap e Lee, 2012). A disfunção cardíaca induzida por LRA tem sido justificada por diversos mecanismos, incluindo sobrecarga hídrica contribuindo para edema pulmonar, acidemia causando vasoconstrição pulmonar, uremia não tratada resultando em pericardite e diminuição da contratilidade miocárdica e hipercalemia causando arritmias (Ronco et al., 2010). A disfunção da contratilidade cardíaca, por sua vez, tem sido associada a acúmulo de cálcio, aumento de estresse oxidativo e da secreção de citocinas inflamatórias (Icoglu Aksakal F., 2021).

O dano tecidual inicial ocorre devido a cascatas inflamatórias, ativação do sistema imune inato, bem como, a produção de citocinas, quimiocinas e a ativação de leucócitos (Fu e Li, 2017; Ornellas et al., 2017; Peralta et al., 2013). As respostas imunes inatas e adaptativas estão presentes em mecanismos fisiopatológicos presentes em doenças renais, hepáticas e cardíacas. No rim, a lesão renal isquêmica é caracterizada por apoptose e necrose de células epiteliais tubulares proximais (Carden e Granger, 2000).

As consequências dessa morte celular programada e necrótica no rim incluem a ativação do sistema imune inato por hipóxia regional e detritos celulares locais, o que evoca a liberação de moléculas de padrão molecular associado ao dano (DAMP) e induz a infiltração local de células imunes no tecido e aumento concomitante da produção de citocinas inflamatórias (Carden e Granger, 2000; Sharfuddin e Molitoris, 2011). No coração, é observado que a IR renal está associada a um aumento do RNAm para TNF- α , IL-1, e ICAM-1 (Kelly et al., 2003), enquanto que no fígado, está associada também ao aumento do conteúdo de TNF- α e infiltração de linfócitos T e neutrófilos (Miyazawa et al., 2002).

Embora uma variedade de mecanismos moleculares sejam propostos para explicar a lesão por isquemia-reperfusão, o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ainda recebe atenção como fator crítico na gênese da lesão (Carcy et al., 2021; Xiang et al., 2021; Orellana-Urzúa et al., 2020). A NADPH oxidase é uma das mais importantes fonte de produção de EROs na injúria por isquemia-reperfusão, e sua ativação está associada a lesão em órgãos como coração e fígado (Granger e Kvietys, 2015). A produção aumentada de EROs mediada pela NADPH oxidase está associada com a oxidação do NF- κ B que leva ao aumento da expressão da IL1 β e amplificação do recrutamento de neutrófilos. Além disso, as citocinas produzidas por macrófagos e mastócitos exercem uma retroalimentação positiva nessa relação através da indução da superexpressão da NADPH oxidase (Bajpai, 2019; RAD, 2018).

Apesar do sistema imune e da NADPH oxidase serem mecanismos reconhecidamente importantes na lesão de diversos tecidos, não se sabe a importância desses dois fatores na lesão cardíaca e hepática secundária a isquemia-reperfusão renal. É possível que o tratamento com o inibidor da NADPH oxidase apocinina ou com o imunossupressor MMF sejam capazes de reverter ou pelo menos minimizar os danos nesses órgãos causada pela IR renal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar se o tratamento prévio com MMF ou apocinina são capazes de prevenir o impacto da LRA induzida por isquemia-reperfusão na lesão cardíaca e hepática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Apocinina (acetovanilona), fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF), N,N'-dimetil-9,9'-biacridínio dinitrato (lucigenina), HEPES, sal dissódico dihidratado de adenosina 5'-trifosfato (ATP), ácido N,N,N',N'-tetraacético bis(2-aminoetiléter) etileno glicol (EGTA), tapsigargina, ouabaína, furosemida, NADPH, e epinefrina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O micofenolato de mofetila foi obtido da Intas Biopharmaceuticals (Ahmedabad, Índia). Os sistemas comerciais colorimétricos para análise dos marcadores séricos de lesão cardíaca e hepática foram adquiridos da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, Brasil). Todos os outros reagentes foram da mais alta pureza disponível.

Animais

Todos os protocolos e procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética Experimental e Animal da Universidade Federal de Pernambuco (nº 0053/2018). Ratos Wistar pesando cerca de 300 a 400 g foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas a 22°C, com livre acesso a água e ração comercial.

Para indução da LRA, os ratos foram submetidos à isquemia renal bilateral seguida de 24h de reperfusão. Após anestesia (cetamina e xilazina, 80 e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente), foi feita incisão na cavidade abdominal para expor os rins e a isquemia foi realizada pelo posicionamento bilateral de pinças nas artérias renais por 30 min. Após esse período, a perfusão renal foi restaurada, sendo sequencialmente realizada a sutura da incisão na região abdominal. O grupo controle foi submetido a um procedimento cirúrgico semelhante ao grupo experimental, mas as artérias não foram pinçadas (grupo Sham, n = 8). Os animais submetidos à lesão por IR foram divididos em três grupos experimentais (n=8/grupo), conforme tratamento recebido 24 horas antes da realização da IR: i) um grupo recebeu administração intragástrica de água potável (veículo; 1 mL/kg de peso corporal); ii) um grupo foi tratado com dose única intraperitoneal do imunossupressor micofenolato mofetil (30 mg/kg de peso corporal, grupo IRM); e iii) um grupo recebeu o tratamento na água de beber com o inibidor da NADPH oxidase apocinina (100 mg/kg de peso corporal, grupo IRA). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados (cetamina e xilazina) para coleta de sangue (veia cava inferior), fígado e coração (ventrículo esquerdo). Em seguida, as amostras foram instantaneamente

congeladas por imersão em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . Ao final da coleta das amostras de órgãos, os ratos foram sacrificados por exsanguinação enquanto ainda se encontravam anestesiados.

Marcadores séricos de função/lesão tecidual

Os níveis plasmáticos de creatinina, creatina kinase (CK), isoforma MB da creatina kinase (CKMB), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase foram mensurados através de ensaios comerciais utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

Atividade das ATPases transportadoras de Na^{+} e Ca^{2+}

A atividade das ATPases transportadoras de Na^{+} e Ca^{2+} foram avaliadas em fragmentos de ventrículo esquerdo descongelados em banho-de-gelo (4°C) imediatamente antes do ensaio e homogeneizados em solução-tampão HEPES-Tris 10 mM (pH7,4) contendo sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM e inibidor de tripsina (tipo IIS) 0,15 mg/L.

As atividades da $(\text{Na}^{++}\text{K}^{+})\text{ATPase}$ sensível à ouabaína e $\text{Na}^{+}\text{-ATPase}$ sensível à furosemida foram avaliadas, de acordo com o método descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981), utilizando inibidores específicos. A atividade $(\text{Na}^{++}\text{K}^{+})\text{ATPase}$ nas amostras do ventrículo esquerdo foi calculada a partir da diferença de fosfato inorgânico (Pi) liberado da hidrólise do ATP na ausência e presença de ouabaína 2 mM. A atividade da $\text{Na}^{+}\text{-ATPase}$ nas amostras foi calculada a partir da diferença de Pi liberado na ausência e presença de furosemida 2 mM.

As atividades da PMCA e da SERCA foram avaliadas conforme descrito em Ferrão et al. (2012), utilizando inibidores específicos. A atividade total das ATPases transportadoras de Ca^{2+} foi definida pela diferença de fosfato inorgânico liberado da hidrólise do ATP na ausência e na presença de EGTA 2 mM. A atividade da SERCA foi representada pela atividade da $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ sensível à tapsigargina, enquanto que a atividade residual representou a atividade da PMCA.

Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo foi estimada no ventrículo esquerdo e fígado a partir da mensuração da peroxidação lipídica que foi mensurada através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês thiobarbituric acid

reactive substances) em homogenato de tecido, de acordo com o método de Ohkawa et al. (1979). Pedacos dos órgãos foram homogeneizados em solução de KCl 1,15% e EDTA 3 mM em banho-de-gelo. Subsequentemente, cerca de 10 mg do tecido foi adicionado a um meio de reação contendo dodecil sulfato de sódio 0,4%, ácido acético tricloroacético 7,5% e ácido tiobarbitúrico 0,5%, que foi aquecido em banho-maria a 95°C por 60 min. Após resfriamento, os tubos foram centrifugados por 10 min a 1000 x g, e a absorbância do sobrenadante foi mensurada em 535 nm. Os valores mensurados foram comparados a uma curva-padrão construída utilizando 1,1,3,3-tetraetoxipropano e corrigidos de acordo com a quantidade total de proteína presente no homogenato.

Atividade da NADPH oxidase

A avaliação da atividade da NADPH oxidase foi realizada através da quantificação de superóxido produzido na presença de NADPH (100 µM), conforme Lima et al. (2021). A produção de superóxido foi mensurada através da quimioluminescência derivada da lucigenina. As amostras de homogenato tissular (100 µg) ou de células (10⁵ células) foram adicionadas a um meio de reação contendo lucigenina 10 µM e NADPH 100 µM, e a luminescência foi mensurada através de um luminômetro (Varioskan Flash, Thermo Scientific). O resultado foi expresso em unidade relativa de luz por minuto e corrigido pela quantidade de proteína na amostra. A liberação de superóxido também foi avaliada na ausência de NADPH, e representou a produção basal de superóxido.

Atividade da SOD e da catalase

A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da amostra em reduzir a formação do cromóforo róseo, o adrenocromo, a partir da oxidação da epinefrina (Misra e Fridovich, 1972). A amostra (10 mg de proteína/mL) foi adicionada a uma solução contendo glicina 50 mM, pH 10,0. Em seguida, a solução foi suplementada com epinefrina 1,5 mM. A velocidade de formação do adrenocromo foi estimada pela mensuração da absorbância em intervalos de 15 segundos durante 2 minutos. Os valores da SOD foram expressos em U SOD g⁻¹, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo.

A atividade da catalase foi estimada pela mensuração do decaimento da absorbância ocasionado pela redução de H₂O₂ a água, conforme (Aebi, 1984). Para esse ensaio, a amostra (10 mg de proteína/mL) foi adicionada a uma solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0). Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi medida a cada 15 segundos durante um intervalo de 2 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata, e os valores expressos em mmol de H₂O₂ consumido por minuto e por grama, utilizando o coeficiente de extinção do H₂O₂ para o cálculo.

Análise estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A distribuição de cada conjunto de dados foi avaliada por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. As médias foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$. A análise estatística e a representação gráfica foram realizadas no software GraphPad Prism 5 (versão 5.01, La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

Níveis de creatina kinase e creatina kinase-MB sérica cardíacos

Os níveis séricos de creatinina foram mensurados para confirmar a efetividade da indução da LRA pela IR, bem como o efeito dos tratamentos com MMF e apocinina. A presença de lesão no tecido cardíaco foi investigada através da mensuração dos níveis séricos de CK total e CK-MB, enquanto a lesão hepática foi identificada pela mensuração dos níveis séricos de AST e ALT. Os resultados dos marcadores séricos de lesão/disfunção tecidual são apresentados na Tabela 1.

Os níveis séricos de creatinina foram notavelmente superiores ($\sim 1000\%$, $P < 0,001$) no grupo IR em relação ao grupo Sham. Ambos grupos tratados também apresentaram níveis séricos elevados de creatinina ($\sim 700\%$, $P < 0,001$) em relação ao grupo Sham, contudo, os valores também se apresentaram inferiores ao grupo IR (Tabela 1).

Os animais submetidos a IR renal apresentaram um aumento de $\sim 150\%$ ($P < 0,01$) nos níveis séricos de CK total e um aumento de $\sim 90\%$ ($P < 0,01$) nos níveis séricos de CK-MB em comparação ao grupo Sham. Enquanto isso, os animais IR tratados com MMF apresentaram menores valores de ambos marcadores de lesão cardíaca em relação ao grupo sem tratamento. Em comparação ao grupo IR, o grupo tratado com apocinina apresentou menores valores séricos apenas da CK-MB. Contudo, os valores de CK total dos animais tratados com apocinina também não foram diferentes do Sham.

A IR renal também impactou os marcadores séricos de lesão hepática. Os níveis séricos de AST foram cerca de 60% maiores ($P < 0,05$) no grupo IR em comparação com o grupo Sham, enquanto que os níveis de ALT foram quase três vezes ($P < 0,05$) superiores. Por outro lado, os tratamentos com MMF ou apocinina preveniram a elevação dos níveis séricos de AST e ALT induzidos pela IR renal.

Atividade das ATPases transportadoras de Na^+ e Ca^{2+} no ventrículo esquerdo

A atividades das ATPases do ventrículo esquerdo foi mensurada com a finalidade de se estimar o impacto da IR renal na função celular dos miócitos cardíacos (Figura 1). O grupo de ratos submetidos a IR renal apresentou maior atividade (Na^++K^+)ATPase (300% , $P < 0,01$) e da $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ (160% , $P < 0,001$) em relação ao grupo Sham (Figura 1A e B). Além disso, também foi observado que a IR renal induziu uma diminuição na atividade da SERCA (60% , $P < 0,001$) e da PMCA (70% , $P < 0,05$) no ventrículo esquerdo (Figura 1C e D). Os tratamento com MMF e apocinina preveniram

a alteração da atividade das ATPases transportadoras de Na^+ e de Ca^{2+} induzidas pela IR renal.

Avaliação do balanço redox cardíaco e hepático

O balanço redox foi estimado inicialmente a partir da avaliação da peroxidação lipídica cardíaca e hepática (Figura 2). A peroxidação lipídica foi expressivamente superior no ventrículo esquerdo ($\sim 70\%$, $P < 0,05$) e no fígado ($\sim 50\%$, $P < 0,01$) do grupo IR em relação ao grupo Sham. Por outro lado, os animais IR tratados com MMF ou apocinina apresentaram peroxidação lipídica inferior aos ratos IR sem tratamento.

Em paralelo a elevação da peroxidação lipídica cardíaca, os animais submetidos a IR renal apresentaram aumento da produção basal de ânion superóxido ($\sim 270\%$, $P < 0,001$) e da atividade da NADPH oxidase ($\sim 110\%$, $P < 0,001$) em comparação ao grupo Sham (Figura 3A e B). Por outro lado, os grupos tratados com MMF e apocinina apresentaram menor produção basal de ânions superóxido e menor atividade da NADPH oxidase do que os animais submetidos a IR renal que não receberam tratamento.

Adicionalmente à elevação da produção de ânions superóxido e da atividade da NADPH oxidase, foi observado que a IR renal induziu uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD ($\sim 60\%$, $P < 0,001$) e catalase ($\sim 80\%$, $P < 0,001$) no ventrículo esquerdo (Figura 3C e D). Ambos os tratamentos aumentaram a atividade da SOD em comparação ao grupo IR sem tratamento. Entretanto, apenas o grupo que recebeu tratamento com MMF apresentou proteção ao efeito da IR sobre a atividade da catalase.

No fígado, o perfil de alteração das vias oxidativas e antioxidativas endógenas induzida pela IR renal foi semelhante ao que foi observado no ventrículo esquerdo (Figura 4): i) aumento da produção basal de ânions superóxido ($\sim 150\%$ ($P < 0,001$); ii) aumento da atividade da NADPH oxidase ($\sim 50\%$, $P < 0,05$); iii) diminuição da atividade da SOD ($\sim 60\%$, $P < 0,001$); e iv) diminuição da atividade da catalase ($\sim 70\%$, $P < 0,001$).

Os tratamentos com MMF e apocinina preveniram completamente as alterações induzidas pela IR renal na produção basal de ânions superóxido, na atividade da NADPH oxidase e na atividade da SOD. Por outro lado, a proteção dos tratamentos com MMF e apocinina sobre a alteração da atividade da catalase induzida pela IR renal foi parcial, considerando que os grupos IR que receberam tratamento apresentaram valores superiores ao grupo sem tratamento, contudo inferiores ao grupo Sham.

Tabela 1. Marcadores séricos de disfunção renal, lesão cardíaca e lesão hepática

	Sham	IR	IRM	IRA
Creatinina sérica, mg/dL	0,50 ± 0,01	5,03 ± 0,23 ***	4,10 ± 0,27 *** ††	4,32 ± 0,09 *** †
Creatina kinase total, U/L	132 ± 19	282 ± 21**	153 ± 26 ††	196 ± 32
Creatina kinase MB, U/L	82 ± 2	156 ± 12 ***	115 ± 5 **††	108 ± 5 ***††
AST, U/L	71 ± 4	113 ± 2 *	72 ± 9 †	68 ± 16 †
ALT, U/L	25 ± 6	89 ± 21 **	41 ± 3 †	58 ± 6

Sham = Simulação da cirurgia (n=8), IR = Isquemia/reperfusão (n=8), IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil (n=8), IRA = Isquemia/reperfusão + apocinina (n=8). AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase. Dados expressos como média ± EPM. Uma comparação entre as médias dos grupos foi realizada pela análise de variância unilateral, seguida do teste de Tukey: *P <0,05, **P <0,01 e ***P <0,001 vs. Sham. †P <0,05, ††P <0,01 vs. IR e †††P <0,01 vs. IR.

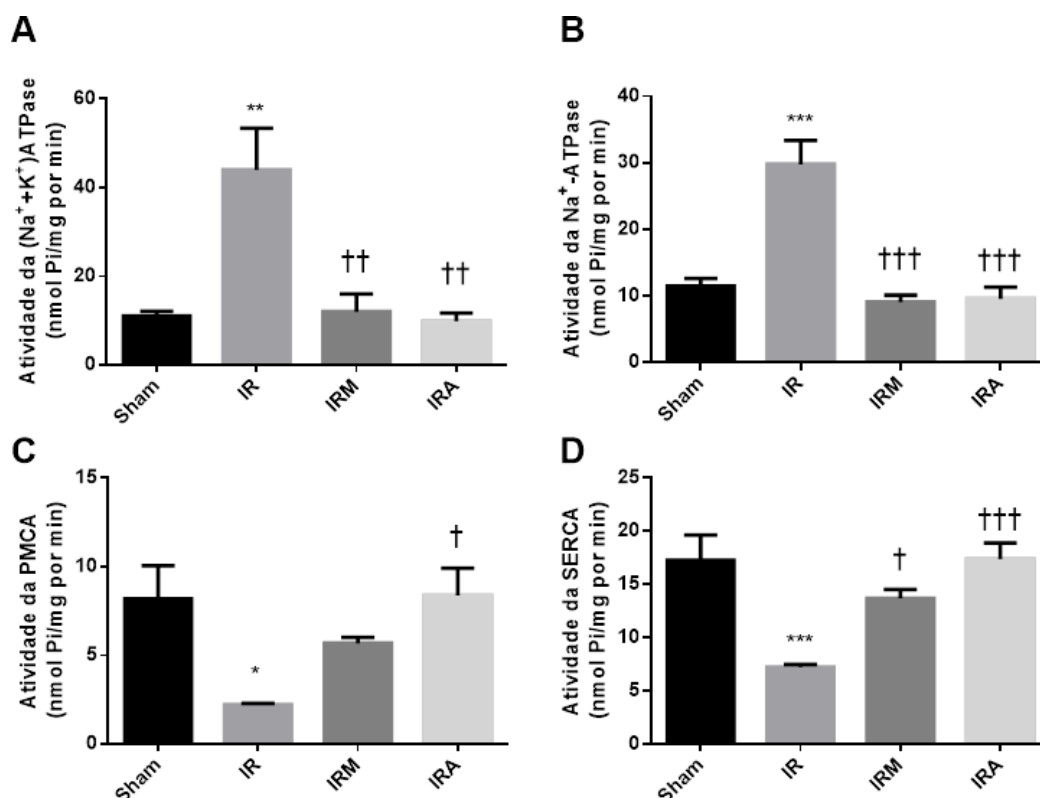


Figura 1. Efeitos do micofenolato de mofetil e apocinina sobre as ATPases transportadoras de Na⁺ e Ca²⁺ do ventrículo esquerdo de ratos adultos submetidos à IR renal. (A) atividade da Na⁺/K⁺-ATPase. (B) atividade da Na⁺-ATPase. (C) atividade da PMCA. (D) atividade da SERCA. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão renal, IRM = Isquemia / reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Dados expressos como média ± SEM. A comparação

entre as médias dos grupos foi realizada pela análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 Vs. Sham, †P < 0,05, ††P < 0,01 e †††P < 0,001 vs. IR.

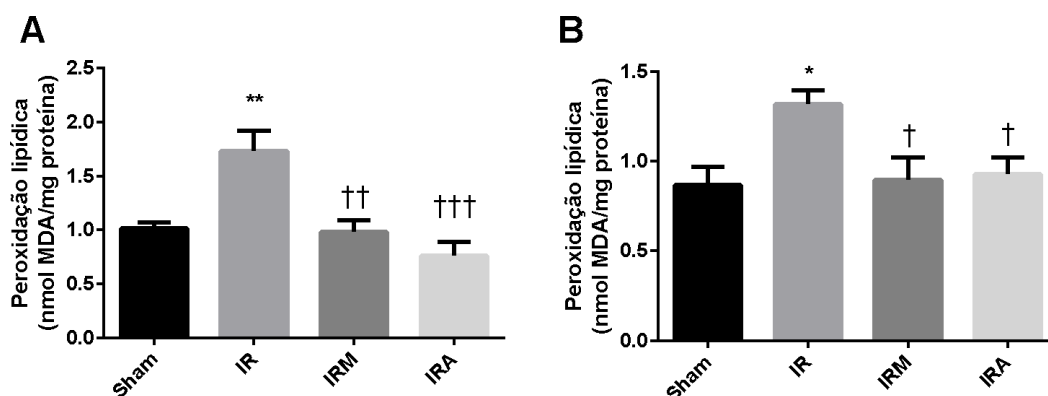


Figura 2. Efeitos do micofenolato de mofetil e apocinina no estresse oxidativo do ventrículo esquerdo (A) e do fígado (B) de ratos adultos submetidos a IR renal. MDA = malondialdeído. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Dados expressos como média $\pm$ SEM. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada pela análise de variância one-way seguida do teste de Tukey: *P < 0,05 e **P < 0,01 Vs. Sham, †P < 0,05, ††P < 0,01 e †††P < 0,001 vs. IR.

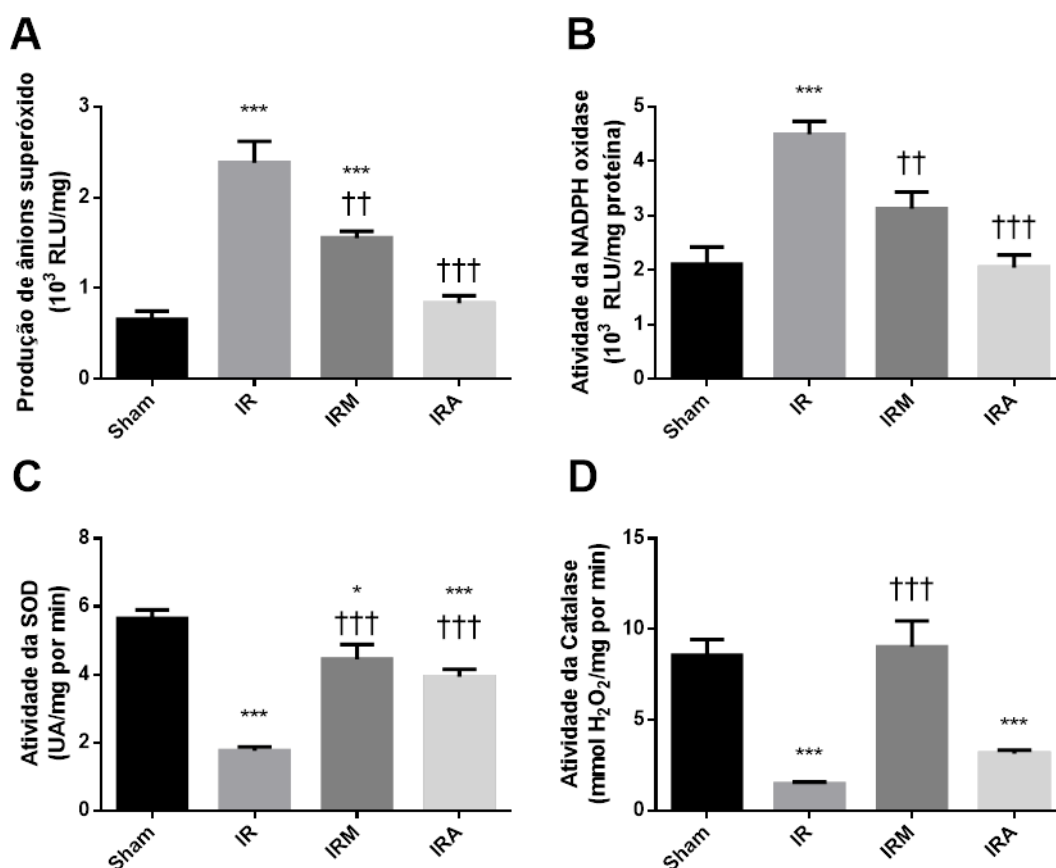


Figura 3. Efeito do micofenolato de mofetil e apocinina na atividade da NADPH oxidase, da superóxido dismutase e da catalase no ventrículo esquerdo de ratos adultos submetidos a IR renal. (A) Produção basal de ânions superóxido; (B) atividade da NADPH oxidase; (C) atividade da superóxido desmutase; e (D) atividade da catalase. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM =

Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Dados expressos como média $\pm$ SEM. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ Vs. Sham, †† $P < 0,01$ e ††† $P < 0,001$ vs. IR.

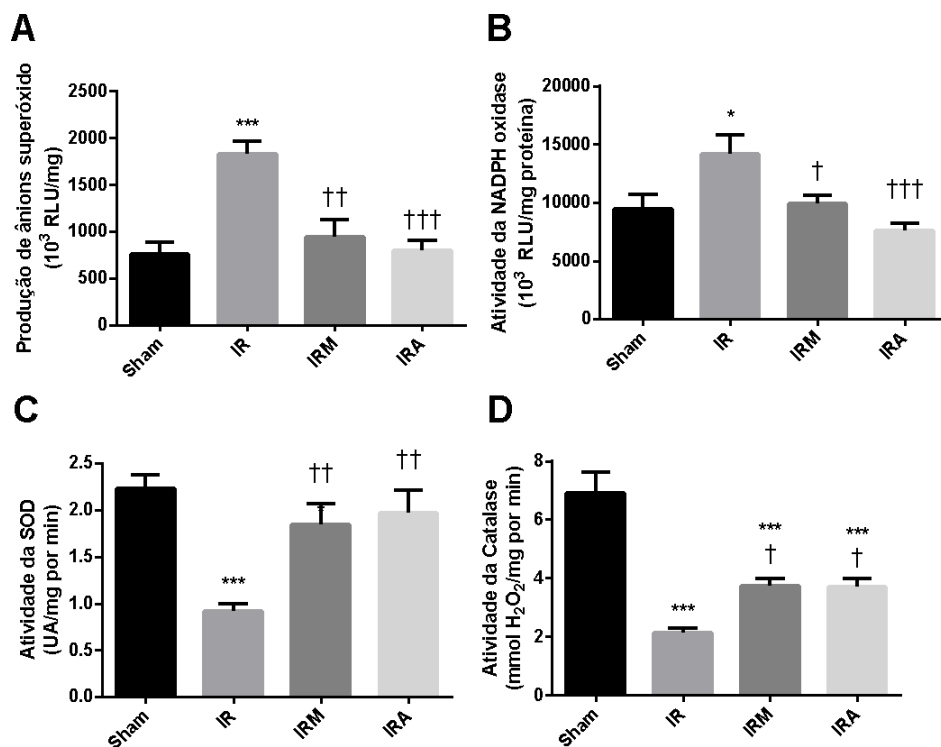


Figura 4. Efeito do micofenolato de mofetil e apocinina na atividade da NADPH oxidase, da superóxido dismutase e da catalase no fígado de ratos adultos submetidos a IR renal. (A) Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram medidos usando a sonda dihidroetida fluorescente (DHE). (B) atividade da NADPH oxidase. (C) atividade da superóxido desmutase. (D) catalase. Sham = Simulação de cirurgia, IR = Isquemia/reperfusão, IRM = Isquemia/reperfusão + micofenolato de mofetil, IRA = Isquemia/reperfusão + Apocinina. Dados expressos como média $\pm$ SEM. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por análise de variância unilateral seguida do teste de Tukey: *** $P < 0,001$ Vs. Sham, † $P < 0,05$, †† $P < 0,01$ e ††† $P < 0,001$ vs. IR.

DISCUSSÃO

A LRA é uma condição clínica de alta prevalência e que apresenta elevada taxa de mortalidade, contudo a causa da morte do paciente é normalmente associada à lesão em órgãos distantes como o fígado e o coração (Kelly e Molitoris, 2000). Apesar do conhecimento de que os mecanismos da lesão nos órgãos distantes envolvem a participação de fatores celulares, humorais e estresse oxidativo (Kelly, 2003), não se sabe se o tratamento com fármacos imunossuppressores ou inibidores da NADPH oxidase seriam capazes de atenuar os efeitos da LRA. No presente estudo, pela primeira vez, é demonstrada a importância da NADPH oxidase na lesão cardíaca e hepática induzida pela IR renal, bem como a sensibilidade da lesão ao tratamento com imunossupressor MMF, o que indicam a forte participação do sistema imune e da NADPH oxidase como mecanismos indutores do estresse oxidativo no coração e fígado.

Outro resultado inédito é representado pela identificação da sensibilidade das ATPases cardíacas ao estresse oxidativo induzido pela IR renal, que ilustra um possível mecanismo celular responsável pelas alterações funcionais do órgão.

O primeiro resultado que retrata o papel protetor do MMF e da apocinina é a prevenção da alteração dos marcadores séricos de lesão hepática, AST e ALT (Golab et al., 2009; Mohammadi et al., 2019). A lesão hepática induzida por IR renal está associada com elevação do estresse oxidativo, diminuição da capacidade antioxidante total, aumento da produção de moléculas de adesão celular, aumento da infiltração de leucócitos e fibrose intersticial (Mohammadi et al., 2019). Além disso, esse modelo também está associado ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Golab et al., 2009) e diminuição da primeira linha de defesa enzimática antioxidante (Hou et al., 2021). Neutrófilos atraídos e ativados migram e aderem ao endotélio, causando a liberação de proteases e radicais livres de oxigênio, que podem desencadear a ativação das células de Kupffer do fígado, o que pode levar à disfunção hepática (Yoshitomi T et al. 2013).

O efeito protetor do MMF reforça o papel dos mediadores celulares do sistema imune no mecanismo de lesão hepática pós IR renal, enquanto que a proteção conferida pela administração de apocinina reforça a importância da produção de EROs mediada pela NADPH oxidase. Os presentes resultados também retratam que o efeito protetor de ambos os tratamentos sobre a lesão hepática ocorreu em conjunto com a prevenção da elevação da peroxidação lipídica e com a indução da elevação da atividade da atividade

da SOD e da catalase. A SOD e a catalase são enzimas fundamentais na primeira linha de combate à produção excessiva de EROs (Sun et al., 2020), e uma falha na defesa antioxidante celular pode ocasionar disfunção mitocondrial através da produção descontrolada de EROs (Kim e Kim, 2018). A diminuição da atividade da SOD e da catalase no fígado pode ser dependente da inibição de sua expressão gênica induzida pela IR renal (Hou et al., 2021), sendo, possivelmente, um mecanismo mediado por uma diminuição da função da Nrf2, um fator transcricional chave para a regulação da defesa antioxidante que também é suprimido no fígado em consequência da IR renal (Awad et al., 2020). Além disso, já foi descrito que o MMF apresenta hepatoproteção através de efeitos mediados pela do Nrf2/heme-oxigenase 1 em outros modelos experimentais de lesão renal (Serrya e Zaghrou, 2020).

Apesar de termos observado que a lesão hepática secundária à IR renal ocorreu paralelamente a elevação do estresse oxidativo tecidual, assim como outros (Awad et al., 2020; Hou et al., 2021), um importante questionamento que ainda permanecia quase intangível pela literatura era quais seriam as fontes das EROs no fígado. Nossos resultados apresentam fortes indicativos da importância da NADPH oxidase nesse processo. Primeiro, observamos que a apocinina, um inibidor do acoplamento da subunidade regulatória p47phox às subunidades de membrana previne a elevação da peroxidação lipídica hepática. Secundariamente, demonstramos que os animais submetidos a IR renal apresentam elevação da atividade da NADPH oxidase em homogenatos do tecido hepático. Esses resultados reforçam com maior clareza o papel dessa enzima pró-oxidativa na etiologia do estresse oxidativo hepático secundário a LRA. Apesar disso, não podemos excluir a participação de outros mediadores nesse processo, tais como mieloperoxidase, mitocôndrias, xantina oxidase e ciclo-oxigenases (Granger e Kvietys, 2015).

Da mesma forma que o fígado, o coração é um órgão sensível à injúria induzida pela IR renal (Yap e Lee, 2012; Youssef et al., 2015; Prud'homme et al., 2019; Tai et al., 2021). A insuficiência cardíaca é uma das causas de morte que lideram na população de pacientes com LRA (Yap e Lee, 2012). No presente estudo, observamos a elevação dos marcadores séricos de lesão cardíaca, CK total e CK-MB, induzida pela IR renal, conforme observada por outros (Youssef et al., 2015; Tai et al., 2021). Esses biomarcadores são amplamente utilizados na clínica e experimentalmente para identificar lesão renal aguda do miocárdio.

Diversos mecanismos têm sido associados à injúria cardíaca secundária a IR renal, como, elevação de citocinas pró-inflamatórias, superexpressão de moléculas de adesão e infiltração de células imunes (Kelly, 2003). Interessantemente, esses mecanismos são comuns à lesão renal hepática pós IR renal (Mohammadi et al., 2019), e, da mesma forma que no fígado, observamos que os tratamentos com MMF ou apocinina preveniram a alteração dos marcadores séricos de lesão cardíaca. Essa observação reforça a existência de uma superativação do sistema imune e da NADPH oxidase como um mecanismo comum ao dano em diversos órgãos-distantes.

Dessa forma, é plausível sugerirmos de que o efeito do MMF ocorre através da inibição do impacto que o sistema imune apresenta com a modulação negativa das enzimas de primeira linha de defesa antioxidante (Ighodaro e Akinloye, 2018), bem como com a superativação da produção de EROs (Granger e Kvietys, 2015). Por outro lado, a proteção mediada pela apocinina ocorreria não somente pela inibição da NADPH oxidase, mas também por efeitos indiretos que envolveriam o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, bem como pela inibição da infiltração de células imunes (Sun et al., 2020).

Adicionalmente as alterações dos marcadores séricos de lesão cardíaca, diversos estudos demonstram que a IR renal induz apoptose dos miócitos cardíacos, hipertrofia e fibrose cardíaca, e disfunção ventricular esquerda (Burchill et al. 2008;). No presente estudo, é demonstrado pela primeira vez que a IR renal desregula a atividade das ATPases cardíacas envolvidas no transporte de Na^+ e Ca^{2+} . A IR renal aumentou a atividade das ATPases transportadoras de Na^+ , e é possível conjecturar que isso ocorre secundariamente a elevação do conteúdo intracelular de Na^+ , uma vez que a elevação da produção de EROs está associada a abertura de canais de Na^+ em miócitos cardíacos (Wagner et al., 2013). Essa última associação é defendida graças à observação da elevação da peroxidação lipídica e da produção basal ânions superóxido no ventrículo esquerdo, bem como ao fato da atividade das ATPases transportadoras de Na^+ serem suprarreguladas pela oferta de Na^+ no ambiente intracelular (Fukuda et al., 2005).

Por sua vez, o aumento do conteúdo intracelular de Na^+ pode levar a um prolongamento do potencial de ação, o que favorece a depleção do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Wagner et al., 2006). Em paralelo, a IR renal induziu uma inibição da atividade da SERCA, outro fator que está relacionado ao acúmulo de Ca^{2+} intracelular, que traz como consequência uma diminuição da força de contração cardíaca e maior risco de surgimento de arritmias (Wagner et al., 2011). Um possível mecanismo

integrador para a sensibilidade da SERCA e da $(Na^{++}K^{+})ATPase$ à IR renal, é a ativação da PKC em resposta ao aumento de EROs, que é capaz de promover fosforilação inibitória da ATPase do retículo sarcoplasmático e estimular a bomba de Na^{+} e K^{+} por fosforilação inibitória da *phospholemmann*, mediador intracelular que promove a dissociação da subunidade catalítica (Despa et al., 2005).

É importante salientar que os efeitos protetores do MMF e da apocinina não foram restritos aos órgãos distantes. Observamos que ambos os tratamentos preveniram a elevação dos níveis séricos de creatinina induzidos pela IR renal, bem como, exerceram efeitos anti-fibróticos renais através da modulação da via ROS/TGF- β 1/MMP-2 e -9 (Dados não-publicados). Dessa forma, é possível que os tratamentos tenha repercutido de maneira direta e indireta na proteção da lesão dos órgãos distantes.

Em conclusão, os dados do presente trabalho indicam uma forte participação do sistema imune e da NADPH oxidase na lesão cardíaca e hepática secundária a IR renal, trazendo a luz uma possível rota integradora para os mecanismos de lesão no próprio tecido-alvo como em órgãos distantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Profa. Dayane Aparecida Gomes pelo acesso aos equipamentos localizados em seu laboratório (Plataforma Multiusuário em Biologia Celular e Molecular – FACEPE 16/2012; nº 1133-2.07/2012). Agradecemos também a Nielson T. Mello e Danielle Dutra pelo suporte técnico.

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq; 474004/2013-9 e 432468/2016-1); pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; números APQ-1072-2.07/15 e APQ-0409-2.07/14); e, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES).

REFERÊNCIAS

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, 121-126.

Amini N, Sarkaki A, Dianat M, Mard SA, Ahangarpour A, Badavi M. Protective effects of naringin and trimetazidine on remote effect of acute renal injury on oxidative stress and myocardial injury through Nrf-2 regulation. *Pharmacol Rep*. 2019 Dec;71(6):1059-1066.

Awad AS, Elariny HA, Sallam AS. The possible protective effect of colchicine against liver damage induced by renal ischemia-reperfusion injury: role of Nrf2 and NLRP3 inflammasome. *Can J Physiol Pharmacol*. 2020 Dec;98(12):849-854.

Burchill L, Velkoska E, Dean RG, Lew RA, Smith AI, Levidiotis V, Burrell LM. Acute kidney injury in the rat causes cardiac remodelling and increases angiotensin-converting enzyme 2 expression. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):622-30.

Carcy R, Cougnon M, Poet M, Durandy M, Sicard A, Counillon L, Blondeau N, Hauet T, Tauc M, F Pisani D. Targeting oxidative stress, a crucial challenge in renal transplantation outcome. *Free Radic Biol Med*. 2021 Jun;169:258-270.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000 Feb;190(3):255-66.

Despa S, Bossuyt J, Han F, Ginsburg KS, Jia LG, Kutchai H, Tucker AL, Bers DM. Phospholemman-phosphorylation mediates the β -adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2005 Aug 5;97(3):252-9.

Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, Zahedi K, Lentsch AB, Soleimani M. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int*. 2009 Apr;75(8):783-92.

Ferrão FM, Lara LS, Axelband F, Dias J, Carmona AK, Reis RI, Costa-Neto CM, Vieyra A, Lowe J. Exposure of luminal membranes of LLC-PK1 cells to ANG II induces dimerization of AT1/AT2 receptors to activate SERCA and to promote Ca^{2+} mobilization. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Apr 1;302(7):F875-83.

Fukuda K, Davies SS, Nakajima T, Ong BH, Kupersmidt S, Fessel J, Amarnath V, Anderson ME, Boyden PA, Viswanathan PC, Roberts LJ 2nd, Balser JR. Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels. *Circ Res*. 2005 Dec 9;97(12):1262-9.

Gammelager H, Christiansen CF, Johansen MB, Tønnesen E, Jespersen B, Sørensen HT. Three-year risk of cardiovascular disease among intensive care patients with acute kidney injury: a population based cohort study. *Crit Care Lond Engl* 2014;18:492.

Gholampour F, Sadidi Z. Hepatorenal protection during renal ischemia by quercetin and remote ischemic preconditioning. *J Surg Res*. 2018 Nov;231:224-233.

Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:524-551.

Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, Tao Y, Dursun B, Voelkel NF, Edelstein CL, Faubel S. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jan;18(1):155-64.

Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM, Goldstein SL, Cerdá J, Chawla LS. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Oct;14(10):607-625.

Hou J, Tolbert E, Birkenbach M, Ghonem NS. Treprostinil alleviates hepatic mitochondrial injury during rat renal ischemia-reperfusion injury. *Biomed Pharmacother.* 2021 Nov;143:112172.

Icoglu Aksakal F, Koc K, Geyikoglu F, Karakaya S. Ameliorative effect of umbelliferone in remote organ injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. *J Food Biochem.* 2021 Feb;45(2):e13628.

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine.* 2018; 54(4): 287-93.

Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun;14(6):1549-58.

Kelly KJ, Molitoris BA. Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy. *Semin Nephrol.* 2000 Jan;20(1):4-19.

Kim SH, Kim H. Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review. *Nutrients.* 2018 Aug 21;10(9):1137.

Lima NKS, Farias WRA, Cirilo MAS, Oliveira AG, Farias JS, Aires RS, Muzi-Filho H, Paixão ADO, Vieira LD. Renal ischemia-reperfusion leads to hypertension and changes in proximal tubule Na⁺ transport and renin-angiotensin-aldosterone system: Role of NADPH oxidase. *Life Sci.* 2021 Feb 1;266:118879.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.

Miyazawa S, Watanabe H, Miyaji C, Hotta O, Abo T: Leukocyte accumulation and changes in extra-renal organs during renal ischemia reperfusion in mice. *J Lab Clin Med* 2002; 139:269–78

Mohammadi M, Najafi H, Mohamadi Yarijani Z, Vaezi G, Hojati V. Piperine pretreatment attenuates renal ischemia-reperfusion induced liver injury. *Heliyon.* 2019 Aug 13;5(8):e02180.

Orellana-Urzúa S, Rojas I, Líbano L, Rodrigo R. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des.* 2020;26(34):4246-4260.

Ornellas FM, Ornellas DS, Martini SV, Castiglione RC, Ventura GM, Rocco PR, Gutfilen B, de Souza SA, Takiya CM, Morales MM: Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Therapy Accelerates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Recovery by Modulating Inflammatory, Antioxidant and Apoptotic Related Molecules. *Cell Physiol Biochem* 2017; 41: 1736-1752.

Parikh CR, Puthumana J, Shlipak MG, et al. Relationship of kidney injury biomarkers with long-term cardiovascular outcomes after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:3699–707.

Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013 Nov;59(5):1094-106.

Prud'homme M, Coutrot M, Michel T, Boutin L, Genest M, Poirier F, Launay JM, Kane B, Kinugasa S, Prakoura N, Vandermeersch S, Cohen-Solal A, Delcayre C, Samuel JL, Mehta R, Gayat E, Mebazaa A, Chadjichristos CE, Legrand M. Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway. *JACC Basic Transl Sci.* 2019 Oct 28;4(6):717-732.

Radi ZA. Immunopathogenesis of Acute Kidney Injury. *Toxicol Pathol.* 2018 Dec;46(8):930-943.

Rojas-Morales P, León-Contreras JC, Aparicio-Trejo OE, Reyes-Ocampo JG, Medina-Campos ON, Jiménez-Osorio AS, González-Reyes S, Marquina-Castillo B, Hernández-Pando R, Barrera-Oviedo D, Sánchez-Lozada LG, Pedraza-Chaverri J, Tapia E. Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 2019 May 1;135:60-67.

Ronco C, McCullough P, Anker SD, Anand I, Aspromonte N, Bagshaw SM, Bellomo R, Berl T, Bobek I, Cruz DN, Daliento L, Davenport A, Haapio M, Hillege H, House AA, Katz N, Maisel A, Mankad S, Zanco P, Mebazaa A, Palazzuoli A, Ronco F, Shaw A, Sheinfeld G, Soni S, Vescovo G, Zamperetti N, Ponikowski P; Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) consensus group. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. *Eur Heart J.* 2010 Mar;31(6):703-11.

Lee SA, Cozzi M, Bush EL, Rabb H. Distant Organ Dysfunction in Acute Kidney Injury: A Review. *Am J Kidney Dis.* 2018 Dec;72(6):846-856.

Kim SH, Kim H. Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review. *Nutrients.* 2018 Aug 21;10(9):1137.

Serrya MS, Zaghloul MS. Mycophenolate mofetil attenuates concanavalin A-induced acute liver injury through modulation of TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathways. *Pharmacol Rep.* 2020 Aug;72(4):945-955.

Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K, Akbulut G, DilekON: Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 2002; 107:234 – 40.

Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol.* 2020 Oct;37:101759.

Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, Tao Y, Dursun B, Voelkel NF, Edelstein CL, Faubel S. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jan;18(1):155-64.

Tai H, Jiang XL, Lan ZM, Li Y, Kong L, Yao SC, Song N, Lv MJ, Wu J, Yang P, Xiao XS, Yang GL, Kuang JS, Jia LQ. Tanshinone IIA combined with CsA inhibit myocardial cell apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury in obese rats. *BMC Complement Med Ther.* 2021 Mar 22;21(1):100.

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3127-38.

Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS.Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Mar 20;18(9):1063-77.

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res.* 2011 Mar 4;108(5):555-65.

Xiang M, Lu Y, Xin L, Gao J, Shang C, Jiang Z, Lin H, Fang X, Qu Y, Wang Y, Shen Z, Zhao M, Cui X. Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxid Med Cell Longev.* 2021 May 18;2021:6614009.

Yang YF, Tan DM, Xie YT, Zhao W, Hou ZH, Zhong YD. Mycophenolate mofetil prevents lethal acute liver failure in mice induced by bacille Calmette-Guérin and lipopolysaccharide. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(4):611–8

Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology* 2012;116: 1139–48.

Yoshitomi T, Hirayama A, Nagasaki Y.The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles.Biomaterials. 2011 Nov;32(31):8021-8.

Youssef MI, Mahmoud AA, Abdelghany RH. A new combination of sitagliptin and furosemide protects against remote myocardial injury induced by renal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Pharmacol.* 2015 Jul 1;96(1):20-9.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo sugere que o sistema immune e a NADPH oxidase apresentam um papel proeminente na LRA induzida por IR através de mecanismos que estimulam a fibrose renal via EROs→TGFβ-1→MMP-2/MMP-9. O estudo também enfatiza o papel do estresse oxidativo, inclusive por modulação do sistema imune, como modulador-chave das alterações pró-fibróticas precoces induzidas pela isquemia-reperusão.

Além disso, esses resultados indicam uma forte participação do sistema imune e da NADPH oxidase na lesão cardíaca e hepática secundária a IR renal, trazendo a luz uma possível rota integradora para os mecanismos de lesão no próprio tecido-alvo como em órgãos distantes.

Dessa forma, essa tese apresenta dados pré-clínicos que apontam para mecanismos pró-fibróticos e pró-oxidativos que surgem precocemente na lesão renal induzida por IR, e podem ser caracterizados como um fator de risco para evolução da lesão para um quadro de doença renal crônica, bem como para a piora de prognóstico por indução de lesão em órgãos distantes.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: (81) 2126-8849
 www.ufpe.br

Recife, 05 de outubro de 2018

Ofício nº 86/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Leucio Duarte V. Filho**
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia
 Centro de Biociências
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 0053/2018

Certificamos que a proposta intitulada **"Contribuição do sistema imune e do estresse oxidativo na lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão"** registrada com o nº 0053/2018, sob a responsabilidade de **Prof. Leucio Duarte V. Filho** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/10/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/10/2018 a
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo
Nº de animais	64
Peso/idade	300-350g
Sexo	(32) Macho
Origem	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia UFPE

Atenciosamente,



Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345891