



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rachel Vicente da Silva

**Papel da irisina na renoproteção contra lesões derivadas de isquemia e
reperusão renal bilateral**

Rio de Janeiro

2024

Rachel Vicente da Silva

**Papel da irisina na renoproteção contra lesões derivadas de isquemia e reperfusão renal
bilateral**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Raquel Carvalho Castiglione

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Rachel Vicente da.
Papel da irisina na renoproteção contra lesões derivadas de isquemia e reperfusão renal bilateral / Rachel Vicente da Silva – 2024.
57f.

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Carvalho Castiglione

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Injúria Renal Aguda. 2. Insuficiência renal crônica - Teses. 3. Hormônios peptídicos. 4. Traumatismo por reperfusão. I. Castiglione, Raquel Carvalho. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.61

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rachel Vicente da Silva

**Papel da irisina na renoproteção contra lesões derivadas de isquemia e reperfusão renal
bilateral**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de outubro de 2024.

Orientadora: Prof.^a Dra. Raquel Carvalho Castiglione
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Daniel Alexandre Bottino
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Silvio Rodrigues Marques Neto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Jackson de Souza Menezes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

A minha mãe que sempre esteve ao meu lado em toda a minha trajetória de vida. Aos meus irmãos que sempre torceram pelo meu sucesso. Especialmente ao meu irmão Raphael que em vida sempre cuidou de mim. Obrigada a pelo carinho. Ao meu namorado, Jailson por sempre estar ao meu lado, escutando minhas histórias e incentivando minha trajetória durante todo o percurso da minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Deus por permitir a oportunidade.

Ao meu professor e colega, Felipe Tsuruta, que contribuiu para meu ingresso na pós-graduação e que sempre me apoia e auxilia com seus conhecimentos.

À minha professora e orientadora Raquel Carvalho Castiglione por todo tempo dedicado a estar comigo e com minha equipe na realização deste projeto e pela confiança durante todos os meus anos como aluna.

A todos os professores que contribuíram com o conhecimento para que chegasse onde cheguei, especialmente a Eliete e Daniel pelas aulas excelentes e reflexivas. Obrigada por toda dedicação e carinho com os alunos, vocês são fundamentais para a formação de profissionais cada vez melhores.

Aos meus colegas de equipe Leannon Thomy e Daniela Lopes. Obrigada pela participação e momentos de descontração.

A minha amiga e parceira de vida, Líníc, por todo apoio nos momentos bons e ruins. Muito obrigada pelo incentivo e troca de idéias.

A Nath pela troca de conhecimentos, mesmo que indiretamente.

A todos que cuidaram dos animais utilizados neste trabalho com todo o amor e carinho.

A equipe de limpeza e organização do BIOVASC.

Agradeço a oportunidade concedida pelo Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (PG-FISCLINEX) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte durante todo o período de mestrado

RESUMO

SILVA, Rachel Vicente da. **Papel da irisina na renoproteção contra lesões derivadas de isquemia e reperfusão renal bilateral**. 2024. 57f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A lesão renal por isquemia e reperfusão (I/R) gera danos celulares que podem comprometer a homeostase devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio, gerando processos inflamatórios locais, hiperplasia e hipertrofia renal. A irisina é uma miocina com diversas ações fisiológicas como a melhora do metabolismo energético, a promoção da saúde cardiovascular reduzindo a inflamação e consequentemente os riscos de hipertensão e aterosclerose e a redução da inflamação em obesos e diabéticos melhorando a resistência insulínica. A irisina é um mediador de saúde óssea e um agente protetor de doenças neurodegenerativas. Os animais foram anestesiados e receberam solução de salina ou 10nM de irisina pela veia jugular, 30 minutos após, foram posicionados em decúbito lateral para a indução da isquemia e reperfusão. Houve incisão da parede dorsal para acesso aos rins direito e esquerdo. O tecido adiposo dos rins de cada um dos animais foi dissecado para a melhor visualização do hilo renal. A isquemia foi realizada com a utilização de clamps não traumáticos de 30g (Roca Instrumental ®, São Paulo, Brasil) nos grupos específicos descritos anteriormente, os animais foram submetidos a 1 hora de isquemia renal bilateral. Vinte e quatro horas após a reperfusão, as alterações na função e na histopatologia renais foram avaliadas através do cálculo do fluxo urinário no período de 24 horas e a taxa de filtração glomerular, calculada através do clearance de creatinina. A taxa de creatinina e uréia foi dosada pelo Kit CREATININA PP (Gold Analisa®) e URÉIA (Gold Analisa®). Os marcadores biológicos IL-6, IL-1 β , NOX4 e HIF-1 α foram avaliados por Western Blotting e VEGF, PGC1- α , eNOS, TNF- α e HIF-1 α foram avaliados por PCR em tempo real. A função renal e a estrutura tubular avaliada na histopatologia identificaram preservação tecidual com a infusão de irisina no grupo I/R+IRI. Não foi detectada alteração na expressão proteica de IL-6, IL-1 β , NOX-4 e HIF- 1 α entre os grupos. Os níveis de mRNA de eNOS não foram dignificamente alterados, mas foi observado um aumento de TNF- α em animais tratados e uma redução no acúmulo de HIF-1 α , PGC1- α e VEGF nos grupos I/R e I/R+IRI em relação ao grupo SHAM. A irisina 10 nM foi capaz de melhorar a função renal e o escore de lesão tubular renal em animais submetidos a isquemia e reperfusão bilateral independente de HIF-1 α , VEGF e PGC1- α , vias essenciais na resposta ao dano tecidual. Dessa forma, a irisina foi capaz de através de mecanismos compensatório mediar a resposta a apoptose e inflamação.

Palavras chaves: isquemia e reperfusão; lesão renal aguda; doença renal crônica; renoproteção; irisina

ABSTRACT

SILVA, Rachel Vicente da. **Role of irisin in renoprotection against lesions derived from bilateral renal ischemia and reperfusion**. 2024. 57f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Renal injury due to ischemia and reperfusion (I/R) generates cellular damage that can compromise homeostasis due to the increase in reactive oxygen species, generating local inflammatory processes, hyperplasia and renal hypertrophy. Irisin is a peptide hormone with several physiological actions such as improving energy metabolism, promoting cardiovascular health by reducing inflammation and consequently the risks of hypertension and atherosclerosis, and reducing inflammation in obese and diabetic individuals by improving insulin resistance. Irisin is a mediator of bone health and a protective agent against neurodegenerative diseases. The aim of this study was to evaluate the role of irisin in renoprotection against lesions derived from bilateral renal ischemia and reperfusion. Male Wistar rats were divided into 4 experimental groups (n=6): sham-operated group (SHAM), sham-operated + irisin group (SHAM+IRI), ischemia and reperfusion group (I/R) and ischemia and reperfusion + irisin group (I/R+IRI). The animals were anesthetized and received saline solution or 10nM irisin via the jugular vein. 30 minutes later, they were positioned in lateral decubitus for induction of ischemia and reperfusion. An incision was made in the dorsal wall to access the right and left kidneys. The adipose tissue of the kidneys of each animal was dissected for better visualization of the renal hilum. Ischemia was performed using 30g non-traumatic clamps (Roca Instrumental ®, São Paulo, Brazil) in the specific groups described above; the animals were subjected to 1 hour of bilateral renal ischemia. Twenty-four hours after reperfusion, changes in renal function and histopathology were assessed by calculating the urinary flow rate over a 24-hour period and the glomerular filtration rate, calculated through creatinine clearance. Creatinine and urea levels were measured using the CREATININE PP Kit (Gold Analisa®) and UREA (Gold Analisa®). The biological markers IL-6, IL-1 β , NOX4 and HIF-1 α were assessed by Western Blotting and VEGF, PGC1- α , eNOS, TNF- α and HIF-1 α were assessed by real-time PCR. Renal function and tubular structure assessed by histopathology identified tissue preservation with irisin infusion in the I/R+IRI group. No change in the protein expression of IL-6, IL-1 β , NOX-4 and HIF-1 α was detected between the groups. eNOS mRNA levels were not significantly altered, but an increase in TNF- α was observed in treated animals and a reduction in the accumulation of HIF-1 α , PGC1- α and VEGF in the I/R and I/R+IRI groups compared to the SHAM group. Irisin 10 nM was able to improve renal function and the renal tubular injury score in animals subjected to bilateral ischemia and reperfusion, regardless of HIF-1 α , VEGF and PGC1- α , essential pathways in the response to tissue damage. Thus, irisin was able to mediate the response to apoptosis and inflammation through compensatory mechanisms.

Keywords: ischemia and reperfusion; acute kidney injury; chronic kidney disease; renoprotection; irisin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo da estrutura renal.....	16
Figura 2 - Esquema representativo dos néfrons.....	17
Figura 3 - Micrografia eletrônica da parede capilar glomerular de um rato.....	18
Figura 4 - Esquema representativo das microvilosidades presentes nos túbulos proximais.....	19
Figura 5 - Microscopia da necrose tubular aguda	23
Figura 6 - Parâmetros metabólicos após 24 horas em gaiola metabólica.....	37
Figura 7 - Função renal após 24 horas em gaiola metabólica.....	38
Figura 8 - Expressão proteica de moléculas inflamatórias.....	39
Figura 9 - Acúmulo de mRNA	40
Figura 10 - Alterações morfológicas renais em objetivas de 40x.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Função renal – componentes plasmáticos filtrados, reabsorvidos e excretados....	20
Tabela 2 – Classificação clínica da IRA.....	21
Tabela 3 - Estágios da Insuficiência Renal Aguda.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Hormônio Antidiurético
AQ2	Canais de Aquaporina 2
ATP	Adenosina Trifosfato
AT1R	Receptor do tipo 1 da Angiotensina II
AVC	Acidente vascular cerebral
Cl-	Íons de cloreto
DRA	Doença Renal Aguda
DRC	Doença Renal Crônica
eNOS	Espécies Reativas de Oxigênio
ECA	Enzimas Conversoras de Angiotensina
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FEC	Fluido Extracelular
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
FNDC5	Fibronectina Tipo III do Domínio 5
H ₂ O	Água
HCO ₃ ⁻	Íons de bicabornato
HIF1- α	Fator Induzível por Hipóxia Alfa
I/R	Isquemia e reperfusão
I/R+I	Isquemia e Reperfusão + 10nM de Irisina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRA-IC	Insuficiência Renal Aguda Induzida por Contraste
IRC	Insuficiência Renal Crônica
K ⁺	Íon de Potássio
LRA	Lesões Renais Agudas
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MB	Membrana basal
MBG	Membrana Basal Glomerular
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

Na ⁺	Íon de Sódio
NPHS1	Síndrome Nefrótica Congênita do Tipo Finlandês
NTA	Necrose Tubular Aguda
PAI-1	Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1
PA	Pressão Arterial
pVHL	Proteína de Von Hippel-Lindau
PGC1- α	Coativador Gama 1-Alfa
PHD	Prolil Hidroxilase
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SHAM	Grupo Falso Operado
SHAM+I	Grupo Falso Operado + Aplicação de Irisina 10nM
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TSR	Terapia de Substituição Renal
UCP1	Proteína Desacopladora Mitocondrial 1
UCP2	Proteína Desacopladora Mitocondrial 2
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR-1	Receptor 1 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR-2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1 Sistema renal	16
1.2 Lesão renal aguda (LRA)	20
1.3 Fisiopatologia da LRA induzida por isquemia e reperfusão renal	23
1.4 Moléculas envolvidas na fisiopatologia da LRA	24
1.4.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	24
1.4.2 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS)	25
1.4.3 Fator Induzível por Hipóxia Alfa (HIF1- α)	25
1.4.4 Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β)	26
1.4.5 Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)	26
1.4.6 Interleucinas	27
1.5 Mecanismo de detecção da LRA	28
1.5.1 Creatinina	28
1.5.2 Uréia	28
1.6 Terapia das LRAs em modelos experimentais	29
1.7 Irisina	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Modelo animal	32
3.2 Grupos experimentais	32
3.3 Indução de I/R renal bilateral	33
3.4 Eutanásia e coleta do material biológico	33
3.5 Parâmetros de função renal	34
3.6 Extração e quantificação de proteína do tecido renal	34
3.7 Western Blotting	35
3.8 PCR em tempo real	35
3.9 Histopatologia	36

3.10 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Parâmetros metabólicos	37
4.2 Função renal	38
4.3 Expressão proteica renal	39
4.4 Alterações morfológicas	40
4.5 Acúmulo de mRNA	41
5 DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos que compõem o sistema excretor em conjunto com os ureteres, bexiga e uretra e desempenham funções primordiais para a manutenção da saúde do organismo. Os glomérulos renais, são estruturas responsáveis pela filtração do plasma sanguíneo e formação do ultrafiltrado glomerular que percorre o túbulo proximal, porção descendente e ascendente da alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor. Durante este processo, há mecanismos de reabsorção e secreção que são essenciais para a regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, equilíbrio ácido-básico, conservação de nutrientes e excreção de resíduos metabólicos (AIRES, 2008; ALVES, 2011, HALL, J. E., & GUYTON, 2017).

O fluxo sanguíneo renal (FSR) corresponde a cerca de 20% do débito cardíaco, o que equivale a cerca de 1,3 litro por minuto. Disfunções no sistema cardiovascular podem gerar alterações do FSR aumentando a pressão sanguínea nos vasos, garantindo a dependência da maior ativação do SRAA (BREGMAN, 1997; ALVES, 2011, DALAL et al, 2023). Neste sentido, podemos notar que o sistema renal é importante no controle a longo prazo da pressão arterial, através da regulação do volume do fluido extracelular (FEC), da tonicidade do FEC e através da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (AMES 2019; HALL, J. E., & GUYTON, 2017). Por esta razão, a manutenção da estabilidade hemodinâmica é garantida de forma conjunta com o sistema cardiovascular e, uma vez que ocorram alterações funcionais em um desses órgãos o outro também pode ser afetado, culminando nas denominadas síndromes cardiorrenais (REF).

Além disso, o FSR é um dos importantes marcadores para quantificação de lesões renais, (DALAL et al, 2023), principalmente quando associado a diagnósticos de insuficiência renal (IR). Os casos de mortalidade relacionado a insuficiência renal aguda (IRA) excedem os de insuficiências cardíacas, câncer de mama e diabetes nos últimos 53 anos e pode ser vista em adultos e crianças (KELLUM et al, 2021).

As IRAs desencadeiam diversas consequências renais como por exemplo a doença renal crônica (DRC) pós IRA. Elas ocorrem em decorrência da obstrução renal a partir da perda parcial dos néfrons e fibrose intersticial, acarretando na perda da função excretora dos rins, com acúmulo de matabólitos no sangue e surgimento da DRC subclínica. A DRC subclínica também está relacionada a outras doenças como a hipertensão arterial, doença cardiovascular e acidente vascular cerebral (AVC) (ALVES, 2011; HSU et al, 2016).

Entre as principais causas da IRA também estão a sepse, desidratação, insuficiência cardíaca grave e glomerulonefrites agudas (ALVES, 2011). O controle da progressão das IRA pode ser feito através da compreensão do funcionamento dos rins.

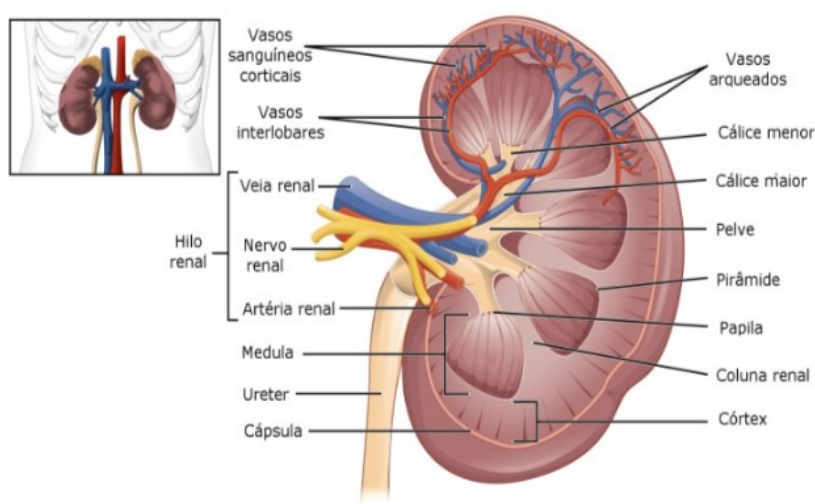
1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Sistema renal

Os rins são órgãos retroperitoneais, localizados na região abdominal e cobertos por tecido areolar frouxo e gordura. O rim direito ocupa uma posição inferior quando comparado ao esquerdo devido a posição do lóbulo direito do fígado. Com isto, o rim esquerdo se torna mais comprido que o rim direito. Ambos medem cerca de 5 a 7,5cm de largura e 12 cm de altura e possuem peso variável de 125-170g em um homem adulto e 115-155g em uma mulher adulta. A coloração marrom-escura assemelha a estrutura ao formato de um grão de feijão (DI DIO, 1999; GARDNER, 1998; GRAY, 1988).

Cada rim é composto por uma cápsula fibrosa e resistente de tecido conjuntivo denominada cápsula renal, esta estrutura é responsável pela proteção do meio interno de cada um dos dois órgãos. O hilo renal está localizado na porção medial dos rins, e é responsável pela irrigação sanguínea e nutrição do órgão. O hilo renal é o ponto de encontro de artérias e veias, vasos linfáticos, suprimentos nervosos e ureter, estrutura responsável por encaminhar a urina para a bexiga e posterior eliminação do corpo (Figura 1) (HALL, J. E., & GUYTON, 2017).

Figura 1 – Esquema representativo da estrutura renal

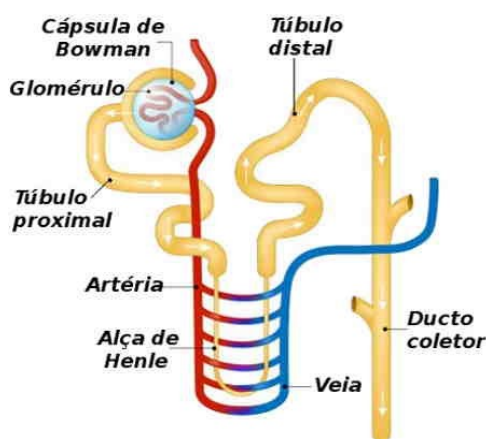


Fonte: Adaptado de <http://www.infoescola.com>

Cada rim possui 5 ramos de artéria renal que partem do hilo renal sendo a artéria direita mais alongada que a artéria esquerda. Os segmentos arteriais ao entrarem em contato com o seio renal, se ramificam no parênquima renal originando o córtex e a medula que são formadas por 8 a 18 pirâmides renais e 20 a 40 alças capilares (AIRES, 2015).

O parênquima dá origem a unidade de formação da urina denominada néfron. Cada néfron é composto pelo corpúsculo renal e túbulo proximal, alça de Henle e túbulo distal (Figura 2). Apesar de ser um elemento importante envolvido na formação da urina, o ducto coletor não é considerado parte do néfron (AIRES, 2008). As artérias interlobulares que irrigam o córtex renal e as pirâmides renais formam as arteríolas aferentes que dão origem a um enovelado capilar denominado glomérulo renal (GARDNER, 1998; DI DIO, 1999; DUQUES, 2002).

Figura 2 – Esquema representativo dos néfrons



Fonte: Adaptado de: <http://planetabiologia.com>.

As células juxtaglomerulares secretam uma enzima chamada renina. A renina é responsável pela clivagem do angiotensinogênio, uma glicoproteína produzida em diversos tecidos em um decapeptídeo denominado como angiotensina I. A angiotensina I não possui efeitos biológicos relevantes e, o aumento de sua concentração aumenta a atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA), uma enzima também secretada em diversos tecidos e responsável na clivagem da angiotensina I ao octapeptídeo angiotensina II. A angiotensina II é responsável pelo aumento da secreção de aldosterona no córtex adrenal, que aumenta a atividade da bomba de sódio e potássio e a permeabilidade aos canais de sódio.

Consequentemente ocorrerá aumento da reabsorção de Na^+ e água, além do seu potente efeito vasoconstritor, que irá acarretar no aumento da pressão sanguínea (BREGMAN, 1997).

A filtração do plasma ocorre nos glomérulos renais. Cada glomérulo possui uma pressão hidrostática alta de 60 mmHg e é responsável pela filtração de 90 a 120 ml de plasma por

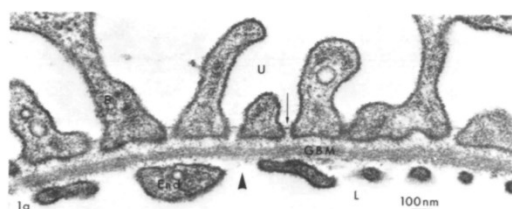
minuto. Para que o processo de filtração ocorra, o filtrado glomerular necessita atravessar a barreira de filtração glomerular em direção ao espaço urinário (GRAY, 1988; GARDNER, 1998 DI DIO, 1999; DUQUES, 2002; DALAL et al, 2023). A barreira de filtração glomerular é composta por três camadas: endotélio capilar, membrana basal e parede interna da cápsula de Bowman (Figura 3) (AIRES, 2008).

O endotélio capilar descontínuo pertencente aos capilares é formado por proteoglicanos e proteínas que formam o glicocálix. O glicocálix contribui para a função de impedir que moléculas grandes ou com cargas elétricas negativas como a albumina atravessem a barreira endotelial. A seleção endotelial de moléculas é garantida por receptores específicos e eletronegatividade das fenestras funcionais que possuem diâmetro de 60-80nm e poros que limitam a passagem a 50 Å de diâmetro (VENKATACHALAM & RENNKE, 1978; AKILESH, ET AL 2008).

As proteínas são importantes componentes de manutenção do plasma sanguíneo no endotélio capilar e promove a manutenção da pressão oncótica capilar. Através de receptores multi ligantes, as proteínas menores que 65Kda são reabsorvidas pela membrana basal da luz tubular para a corrente sanguínea. Proteínas maiores que 65 Kda possuem pouca capacidade de filtração e são barradas pela barreira de filtração sanguínea e fagocitadas pelas células mesangiais glomerulares (VERROUST ET AL, 2002). Em situações patológicas, quando a carga das proteínas na luz tubular excede as capacidades fisiológicas ocorre proteinúria. A proteinúria pode causar doenças renais como a LRA e doenças cardiovasculares (KIRSZTAJN, 2010).

A membrana basal glomerular (MBG) é repleta de macromoléculas como fibra colágeno do tipo IV, lamininas e proteoglicanos (GROFFEN ET AL, 1999).

Figura 3 – Micrografia eletrônica da parede capilar glomerular de um rato



Legenda: (L) lúmen, (END) endotélio, (E) células epiteliais, (LRI) lâmina rara interna, (LD) lâmina densa, (LRE) lâmina rara externa, (FSD) diafragma da fenda de filtração.

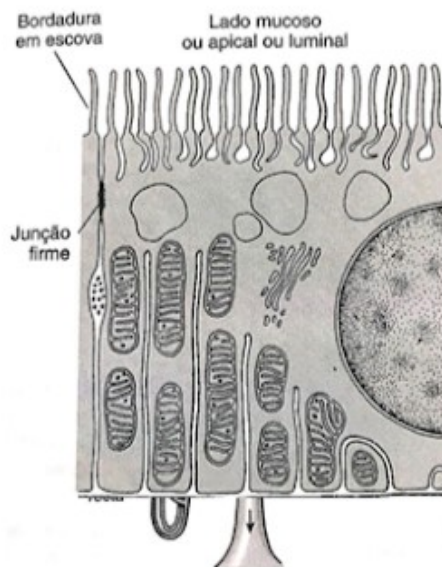
Fonte: Adaptado de VENKATACHALAM & RENNE, 1978.

A cápsula de Bowman possui uma dupla parede. O revestimento interno da cápsula de Bowman que possui contato direto com o espaço de Bowman é formado por células chamadas de podócitos. Os podócitos são responsáveis pela permeabilidade seletiva das moléculas menores que atravessarão a fenda diafragmática de filtração da MBG. O meio externo da cápsula possui uma película protetora de epitélio pavimentoso simples (AIRES, 2008, AKILESH, ET AL 2008).

Após a passagem pela barreira de filtração glomerular, o filtrado glomerular percorre o túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e ducto coletor sofrendo processos de reabsorção e secreção tubular de solutos. A taxa de filtração glomerular (TFG) depende da pressão de ultrafiltração (dada pela diferença entre as pressões hidrostáticas e as pressões oncóticas transcapilares) e do coeficiente de ultrafiltração (DALAL et al, 2023). Ela é um excelente parâmetro de checagem das capacidades funcionais glomerulares da barreira de filtração (ZACCHELLO et al, 1982).

As células do túbulo proximal possuem muitas mitocôndrias e borda em escova (Figura 4) e são responsáveis pela reabsorção isotônica de 2/3 do filtrado glomerular (RANDALL et al, 2000; AIRES, 2008).

Figura 4 – Esquema representativo das microvilosidades presentes nos túbulos proximais



Fonte: Adaptado de: RANDALL et al, 2000.

A alça de Henle possui três porções, uma porção descendente delgada, uma porção ascendente delgada e uma porção ascendente espessa. A porção descendente é permeável a água

e é responsável pela secreção de solutos. A porção fina ascendente é impermeável a água e é responsável pela reabsorção de cloreto de sódio e secreção de uréia. A porção espessa da alça de Henle também é impermeável a água e responsável pela reabsorção de sódio, cloreto, potássio, cálcio e magnésio (RANDALL et al, 2000; AIRES, 2015).

Os túbulos distais são responsáveis pela secreção de hidrogênio e amônia e reabsorção de Na^+ pela ação da aldosterona. Estas estruturas reabsorvem o bicabornato e cálcio, podem reabsorver ou secretar íons de potássio. Os túbulos distais dão origem a última porção do néfron chamada de ducto coletor é responsável pela secreção de hidrogênio e potássio através das células α e bicabornato através de células β sob dieta alcalina. Na presença do hormônio antidiurético (ADH), o túbulo distal e o ducto coletor se tornam altamente permeáveis a água através da inserção de canais de aquaporina 2 (AQP2) na membrana luminal, garantindo a osmolaridade plasmática e o equilíbrio hidroeletrólítico do meio interno tubular (AIRES, 2015; RANDALL et al, 2000).

Entre os componentes plasmáticos filtrados, reabsorvidos e excretados estão a água, íons de cloreto, sódio, bicabornato, glicose, uréia, potássio, ácido úrico e creatinina (Tabela 1).

Tabela 1 - Função renal – componentes plasmáticos filtrados, reabsorvidos e excretados

Componente Plasmático	Filtração (g/dia)	Excreção (g/dia)	Reabsorção (g)	(%)
H ₂ O	1.800.000	1.800	178.200	99
Cl ⁻	630	5,3	625	99,2
Na ⁺	540	3,3	537	99,4
Bicabornato (HCO ₃ ⁻)	300	0,3	300	~100
Glicose	140	0	140	100
Uréia	56	32	24	45
K ⁺	28	4	24	85,7
Ácido úrico	8,5	0,8	7,7	90,6
Creatinina	1,4	1,6*	0	0

*Entre 7% e 20% de sua concentração urinária que a creatinina é secretada de forma ativa.

Fonte: Adaptado de SODRÉ et al, 2007.

1.2 Lesão renal aguda (LRA)

Alterações na hemodinâmica renal podem acarretar em lesões renais agudas (LRA) nos indivíduos. As LRA são definidas como a redução das capacidades dos rins de filtrar o plasma

ou diluir a urina, sendo responsável pela redução da excreção urinária (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007). Esta doença é considerada a forma de doença intrínseca mais comum em adultos (MOLITORIS, 1998).

Além do declínio na capacidade de excretar ácidos fixos, afetando a homeostase ácido-base, as LRAs podem comprometer a regulação da pressão sanguínea mediante a ativação crônica ou desregulação do SRAA (AMES, 2019). A redução da ação do SRAA ocasiona pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica (AMES, 2019). A avaliação da inflamação é mediada pela presença de espécies reativas de oxigênio (EROS) que serão responsáveis por determinar a capacidade mitocondrial de sintetização de energia (GROFFEN ET AL, 1999).

As manifestações clínicas das LRA podem ocorrer em consequência de distúrbios digestivos, cardiorrespiratórios, neurológicos, hematológicos, imunológicos, nutricionais ou cutâneos. A LRA apresenta características diferentes e pode resultar em Insuficiência Renal Aguda (IRA) se não tratada. A IRA apresenta 3 classificações, de acordo com o quadro clínico do paciente (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação clínica da IRA

Classificação	Diagnóstico clínico	Patologia associada
IRA pré-renal	Redução do fluxo plasmático Redução da filtração glomerular	Hipotensão arterial Hipovolemia (hemorragia, diarreia e queimaduras)
IRA renal (intrínseca ou estrutural)	NTA séptica NTA nefrotóxica IRA através de glomerulopatias IRA por nefrite intersticial aguda IRA Vascular Embolização por colesterol IRA hepatorenal	Necrose Tubular Aguda (NTA) isquêmica e/ou tóxica
IRA pós-renal (obstrutiva)	Cálculos Traumas Coágulos Tumores Fibrose retroperitoneal	Obstrução intra-renal ou extra-renal

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007.

Segundo Kdigo (2012) a LRA doença pode ser dividida em 3 estágios de acordo com a gravidade do paciente (Tabela 3), e pode variar de leve a grave e persistente (KELLUM et al, 2021). Com isto, a doença é motivo de preocupação clínica (ABDELHAY, 2002).

Tabela 3 – Estágios da Insuficiência Renal Aguda

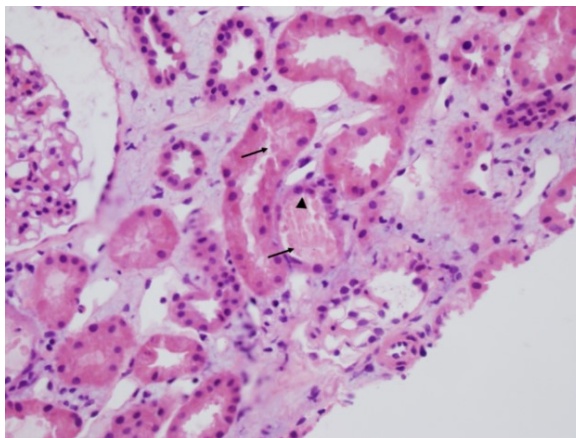
Estágio	Creatinina sérica	Débito urinário
1	Aumento da creatinina sérica basal em 1.5-1.9 vezes. ou $\geq 0.3\text{mg/dl}$ ($\geq 26.5\text{ }\mu\text{mol/l}$)	Débito urinário $<0.5\text{ml/kg/h}$ (6-12h)
2	Aumento da creatinina sérica basal em 2.0-2.9 vezes.	Débito urinário $<0.5\text{ ml/kg/h}$ por $>12\text{h}$
3	Aumento da creatinina sérica basal de 3.0 vezes ou Aumento da creatinina sérica $\geq 4.0\text{ mg/dl}$ ($\geq 353.6\mu\text{mol/l}$) ou Início de Terapia de Substituição Renal (TSR) ou Em pacientes >18 anos com queda na TFG $<35\text{ml/min/1,73m}^2$	Débito urinário $<0.3\text{ml/kg}$ por 24hr Ou anúria $\geq 24\text{h}$

Fonte: Adaptado de KDIGO, 2012.

A LRA é uma síndrome comumente vista em pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e pode progredir rapidamente para doença renal crônica se não diagnosticada de forma prévia (CHERTOW, 2005). As LRAs podem ser de origem nefrotóxica ou isquêmica (PICKKERS et al., 2021). A origem nefrotóxica tem associação com a hipertensão arterial, diabetes mellitus e glomerulonefrites (CHERCHIGLIA et al., 2010). As de origens isquêmicas estão associadas a oclusão de vasos, normalmente são mais frequentes em procedimentos cirúrgicos (RIELLA, 2018).

A LRA pode culminar no acometimento das estruturas dos rins promovendo lesões nos segmentos dos néfrons. Estas lesões podem gerar morte celular programada e necrose tubular aguda (Figura 5). A hipercalcemia devido a diminuição da excreção de potássio também é observada (KELLUM et al, 2021).

Figura 5 - Microscopia da necrose tubular aguda



Fonte: Adaptado de <https://aspneph.org>

A longo prazo a LRA está associada a um aumento de custo em saúde, sendo no Brasil o valor estimado a 1,4 bilhões de reais ao ano devido a altos índices de internação e taxas de mortalidade. No país, o número de indivíduos transplantados e portadores da doença são de 120.000 (CHERTOW GM, 2005, BASTOS et al, 2010).

1.3 Fisiopatologia da LRA induzida por isquemia e reperfusão renal

Durante a fase de isquemia, ocorre um desequilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio tecidual, as mitocôndrias reduzem sua capacidade de transportar elétrons e de sintetizar ATP. A partir daí ocorre a mudança no predomínio do metabolismo aeróbio para o anaeróbio e há aumento da glicólise, formação de ácido láctico e diminuição do pH citosólico (KOSIERADZKI & ROWIŃSKI 2008). Estes processos levam a desestabilização da membrana do lisossomo e saída do conteúdo lisossomal (SUGIYAMA et al 1988), inibição da atividade da Na^+/K^+ ATPase (KATO & KAKO 1987), levando ao acúmulo intracelular de íons Na^+ e água (KOSIERADZKI & ROWIŃSKI 2008).

Após a isquemia, durante a fase de reperfusão há elevação súbita dos níveis de oxigênio e do pH extracelular. A volta à normóxia induz um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , levando a abertura do poro de transição mitocondrial (GUSTAFSSON & GOTTLIEB 2008, PENG & JOU 2010, GOTTLIEB 2011, KALOGERIS et al 2012) e ocasionando o

extravasamento de proteínas mitocondriais além da redução da capacidade antioxidante (LI & JACKSON 2002, BAYRAK et al 2008), acarretando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KALOGERIS et al 2012), promovendo lesões nas membranas e no citoesqueleto, resultando na morte celular.

Em adição aos efeitos citotóxicos diretos da hipóxia, a IR induz uma reação inflamatória como recrutamento de células ou pela indução de secreção local de citocinas para o parênquima renal (MISSERI et al 2005, KLUGER et al 2014).

Várias alternativas têm sido utilizadas para a proteção do rim após a IR. Procedimentos como o pré-condicionamento ou pós-condicionamento isquêmico, tem mostrado que estas manobras são eficientes para a atenuação da lesão induzida pela IR através da redução do estresse oxidativo e consequente diminuição do grau de morte celular. Porém, pouco se conhece sobre os mecanismos que levam a esta atenuação (BERNHARDT et al 2006, HUANG et al 2006, XING et al 2008, CHEN et al 2009, WU et al 2009, SALAHUDEEN et al 2011, MAHFOUDH-BOUSSAID et al 2012, SHOKEIR et al 2014).

1.4 Moléculas envolvidas na fisiopatologia da LRA

1.4.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O VEGF é uma glicoproteína que possui 32 a 45 kDa e possui importante envolvimento na resposta imunológica mediante ao processo inflamatório. Um dos papéis importantes desta molécula presente em podócitos de células pré-tubulares, pré-glomerulares e glomerulares é o aumento da permeabilidade vascular e regulação da expressão gênica endotelial, como a adesão e expressão de moléculas, mediados pelos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2. Além da expressão em células endoteliais, o VEGF é expresso também em células imunológicas como macrófagos e células T ativas (LEUNG ET AL, 1989; FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997; MARUMO, 1999).

1.4.2 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS)

A expressão de eNOS é um importante achado na disfunção renal pois seu aumento ativo um amplo espectro de sequelas celulares. As consequências referentes ao aumento das concentrações de NOS desencadeiam ações anti apoptóticas ou apoptóticas celulares, peroxidação lipídica e danos aos DNA do indivíduo (DAVIS ET AL, 2001).

O eNOS possui importante influência na mediação da ativação de enzimas como guanilato ciclase solúvel (enzima contendo fragmento heme) e componentes envolvidos na proteção do estresse oxidativo (KIM ET AL, 1997).

1.4.3 Fator Induzível por Hipóxia Alfa (HIF1- α)

A indução de isquemia/reperfusão gera na limitação da oferta de oxigênio, e vulnerabilidade renal e injúria isquêmica aguda (LI, 2020). A hipóxia é um importante mecanismo de detecção da patogênese renal. Em condições normais, o HIF é dependente da ação das proteínas da prolil hidroxilase (PHD) para ser hidroxilado em um ambiente com oxigênio, permitindo sua ubiquitinação pela proteína de von Hippel-Lindau (pVHL) através da ubiquitina ligase E3 (FANDREY ET AL, 2006).

O HIF1- α é um mecanimso protetor com resposta ao reparo do tecido renal. O HIF possui um heterodímero α e um β e desempenha um importante fator de transcrição de fatores de hipóxia 1, 2 e 3 permitindo a adaptação do metabolismo celular e ativação de mais de 100 genes de adaptação a falta de oxigênio (MCGETTRICK, 2020; LIU ET AL, 2022).

A inibição deste fator promove a infiltração e ploriferação de células renais tubulares e apoptose das células renais por meio da atividade de NF-kB. Logo, há o aumento das concentrações de IL1- β , TNF- α , MCP-1 e VCAM-1 (CONDE et al, 2017).

1.4.4 Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β)

O TGF- β é presente em mamíferos de três isoformas: $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. A molécula é ativada em formato de proteína inativa por ligação não covalente do peptídeo associado à latência (LAP) (RIFKIN, 2005). As integrinas, ativadas por clivagem através de proteases (JENKINS, 2008), facilitam a ativação mecânica do TGF- β após a ligação com domínios RGD do LAP (MUNGER ET AL, 1999).

A ativação de TGF- β influencia no crescimento de fibroblastos e expressão de actina de músculo liso α . Com isto, há a transformação dos fibroblastos para miofibroblasto, síntese de MEC e consequentemente proliferação de fibroblastos favorecendo o processo fibrótico. Além disto, o TGF- β é o principal fato associado a sensibilização celular mediante à atrofia ou degeneração tubular por apoptose (MIYAJIMA ET AL, 2000).

O TGF- β tem um papel duplo na isquemia e reperfusão renal: ele inicialmente ajuda a modular a inflamação e reparar o tecido lesado, mas, em excesso ou de forma persistente, pode induzir fibrose renal e apoptose, levando à perda progressiva da função renal. O controle da ativação do TGF- β é fundamental para minimizar a lesão renal de longo prazo após esses eventos. Devido ao seu papel central na fibrose e inflamação, o TGF- β é um alvo terapêutico em potencial para prevenir a progressão do dano renal após isquemia e reperfusão. Inibidores do TGF- β ou moduladores de sua via de sinalização estão sendo estudados como estratégias para reduzir a fibrose e preservar a função renal após esses episódios. A progressão da fibrose em túbulos renais pode estar associada a doenças como as glomerulonefrites, diabetes mellitus ou hipertensão arterial por presença de LRA progressiva, resultando em perda de função renal e subsequentes estágios terminais da doença renal (MARIANI ET AL, 2018).

1.4.5 Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

O TNF- α é um fator de resposta imunológica mediante a processos fibróticos e inflamatórios. O fator de necrose tumoral é produzido por diversas células do organismo como células mesangiais, tubulares e macrófagos (AL-LAMKI & MAYADAS, 2015; MENG et al, 2016).

As principais vias de sinalização são as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), fator nuclear kB (NF-kB) e caspases. A resposta potencializada do TNF- α é mediada pela resposta secundária de MAPK e kB que aumentam de forma exponencial a quantidade de diversas citocinas pró-inflamatórias (SABIO & DAVIS, 2014).

Em DRC e modelos experimentais de doença renal como modelos de nefropatia induzida por cisplatina, obstrução ureteral unilateral (UUO) e isquemia-reperfusão, os altos níveis séricos de TNF- α representam maior gravidade de LRA devido ao grau de inflamação (AL-LAMKI, 2015; GUPTA et al, 2012). Com isto, a inibição do Fator de Necrose Tumoral de forma farmacológica ou genética desempenha papel crítico na patogênese da doença (TAGUCHI et al, 2021).

1.4.6 Interleucinas

A interação de citocinas com receptores de membrana, regulam a transcrição de genes e determinam a alteração celular e disfunções de tecido (COUSER, 1998). Com isto, a ativação de citocinas inflamatórias como as interleucinas, desempenham papel crucial na fisiopatologia da doença renal. (CHEUNG et al, 2010; KNIGHT et al, 2004; LIU Y, 2006)

As principais interleucinas relacionadas nas lesões renais por inflamação são as interleucinas 1 e 6 (STREETZ et al, 2001). Estas interleucinas possuem ação pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica e podem influenciar a função renal aumentando as lipoproteínas circulantes em indivíduos obesos como por exemplo o plasminogênio-1 (PAI-1), resistina e quimiocina MCP-1. Além disto, níveis circulantes de citocinas são também responsáveis pela resistência insulínica (HUNLEY et al, 2010).

Nos rins, as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) são responsáveis pela ativação do sistema imune precoce de adultos acometidos por DRC (OBERG et al, 2004) e desempenham papel crucial nos achados relacionados a mortalidade em pacientes dos estágios 3 e 4 (KNIGHT et al, 2004).

1.5 Mecanismo de detecção da LRA

1.5.1 Creatinina

Marcadores do débito urinário como a creatinina sérica são estratégias para quantificação da função renal pela TFG (KELLUM et al, 2021). A creatinina é um produto resultante do metabolismo da creatina presente principalmente na musculatura esquelética humana, filtrada de forma livre nos glomérulos renais (SODRÉ et al, 2007; CIRILLO, 2010).

A excreção creatinina sérica é feita através da via renal por filtração glomerular e secreção tubular, isto justifica o aumento da creatinina sérica independente da TFG após o uso de drogas como cimetidina e primetoprima. Casos semelhantes podem também ser vistos após a administração de medicamentos como fenebrato e o uso de hormônios do crescimento (ANSQUER, J. C. et al 2008). As dosagens a partir da amostra de sangue e urina de 24 horas são um importante dado na avaliação de doenças renais agudas (SODRÉ et al, 2007; VIDIGAL, 2009).

A TFG é calculada baseada no *clearance* renal, que determina a capacidade de depuração do plasma de determinada substância baseado em um período de tempo. As TFGs podem ser calculadas por fórmulas matemáticas desenvolvidas ao decorrer dos anos (COUTINHO, 2023).

1.5.2 Uréia

A amônia resultante do processo de fermentação do alimento não sintetizada por microrganismos, é absorvida pelo intestino e encaminhada para o fígado através da corrente sanguínea para a realização do ciclo da ureia (CHURCH, 1988; COELHO DA SILVA e LEÃO, 1979).

A uréia é proveniente da catabolização de proteínas endógenas e digeridas pelo organismo. O aumento da concentração sérica da uréia é determinado azotemia. Esta condição pode ser de origem pré-renal (devido ao aumento da ingestão de proteínas, exercícios muito longos, hemorragias, hipovolemias ou choque), renal (75% dos glomérulos acometidos por

lesão, insuficiência ou doença renal) ou pós-renal (obstrução urinária). Os principais sintomas clínicos associados a azotemia são vômitos, diarreias, anorexia e/ou perda de peso, uremia, letargia e poliúria (THRALL et al., 2015).

1.6 Terapia das LRAs em modelos experimentais

Modelos experimentais em pesquisas científicas permitem o estudo de diversas patologias a partir da associação entre fenômenos físicos, químicos e biológicos. A importância desses modelos vem sendo explícita durante anos, principalmente para a engenharia genética, permitindo o estudo do genoma em forma de mosaico (ABDELHAY, 2002). São utilizados em pesquisa científica modelos de roedores isogênicos, que permitem o acasalamento entre 20 gerações consecutivas. Estes modelos garantem a população homozigótica saudável e de maior longevidade quando comparado as demais (SANTOS, 2002).

Estudos já realizados evidenciam que parte dos danos nas estruturas renais são tubulares devido a oclusão, principalmente clipada. O grau da lesão será dependente da pressão de oclusão da artéria renal (MORAN et al, 1992). Logo, Modelos experimentais isquêmicos permitem o estudo de diversas patologias renais, principalmente em modelos hipertensos renovasculares (GOLDBLATT et al, 1934) além da avaliação da interação de fármacos, como a irisina, em doenças renais (FORMIGARI, 2022).

1.7 Irisina

Boström *et al* (2012), relatou que a irisina ao ser induzida durante a atividade física, ativa profundas alterações no tecido adiposo subcutâneo, estimulando assim, o escurecimento e a expressão da proteína descopladora mitocondrial 1 (UCP1), ressaltando o aumento no gasto de energia total do corpo e na diminuição da resistência à insulina associada a obesidade.

A irisina é uma proteína constituída por 112 aminoácidos, sendo um produto de clivagem da proteína transmembrana fibronectina tipo III do domínio 5 (FNDC5), regulada pelo receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR γ), estimulado pelo coativador 1-alfa de PPAR γ (PGC1- α) (YANG et al, 2023; KAWAO et al, 2022). Alguns

estudos foram desenvolvidos para tentar esclarecer os efeitos da irisina na LRA. ZHANG *et al* (2020), utilizaram um modelo de camundongo C57BL/6 de isquemia/reperfusão para avaliar o efeito da irisina no curso da LRA, constatando que a suplementação com irisina atenuou a lesão renal induzida, demonstrando redução nos níveis de creatinina sérica e nitrogênio úrico no sangue. O estudo ainda destacou que o pré-tratamento com irisina melhorou a apoptose celular induzida por hipóxia/recuperação, enquanto a transfecção de siRNA de proteína desacopladora 2 (UCP2) apresentou redução significativa do efeito protetor da irisina nas células após hipóxia/recuperação. O estudo observou que o efeito renoprotetor da irisina na LRA pode ser mediado por um aumento da expressão de UCP2 nos rins na isquemia/reperfusão.

Liu *et al* (2020), desenvolveram um estudo com o objetivo de elucidar o papel da irisina na lesão de isquemia renal aguda, observando que o precursor da irisina (FNDC5) foi induzido em túbulos renais e em células tubulares proximais renais de camundongos cultivadas e submetidas a lesão por depleção de ATP. O estudo constatou que as células tubulares renais produzem irisina e que a sua indução na lesão renal aguda é uma resposta protetora.

A irisina também foi associada com a promoção da síntese de glicogênio hepático e inibição de gliconeogênese hepática na manutenção da homeostase de glicose (Canivet *et al*, 2020), atuante no sistema nervoso melhorando funções de cognição, aprendizagem e memória, manutenção da homeostase músculo-esquelética, ao se ligar a integrina $\alpha V\beta 5$ (Colaïanni *et al*, 2017) e também redução do risco de doenças cardiovasculares e cancro (Li *et al*, 2021).

Wei *et al* (2022), avaliaram o pós-tratamento com irisina em lesão renal aguda associada a sepse ferroptose provocada pela peroxidação lipídica dependente de ferro, demonstrando que a irisina poderia restringir a ferroptose, além de aliviar a lesão renal aguda associada a sepse por meio de ativação da via de sinalização SIRT1/Nrf2. O estudo constatou que a irisina inibiu o nível de ferroptose e promoveu melhorias na lesão renal em camundongos CLP, apresentando o possível papel renoprotetor da irisina contra a LRA associada a sepse através de resistência ferroptótica através de ativação da via de sinalização SIRT1/Nrf2.

A irisina apresenta um alto potencial terapêutico, porém seus efeitos renoprotetores imediatos contra lesões renais ainda não foram aprofundados. Tendo em vista a importância dos mecanismos preventivos de lesões renais principalmente para indivíduos que necessitam de intervenções cirúrgicas, o presente estudo tem por objetivo avaliar o papel renoprotetor agudo da irisina contra lesões derivadas de isquemia e reperfusão renal bilateral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o papel da irisina na renoproteção contra lesões derivadas de isquemia e reperfusão renal bilateral.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a parâmetros metabólicos e função renal;
- b) Avaliar a morfologia renal e escore de lesão renal;
- c) Avaliar a inflamação tecidual através da expressão de citocinas no tecido renal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Foram utilizados Ratos Wistar machos com peso entre 250-300g. Os animais foram instalados em ciclo claro/escuro de 12:12h, em temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com livre acesso a água e ração padrão paletizada AIN-93 Nuvilab®. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6).

Este estudo foi submetido e aprovado Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) da UERJ, registrado com o nº 039/2022.

3.2 Grupos experimentais

Nesta seção encontra-se o detalhamento dos 4 grupos experimentais delineados para a análise comparativa proposta nesta dissertação:

- Grupo 1: grupo falso operado (SHAM):

Os animais receberam 100µl de solução salina através da veia jugular interna. Trinta minutos após, houve a incisão nos flancos e os pedículos renais foram manuseados, porém sem o clampeamento dos mesmos. As incisões foram suturadas após 1 hora.

- Grupo 2: grupo falso operado + 10nM de Irisina (SHAM+IRI):

Os animais receberam 10 nM de Irisina (Phoenix Pharmaceuticals, #067-29A) diluído em 100µl de solução salina através da veia jugular interna. Trinta minutos após, houve a incisão nos flancos e os pedículos renais foram manuseados, também sem o clampeamento dos mesmos. As incisões foram suturadas após 1 hora.

- Grupo 3: grupo isquemia e reperfusão (I/R):

Os animais recebem 100µl de solução salina através da jugular interna. Trinta minutos após, houve a incisão nos flancos e os pedículos renais foram clampeados com clamp não traumático com 30g de força (Roca Instrumental®, São Paulo, Brasil) por 1 hora. Após a retirada dos clamps foi realizada a sutura das incisões.

- Grupo 4: grupo isquemia e reperfusão + 10nM de Irisina (I/R+IRI).

Os animais receberam 10 nM de Irisina (Phoenix Pharmaceuticals, #067-29A) em 100µl de solução salina através da jugular interna. Trinta minutos após, houve a incisão nos flancos e os pedículos renais foram clampeados com clamp não traumático com 30g de força (Roca Instrumental®, São Paulo, Brasil) por 1 hora. Após a retiradas dos clamps foi realizada a sutura das incisões.

3.3 Indução de I/R renal bilateral

Para a realização da cirurgia de isquemia e reperfusão renal bilateral, foi utilizado um mix anestésico de 75mg/kg de Cetamina (Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e 10 mg/Kg de Xilasina (Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito lateral para a preparação da cirurgia para indução da isquemia. Houve a incisão da parede dorsal (flancos) para acesso ao rim direito e esquerdo, para melhor visualização artéria e veia renal e o tecido adiposo dos rins de cada animal foram dissecados.

Foram utilizados clamps vasculares não traumáticos com força de 30g (Roca Instrumental®, São Paulo, Brasil) em grupos específicos, como descrito previamente. Após, cada animal foi suturado e mantidos em gaiola até a recuperação da consciência. Por conseguinte, foram transferidos para gaiola metabólica, onde permaneceram 24 horas para obtenção das amostras de urina. Através da gaiola metabólica, foi possível analisar as variações peso de cada animal, a quantidade de água e ração ingeridos e o volume total de urina em um período de 24 horas, o qual foi utilizado para o cálculo de fluxo urinário.

3.4 Eutanásia e coleta do material biológico

Após as 24 horas em gaiola metabólica, os animais foram cuidadosamente retirados, pesados e anestesiados. O peso do animal, volume de urina e a quantidade de ração e água foram registrados e a urina foi coletada e armazenada imediatamente a 4°C para serem centrifugados após a eutanásia do animal. Após a anestesia, o animal foi posicionado em decúbito dorsal e foi realizado uma laparotomia para acesso a veia cava inferior. Foi coletado

2ml de sangue em tubo EDTA 0,1M, o sangue foi encaminhado para a centrifugação e separação do plasma, utilizado para a análise.

Em sequência, foi realizado o deslocamento cervical dos animais e perfusão cardíaca de 20ml de solução salina 0,9% pelo ventrículo esquerdo. Os rins foram excisados e pesados individualmente após remoção da cápsula renal. O rim direito foi cortado longitudinalmente e imergido em formaldeído tamponado 10% para posteriores avaliações de histologia. O rim esquerdo foi cortado transversalmente e armazenado em temperatura -80° para análises de biologia molecular.

Com o valor do peso dos rins foi calculado o índice renal para cada animal, através da seguinte equação:

$$\text{Índice renal} = \text{peso do rim direito (g)} + \text{peso do rim esquerdo (g)} / \text{peso corpóreo (g)}$$

3.5 Parâmetros de função renal

O fluxo urinário (FU) foi obtido através da razão de volume urinário em mililitros (ml) e tempo de permanência na gaiola metabólica (minutos). A dosagem de creatinina urinária e plasmática foi feita utilizando o Kit CREATININA PP (Gold Analisa®) de acordo com o protocolo do fabricante. A uréia plasmática foi dosada com o Kit URÉIA (Gold Analisa®), de acordo com o protocolo do fabricante. O clearance de creatinina foi utilizado para medir a Taxa de Filtração Glomerular (TFG), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{TFG} = \text{FU (ml/min)} \times \text{creatinina urinária (mg/dL)} / \text{creatina plasmática (mg/dL)}$$

3.6 Extração e quantificação de proteína do tecido renal

Foram pesados 50 µg do tecido do rim esquerdo e adicionado 500µl de tampão RIPA (Bio-Rad®) com inibidor de protease (Thermo Scientific, USA, #A32953). Cada amostra foi processada com duas beads de aço inoxidável de 5mm (Qiagen, USA) em sonicador a 50Hz por 1 minuto.

Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 600xg, a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 300xg, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C.

Para a quantificação de proteína total, foi utilizado o Kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA, #23225), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.7 Western Blotting

Para a imunodeteção, 50 µg de proteínas das amostras dos tecidos renais esquerdos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e foi realizado o bloqueio da membrana utilizando leite em pó Molico desnatado 5%, diluído em tampão salino de Tris (TBS).

Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos específicos para a detecção de IL-6, IL1-β, NOX4 e Vinculina. Para a normalização dos dados, controle de qualidade e comparação de dados, foi utilizado a Vinculina como controle interno. A imunodeteção das bandas foi realizada através da quimioiluminescência por sistema ECL (BIO-RAD®) em sistema de aquisição de imagens ChemiDoc XRS (BIO-RAD®). A densitometria das bandas foi realizada através do programa Image J para Windows e utilizada para o cálculo de expressão proteica relativa de IL-6, IL1-β NOX4 em relação ao controle interno.

3.8 PCR em tempo real

Foram utilizados primers específicos para VEGF, PGC1-α, eNos, HIF-1α e TNF-α. A extração de mRNA foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Qiagen, USA). 1 mg de mRNA foi utilizado para confecção de cDNA de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems, USA). O PCR foi realizado com utilização de SybrGreen como sonda no sistema 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

3.9 Histopatologia

A técnica da utilização de microscopia de luz foi implantada para a visualização do tecido do rim direito de cada animal. As amostras armazenadas em formaldeído foram processadas e emblocadas em cortes de 5mm de espessura e encaminhadas para a coloração. Foram utilizados hematoxilina-eosina (H&E) e ácido periódico de Schiff (PAS). Após, em objetiva de 40x foram capturadas 15 fotomicrografias do parênquima renal.

Os aspectos de lesão foram obtidos pela média da soma dos parâmetros morfológicos para a região córtico-medular renal e região cortical, quando houver: 1- ausência de borda em escova; 2- vacuolização citoplasmática; 3- descamação de células tubulares; 4- dilatação tubular; 5- expansão do interstício; 6- cilindros hialinos; 7- gotículas de reabsorção de proteínas; 8- hemorragia intratubular. Estes aspectos foram caracterizados com score de 0 a 4 de acordo com a extensão da lesão da superfície renal, sendo esta: 0 (ausência), 1 = 1% a 24% de superfície renal acometida, 2 = 25%-49%, de superfície renal acometida, 3 = 50% a 74% de superfície renal acometida e 4 = 75% a 100%.

3.10 Análise estatística

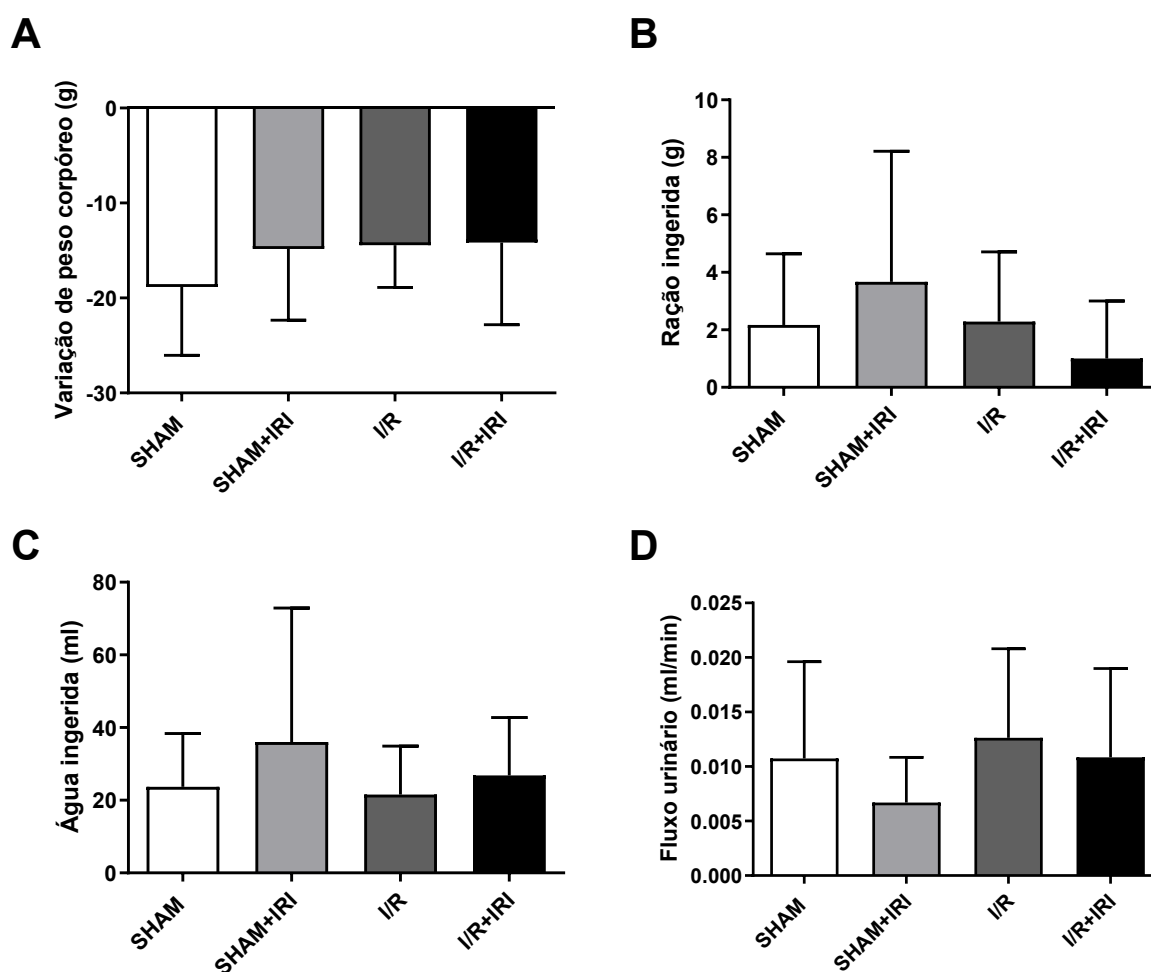
A estatística descritiva foi expressa como média (M) $\pm$ desvio padrão (SD). Em seguida, para tomada de decisão inferencial, a normalidade dos dados foram analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk. Desta forma, a comparação entre as médias para os parâmetros analisados foram realizados através da análise de variância de uma entrada (*One Way ANOVA*) e, o post-hoc de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas específicas entre as médias dos grupos experimentais. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 8.0 e o nível de significância foi considerada quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros metabólicos

Os animais foram pesados anteriormente à cirurgia e mantidos em gaiola metabólica. Após 24 horas eles foram novamente pesados e foi calculada a variação de peso corpóreo em no período (Figura 6A). Também foram realizadas a mensuração de volume urinário e de ingestão de ração e de água neste período (Figura 6B, C e D). Não houve diferença significativa entre os grupos nestes parâmetros analisados.

Figura 6 - Parâmetros metabólicos após 24 horas em gaiola metabólica



Legenda: A: variação de peso corpóreo. Em B: ração ingerida. Em C: água ingerida. Em D: fluxo urinário.

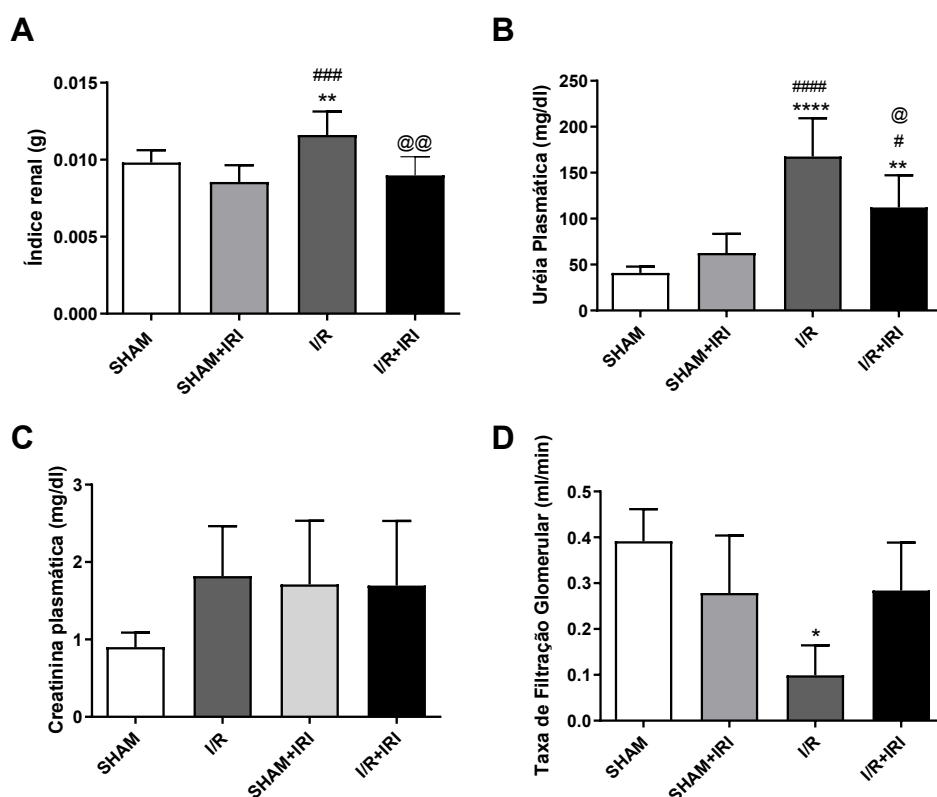
4.2 Função renal

Foi possível observar um aumento do índice renal do grupo com I/R em relação aos grupos SHAM e SHAM+IRI e sua normalização com o pré-tratamento com irisinina (Figura 7A).

A concentração plasmática de uréia nos animais do grupo I/R aumentou em relação aos grupos SHAM e SHAM+IRI. Todavia, os animais que receberam a aplicação da irisinina antes da I/R (I/R+IRI), obtiveram os valores de uréia plasmática reduzidos quando comparados ao grupo isquemia (I/R), porém não foram normalizados quando comparados aos grupos SHAM e SHAM+IRI (Figura 7B).

Apesar de não haver diferença significativa na concentração plasmática de creatinina entre os grupos, os animais do grupo I/R apresentaram uma menor TFG quando comparados aos animais dos grupos SHAM e SHAM+IRI. O grupo I/R+IRI tiveram a TFG normalizada em relação ao grupo SHAM (Figura 7C e D).

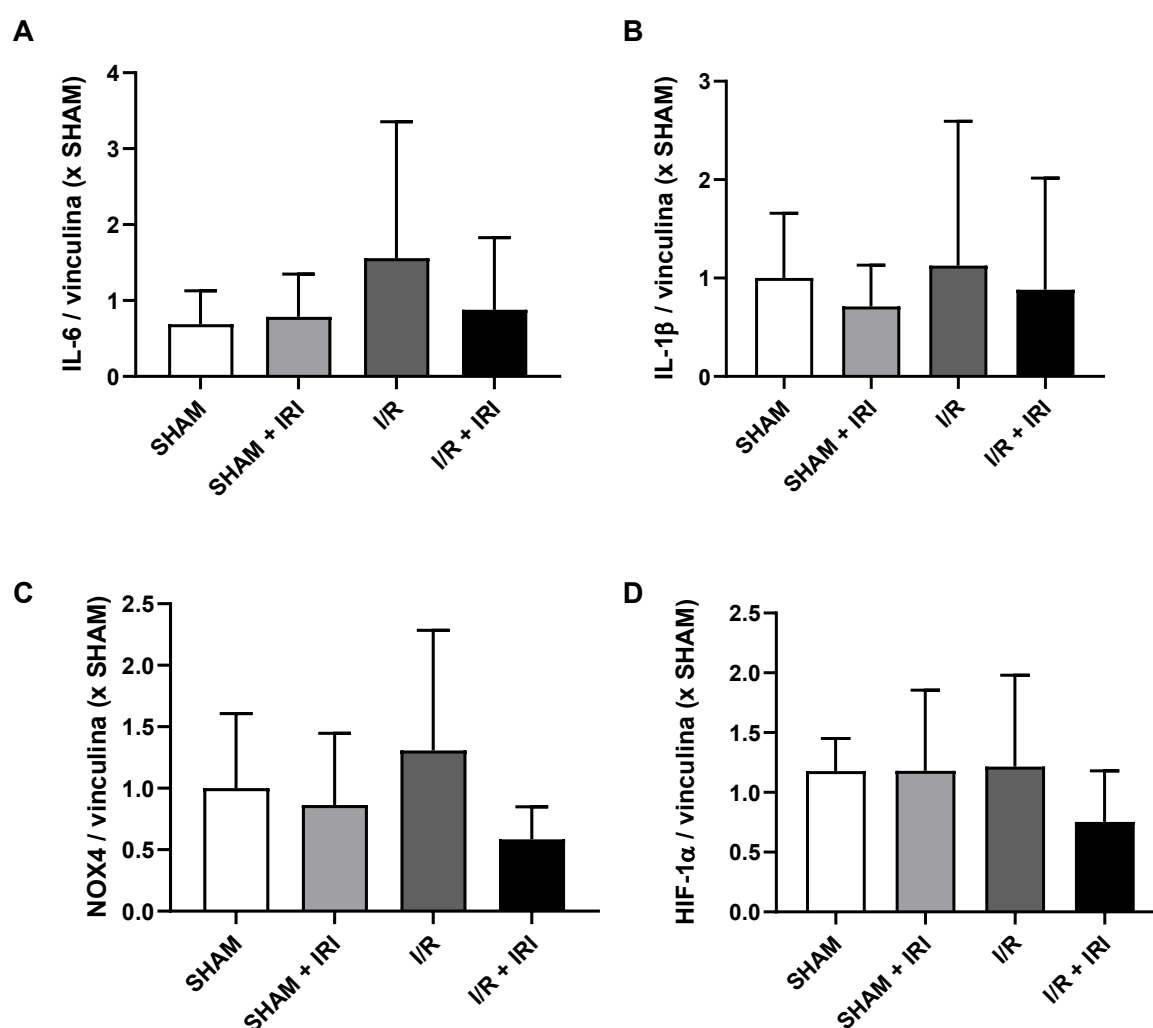
Figura 7 - Função renal após 24 horas em gaiola metabólica



Legenda: A: índice renal. B: concentração de uréia plasmática. Em C: concentração de creatinina plasmática. Em D: taxa de filtração glomerular. * difere do SHAM (* p<0,05; ** p<0,01; **** p<0,0001); # difere do SHAM+IRI (# p<0,05; ### p<0,001; #### p<0,0001); @ difere do I/R (@ p<0,05; @@ p<0,01).

4.3 Expressão proteica renal

Dentre as principais citocinas envolvidas no desenvolvimento e na progressão das lesões renais agudas estão o IL-6, IL1 β , NOX4 e HIF-1 α . Não houve diferenças significativas na expressão renal destas citocinas nos animais isquemiados, bem como a resposta após a administração da irisina (Figura 8).



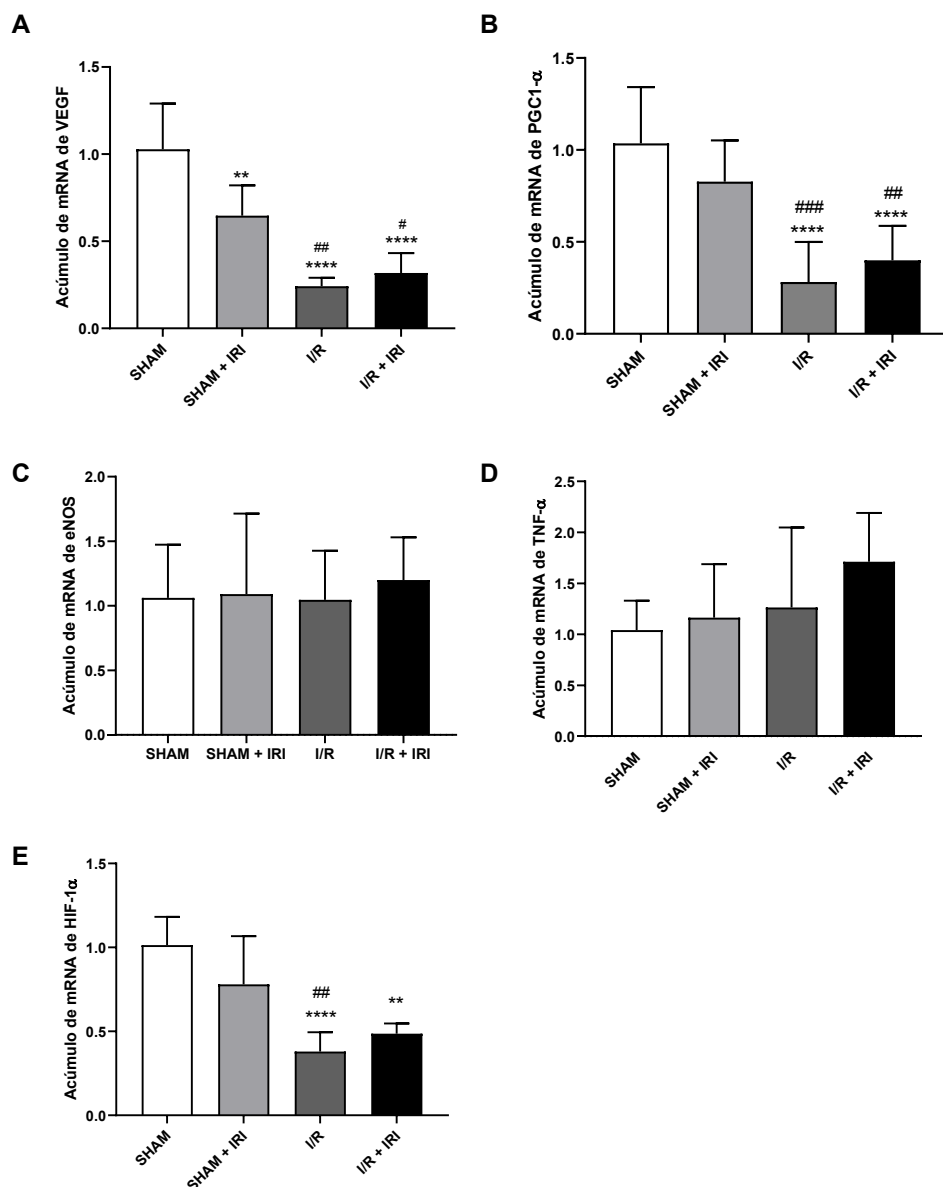
Legenda: A: expressão de IL-6. Em B: expressão de IL-1 β . Em C: expressão de NOX4. Em D: expressão de HIF-1 α . $p > 0,05$.

4.4 Acúmulo de mRNA

Foi observada uma redução no acúmulo de mRNA de VEGF e PGC1- α nos animais do grupo I/R e I/R+IRI em relação aos grupos SHAM e SHAM+IRI (Figura 10 A e B) e uma redução no acúmulo de mRNA de HIF-1 α nos animais do grupo I/R e I/R+IRI em relação ao grupo SHAM (Figura 10E).

Não houve diferença significativa no acúmulo de mRNA de eNOS e TNF- α entre os grupos (Figura 10 C e D).

Figura 9 - Acúmulo de mRNA

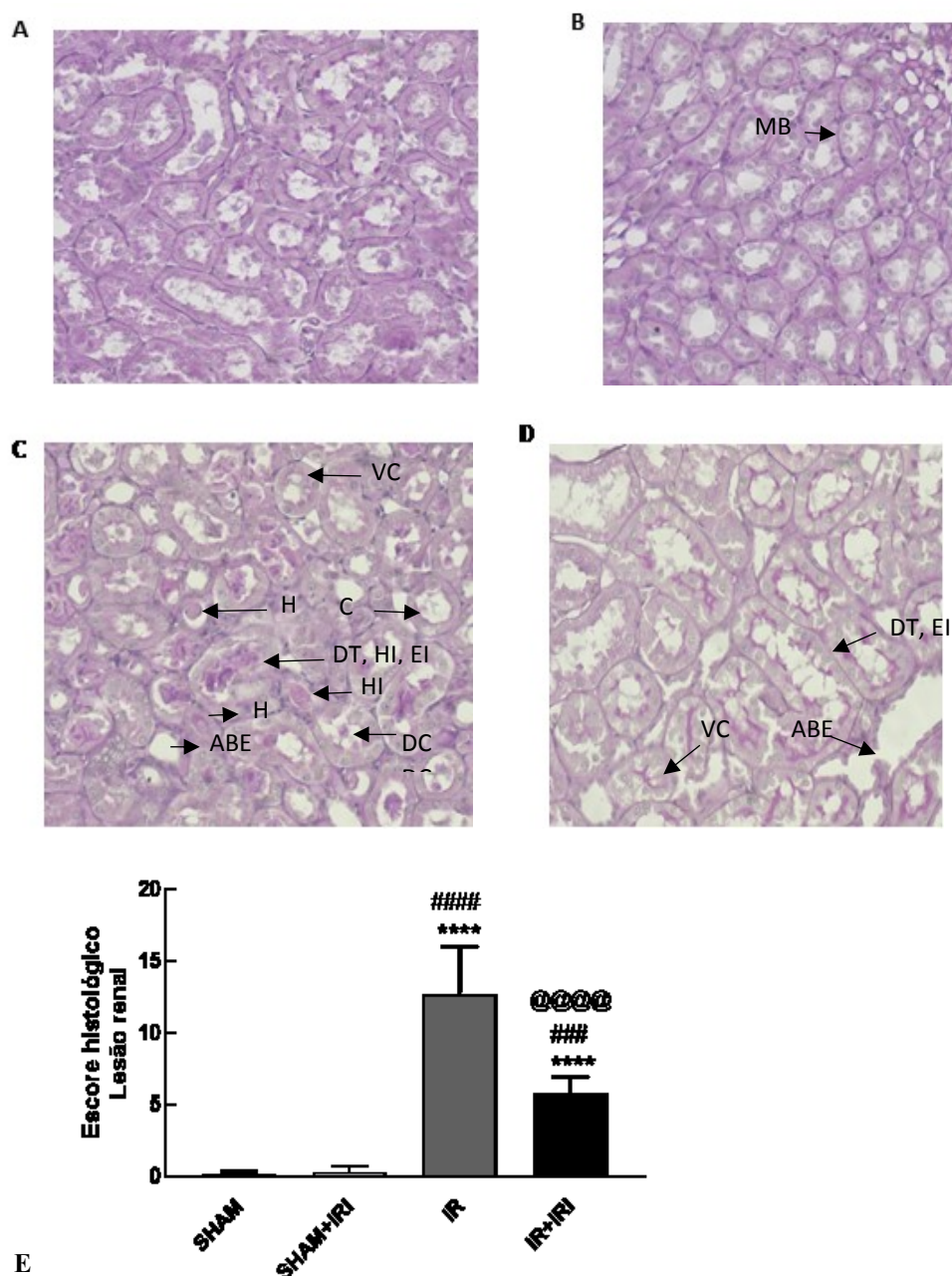


Legenda: A: Acúmulo de mRNA de VEGF. Em B: Acúmulo de mRNA de PGC1- α . Em C: Acúmulo de mRNA de eNOS. Em D: Acúmulo de mRNA de TNF- α . Em E: Acúmulo de mRNA de HIF-1 α . * difere do SHAM (** p<0,01; **** p<0,0001); # difere do SHAM+IRI (# p<0,05; ### p<0,01; ### p<0,001).

4.5 Alterações morfológicas

O grupo I/R possui um alto grau de escore de lesão renal quando comparado aos grupos SHAM e SHAM+IRI. Os animais do grupo I/R+IRI não apresentaram valores equivalentes a normalidade, porém houve preservação tecidual quando comparados aos animais I/R (Figura 9).

Figura 10 - Alterações morfológicas renais em objetiva de 40x



Legenda: A: fotomicrografia representativa de ausência de lesão tubular renal do grupo SHAM. Em B: fotomicrografia representativa de ausência de lesão tubular com melhora do aspecto morfológico e delimitação de membrana basal (MB) do grupo SHAM+IRI. Em C: fotomicrografia representativa do grupo I/R onde (VC) vacuolização citoplasmática, (H) hialinose, (CH) cilindro hialino, (DT) dilatação

tubular, (HI) hemorragia intratubular, (DC) descamação celular e (ABE) ausência de borda em escova. Em D: fotomicrografia representativa do grupo I/R+IRI, onde há melhora dos aspectos histológicos e preservação estrutural tubular. Em E: representação gráfica do escore de lesão renal tubular. * difere do SHAM (**** $p<0,0001$); # difere do SHAM+IRI (### $p<0,001$; ##### $p<0,0001$); @ difere do I/R (@@@@ $p<0,01$).

5 DISCUSSÃO

A progressão da LRA é a maior causadora do custo em saúde devido ao aumento das internações em UTI e mortalidade no mundo (CHERTOW, 2005). A progressão rápida da doença pode gerar perdas da função renal mediada por processos inflamatórios teciduais, apoptose e degeneração do tecido renal (FONDEVILA et al, 2003). A degeneração do tecido renal causa a DRC, doença que resulta na necessidade de hemodiálise e/ou perda do órgão. Tendo em vista as Terapias de Substituição Renal, tratamentos alternativos são fundamentais para a minimização das consequências da isquemia e reperfusão renal.

Procedimentos cirúrgicos como a indução da isquemia e reperfusão são capazes de modular hormônios atuantes na redução do apetite, como a grelina, produzida em menores quantidades no sistema nervoso central, placenta, coração e rins (KOJIMA ET AL, 1999; JOSODA ET AL, 2000, ROSICKA, 2003). Assim como no estudo de KOJIMA et al, 1999, JASODA ET AL, 2000 e ROSICKA, 2003, após a mensuração de alimento e água ingerida, foi possível constatar a redução do apetite e sede dos animais e consequentemente a severa perda de peso. Porém, quando comparada a perda de peso de todos os grupos, não houve diferença estatística.

A I/R gera consequências nos rins na fase isquêmica e na fase reperfusional. Na fase isquêmica gera cascata inflamatória, incluindo espécies reativas de oxigênio e agregação e adesão de células de defesa como leucócitos (JANG, RABB, 2009; SHARFUDDIN, MOLITORIS, 2011) e na fase de reperfusão gera radicais livres de oxigênio que originam peroxidação lipídica na membrana basal. O dano oxidativo das proteínas e mutação gênica do DNA, são contribuintes para a apoptose celular (KEHRER, 1993).

Uma das principais consequências da morte celular na I/R é a redução do fluxo urinário renal. Entretanto, os grupos experimentais I/R tiveram o fluxo urinário aumentado. A hipótese para este achado, está relacionado à natriurese, processo pelo qual é induzido mecanismos compensatórios para eliminação de metabólitos do organismo (AMARAL & SPOSITO, 2006; KURTZ ET AL, 2016, PAULA & COSTA, 2010). Logo, o objetivo principal da diurese nestes grupos específicos é a busca pela resposta de equilíbrio hidroeletrólítico e acidobásico. Animais tratados tiveram valores normalizados quando comparados ao grupo controle SHAM.

O índice renal na I/R representa um importante dado para compreensão das LRAs, que representam uma grave ameaça a vida. O mecanismo oxidativo normal das mitocôndrias é essencial para garantir produção e transporte de glicose, danos oxidativos resultam em

distúrbios na glicólise ou gliconeogênese renal, sendo a glicólise o mecanismo mais afetado (WEI et al., 2014; LEGOUIS et al., 2020; SCANTLEBERY et al., 2021). O aumento do índice renal em animais isquemiados pode sugerir disfunções mitocondriais como processos hipertróficos, hiperplásicos ou edema tecidual, aumentando a relação da massa renal em relação ao peso corpóreo. A administração da irisina representou um dado estatístico importante, uma vez que contribuiu para a preservação estrutural renal, melhorando o índice renal de animais tratados, sugerindo aumento das taxas de filtração glomerular.

A TFG é um importante parâmetro de prognóstico de DRC. Na I/R a redução da TFG resulta no acúmulo de componentes nitrogenados como a ureia e a creatinina. A redução da capacidade de concentrar ou diluir urina e desequilíbrio acidobásico resulta no acúmulo de líquidos formadores de edema (MENK et al, 2014; HARRIS et al, 2015). No presente estudo, animais controle (SHAM) possuem suas concentrações de creatinina e ureia reduzidas quando comparadas aos demais grupos. Logo, a TFG deste grupo se encontra aumentada e os rins funcionam normalmente. Entretanto, animais I/R que tiveram suas concentrações plasmáticas de creatinina e ureia aumentada quando comparada aos demais grupos, validaram a diminuição da capacidade de filtração glomerular indicando danos renais. Ambos resultados corroboram com estudos anteriores voltados para a LRA em protocolo de isquemia e reperfusão renal. Animais tratados não tiveram suas concentrações plasmáticas de creatinina normalizadas quando comparados ao grupo SHAM e não foi observada diferença estatística entre os grupos avaliados. Em contrapartida, houve a diminuição da uréia plasmática, o que normalizou as taxas de filtração glomerular dos grupos I/R+IRI quando comparados ao SHAM. Logo, a irisina foi capaz de reverter o dano funcional na I/R.

Na tentativa de reparo ou recuperação completa o rim pode sofrer reparo mal adaptativo caracterizado por reprogramação metabólica gerando na maior dependência de glicólise. Devido a efeitos conflitantes nas células, o mau adaptativo pode promover ainda mais disfunção mitocondrial (YANG et al., 2023). O processo de degeneração celular é iniciado a partir do desencadeamento da hipóxia celular mediado pela oclusão da artéria renal.

A hipóxia tecidual é causada pelo comprometimento da oferta do oxigênio no órgão. Consequentemente, há aumento de Fator Induzível por Hipóxia (HIF1- α) (LI, 2020) e maior estímulo de angiogênese mediada pelo fator de crescimento endotelial (VEGF) (KANELLIS et al., 2002). A implicação da falta de oxigênio intracelular propicia a inflamação. Entre as principais citocinas inflamatórias reconhecidas em lesões renais agudas está a IL-1 e a IL-6. A IL-1 é uma citocina de família α e β que possui papel chave nas respostas de fase aguda das

Lesões Renais Agudas, aumentando a expressão de moléculas de adesão e células inflamatórias (SIMS & SMITH, 2010; VORONOV et al, 2014). A IL-6 tem a função promotora de diferenciação e recrutamento de leucócitos, além de proteína C no fígado em resposta a fase aguda ou crônica da inflamação (STENVINKEL, 2005).

A perda de enzimas mitocondriais resultante da hipóxia tecidual está diretamente relacionada ao aumento dos níveis da NADPH oxidase 4 (NOX 4) que desempenha papel decisivo na modulação do estresse oxidativo e está relacionada a diversas doenças renais. O aumento do estresse oxidativo contribui para o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) resultando em dano celular (LI et al., 2023)

No presente trabalho, não houve diferença significativa na análise das quantidades de HIF, IL-1 β e IL-6 e HIF1- α . Isto pode ter ocorrido pela modulação do controle interno utilizado (Vinculina), sendo uma limitação do estudo. Estudos apontam que em células cardíacas, a vinculina é localizada em 3 compartimentos celulares: citosol, membrana celular/nuclear e citoesqueleto (ARMSTRONG, 2001). No rim a Vinculina é presente na membrana basal das células glomerulares (podócitos) e se ligam por meio de recrutamento da proteína Talina e sítios de ligação. A Vinculina é responsável pelas adesões focais de proteínas estruturais, permitindo a interação com a actina, a α -actinina, Arp2/3, e paxilina. Consequentemente a Vinculina propicia força estrutural de podócitos modulando a resposta a inflamação de forma positiva. (LENNON et al., 2014).

A análise de acúmulo de mRNA permite uma avaliação mais precisa da resposta inflamatória mais precisa. Portanto, foi possível identificar que animais isquemiados tiveram suas concentrações de VEGF, PGC1- α e HIF1- α reduzidos quando comparados aos demais grupos. A resposta mediante a inflamação é mediada pelo mecanismo de permeabilidade vascular, quimiotática de monócitos e angiogênese mediado pelo VEGF. Na I/R as concentrações de VEGF não se encontram reduzidas, e estando aumentadas somente nos receptores específicos VGFR-1 e VGFR-2 que estimulam a resposta antiapoptótica, biogênese mitocondrial e mitofagia. (KANELLIS et al., 2002). Consequentemente, o VEGF é responsável por estimular a resposta do PGC1- α que secreta a irisina através da clivagem do FNDC5 (KANELLIS et al., 2002; ZHANG et al., 2020). O VEGF também é responsável pelo estímulo de HIF1- α em períodos de isquemia, melhorando lesões e funções renais e imunológicas. Com isto, há aumento de resposta inflamatórias e proteínas mediadoras do apoptose (KANELLIS et al., 2002; LYNCH et al., 2018), como o TNF- α .

O TNF- α é secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos e o mecanismo fisiológico irá depender da via pela qual este fator atua. Ao se em receptores TNF-R2, o O TNF- α desencadeará mecanismos apoptóticos celulares, promovendo resposta imune através do recrutamento de células de defesa como monócitos e neutrófilos. Quando secretado em baixas concentrações, O TNF- α atua em células endoteliais promovendo vasodilatação e secretando quimiocinas de ação quimiotática promovendo combate a processos infecciosos nos locais inflamados (WANG et al, 2020; VITALE et al, 2007). Desta forma, o O TNF- α é uma importante citocina a ser estudada na DRC. No presente estudo, animais tratados com irisina obtiveram alto acúmulo de TNF- α quando comparados aos demais grupos, principalmente quando comparado aos animais controle. Animais tratados com a irisina também tiveram o aumento das concentrações de VEGF, PGC1- α e HIF1- α o que provocou a melhora aspecto das funções e lesões renais comprovado por histologia.

O condicionamento pré-isquêmico é um item chave para o papel renoprotetor. Este papel é mediado pela presença de óxido nítrico sintase endotelial. Esta citocina é responsável pela prevenção da lesão vascular através da preservação das capacidades funcionais do endotélio vascular (eNOS) (YAMASOWA, 2005). Apesar de não haver diferenças significativas após a análise de mRNA de eNOS em grupos I/R+IRI, as lesões por isquemia e reperfusão foram claramente atenuadas.

A fotomicrografia do parênquima renal evidencia o papel renoprotetor da irisina em diferentes grupos. Animais SHAM e SHAM+IRI possuem ausência de lesões renais. Animais SHAM+IRI por sua vez apresentaram melhora morfológica da delimitação da MB. Em contraproposta aos animais controle, animais I/R possuem alto grau de lesão, com maior gravidade. A isquemia e subsequente reperfusão propiciaram vacuolizações citoplasmáticas, hialinose, presença de cilindros hialinos, dilatações intratubulares, hemorragias tubulares, descamações celulares e ausências de bordas em escova. Estas degenerações subsequentes possuem um alto grau de impacto no órgão, originando a falência renal na DRC. Animais tratados com a dose de 10nM de irisina reduziram pela metade o Escore de Lesão Renal. Logo, houve uma maior preservação da função e tecido renal.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que a suplementação de irisina 10 nM em ratos Wistar atenuou as lesões renais, porém não foi capaz de normalizar todas as alterações observadas. A irisina foi capaz de melhorar a função renal, reduzindo o índice renal de animais isquemiados e as concentrações de ureia plasmática. Isto resultou no aumento das taxas de filtração glomerular e redução do Escore de Lesão Renal em animais submetidos a isquemia e reperfusão bilateral. Através da terapêutica foi possível constatar que fármaco melhorou a estrutura renal através da preservação tecidual.

Não conseguimos precisar por análise proteica ou análise de mRNA uma possível via pela qual a irisina proporciona a melhora observada na função e morfologia dos rins, que parece ser independente de HIF-1 α , VEGF e PGC1- α . Uma das possíveis hipóteses para os resultados encontrados seria a dose utilizada de irisina, que pode ter sido insuficiente para sobrepor os efeitos nocivos da lesão por isquemia e reperfusão. Doses maiores de irisina podem ser testadas futuramente para uma melhor função terapêutica contra as lesões renais agudas.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAY ESWF. Criação e produção de animais transgênicos e nocaute. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS editores. Animais de Laboratório - criação e experimentação. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**; 2002. p. 325-352.
- AIRES, M. M. - Hemodinâmico Renal. In: Aires, M.M. Fisiologia: Fisiologia Renal. 2ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008, p. 574-585.
- AIRES, M. M. Fisiologia. 4.ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2015, p. 682- 688.
- AKILESH, S.; HUBER, T.B.; WU, H., WANG, G., HARTLEBEN, B.; KOPP, J.B.; MINER, J.H.; ROOPENIAN, D.C.; UNANUE, E.R.; SHAW, A.S. - Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. **PNAS**, 2008; 105(3): 967-972.
- AL-LAMKI, R. S. & MAYADAS, T. N. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. **Kidney Int.** 2015 Feb;87(2):281-96.
- ALVES, B. Insuficiência renal aguda. **Biblioteca Virtual em Saúde**. 2011.
- AMARAL, A. C. K. B.; SPOSITO, A. C. Lipid modulation of intravascular and cellular sodium handling: mechanistic insights and potential clinical implications. **Current vascular pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 409–417, 2006.
- AMES MK, ATKINS CE, PITT B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. **J Vet Intern Med.** 2019 Mar;33(2):363-382.
- ANSQUER JC, DALTON RN, CAUSSÉ E, CRIMET D, LE MALICOT K, FOUCHER C. Effect of fenofibrate on kidney function: a 6-week randomized crossover trial in healthy people. **Am J Kidney Dis.** 2008 Jun;51(6):904-13.
- ARMSTRONG, S. C. et al. Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 33, n. 6, p. 1165–1179, 2001.
- BASTOS, M. G., BREGMAN, R., & KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista Da Associação Médica Brasileira**. 2010 56(2), 248–253.
- BAYRAK O, BAVBEK N, KARATAS OF, BAYRAK R, CATAL F, CIMENTEPE E, AKBAS A, YILDIRIM E, UNAL D, AKCAY A. Nigella sativa protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys. **Nephrol Dial Transplant.** 2008;23(7):2206–2212.
- BERNHARDT WM, CÂMPEAN V, KANY S, JÜRGENSEN JS, WEIDEMANN A, WARNECKE C, AREND M, KLAUS S, GÜNZLER V, AMANN K, WILLAM C, WIESENER MS, ECKARDT KU. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. **J Am Soc Nephrol.** 2006;17(7):1970–1978.

BICHET DG. Regulation of Thirst and Vasopressin Release. **Annu Rev Physiol.** 2019 Feb 10;81:359-373.

BOSTRÖM P, WU J, JEDRYCHOWSKI MP, KORDE A, YE L, LO JC, RASBACH KA, BOSTRÖM EA, CHOI JH, LONG JZ, KAJIMURA S, ZINGARETTI MC, VIND BF, TU H, CINTI S, HØJLUND K, GYGI SP, SPIEGELMAN BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature.** 2012 Jan 11;481(7382):463-8.

BREGMAN, R. Papel da ingestão de proteínas e lipídeos na filtração glomerular normal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 19, n. 1, p.42-46, 1997

CANIVET CM, BONNAFOUS S, ROUSSEAU D, LECLERE PS, LACAS-GERVAIS S, PATOURAUX S, SANS A, LUCI C, BAILLY-MAITRE B, IANNELLI A, TRAN A, ANTY R, GUAL P. Hepatic FNDC5 is a potential local protective factor against Non-Alcoholic Fatty Liver. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA).** 2020; v. 1866, n. 5, p. 165705.

CHEN X, LIU X, WAN X, WU Y, CHEN Y, CAO C. Ischemic preconditioning attenuates renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting activation of IKK β and inflammatory response. **Am J Nephrol.** 2009;30(3):287–294.

CHERCHIGLIA, M. L., MACHADO, E. L., SZUSTER, D. A. C., ANDRADE, E. I. G., ACÚRCIO, F. DE A., CAIAFFA, W. T., SESSO, R., GUERRA JUNIOR, A. A., QUEIROZ, O. V. DE., & GOMES, I. C. Perfil epidemiológico dos pacientes em terapia renal substitutiva no Brasil, 2000-2004. **Revista De Saúde Pública** 2010; 44(4), 639–649.

CHERTOW GM, BURDICK E, HONOUR M, BONVENTRE JV, BATES DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. **J Am Soc Nephrol.** 2005 Nov;16(11):3365-70.

CHEUNG WW, PAIK KH, MAK RH. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. **Pediatr Nephrol** 2010;25:711-24.

CHURCH, D.C. 1988. The ruminant animal digestive physiology and nutrition. **Englewood Cliffs: O & Books Inc.** 564p

CIRILLO M. Evaluation of glomerular filtration rate and of albuminuria/proteinuria. **J Nephrol** 2010; 23(2): 125-32.

COELHO DA SILVA, J.F., LEÃO, M.I. 1979. Fundamentos de nutrição de ruminantes. Piracicaba: **Livroceres.** 380p.

COLAIANNI G, MONGELLI T, CUSCITO C, PIGNATARO P, LIPPO L, SPIRO G, NOTARNICOLA A, SEVERI I, PASSERI G, MORI G, BRUNETTI G, MORETTI B, TARANTINO U, COLUCCI SC, RESELAND JE, VETTOR R, CINTI S, GRANO M. Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice. **Sci Rep.** 2017 Jun 6;7(1):2811.

CONDE, E. et al. HIF-1 α induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 41099, 2017

COUSER WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transplant** 1998;13:10-5.

COUTINHO, Palloma Carolayne de Moura. Avaliação do Perfil da Taxa de Filtração Glomerular e Creatinina Sérica em Pacientes Idosos Atendidos em um Hospital Universitário. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

DALAL, R. *et al.* Physiology, Renal Blood Flow and Filtration. **StatPearls Publishing**. 2023.

DAVIS ME, CAI H, DRUMMOND GR, HARRISON DG. Shear stress regulates the expression of endothelial nitric oxide synthase through c-Src by divergent signaling pathways. **Circ Res**. 2001 November 23; 89(11):1073-80.

DI DIO LJA. Tratado de anatomia aplicada. 1.ed. São Paulo: **Pólus Editorial**, 1999. 2v.

DUQUES P, RODRIGUES JR, SILVA NETO FB, S. NETO EM, TOLÊDO ES de. Estudo anatômico da veia renal esquerda de cadáveres humanos brasileiros. **Medicina, Ribeirão Preto** [Internet]. 30º de junho de 2002 [citado 17º de outubro de 2024];35(2):184-91.

DVORAK HF, BROWN LF, DETMAR M, DVORAK AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol**. 1995;146(5): 1029-39.

FANDREY J., GORR T.A., GASSMANN M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. **Cardiovasc Res**. 2006 Sep 1;71(4):642-51.

FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev**. 1997 Feb;18(1):4-25.

FONDEVILA, C.; BUSUTTL, R. W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. **Experimental and molecular pathology**, v. 74, n. 2, p. 86–93, 2003.

FORMIGARI, G.P., DÁTILO, M.N., VAREDA, B. et al. Renal protection induced by physical exercise may be mediated by the irisin/AMPK axis in diabetic nephropathy. **Sci Rep** 2022; 12, 9062.

GARDNER. E.; et al. Anatomia, 4.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1998.

GOLDBLATT H, LYNCH J, HANZAL RF, SUMMERVILLE WW. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. **J Exp Med**. 1934 Feb 28;59(3):347-79.

GOTTLIEB RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**. 2011;16(3–4):233–238.

GRAY H, GROSS CH. Anatomia. 29. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-koogan**, 1988.

GROFFEN, A.J.A.; VEERKAMP, J.H.; MONNENS, L.A.H. VAN DEN HEUVEL, L.P.W.J. - Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. **Nephrol Dial Transplant**. 1999; 14(9): 2119-2129.

GUPTA, A., GUPTA, P. & BIYANI, M. - Targeted therapies in diabetic nephropathy: an update. **J Nephro**, 2011; 24(6):686-695.

GUSTAFSSON ÅB, GOTTLIEB RA. Heart mitochondria: Gates of life and death. **Cardiovasc Res**. 2008;77(2):334–343.

HALL JE, GUYTON AC. Tratado de fisiologia médica. 13 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2017.

HSU CY, HSU RK, YANG J, ORDONEZ JD, ZHENG S, GO AS. Elevated BP after AKI. **J Am Soc Nephrol**. 2016 Mar;27(3):914-23.

HARRIS, D. G.; MCCRONE, M. P.; KOO, G.; WELTZ, A. S.; CHIU, W. C.; SCALEA, T. M.; DIAZ, J. J.; LISSAUER, M. E. Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill surgical patients. *J Crit Care*. v. 30, n. 1, p. 102-6, 2015.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rats des-Gln 14- Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*. 2000; 275(29):910-13.

HUANG SS, WEI FC, HUNG LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte-endothelial cell interactions - Role of nitric oxide and protein kinase C. **Circ J**. 2006;70(8):1070–1075.

HUNLEY TE, MA LJ, KON V. Scope and mechanisms of obesity-related renal disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 2010;19:227-34.

JANG, H. R.; RABB, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 130, n. 1, p. 41–50, 2009.

JENKINS G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. **Int J Biochem Cell Biol**. 2008;40(6-7):1068-78.

KALOGERIS T, BAINES CP, KRENZ M, KORTHUIS RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. 1st ed. **Elsevier Inc.**, 2012 doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.

KANELLIS, J. et al. Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. **Kidney international**, v. 61, n. 5, p. 1696–1706, 2002.

KATO M, KAKO KJ. Effects of N-(2-mercaptopropionyl)glycine on ischemic-reperfused dog kidney in vivo and membrane preparation in vitro. **Mol Cell Biochem**. 1987;78(2):151–159.

KAWAO N, KAWAGUCHI M, OHIRA T, EHARA H, MIZUKAMI Y, TAKAFUJI Y, KAJI H. Renal failure suppresses muscle irisin expression, and irisin blunts cortical bone loss in mice. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**. 2022 Feb;13(1):758-771.

KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Kidney Int Suppl** 2012; 2(1):1-138.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical reviews in toxicology**, v. 23, n. 1, p. 21–48, 1993.

KELLUM JA, ROMAGNANI P, ASHUNTANTANG G, RONCO C, ZARBOCK A, ANDERS HJ. Acute kidney injury. **Nat Rev Dis Primers**. 2021 Jul 15;7(1):52.

KIM, YM., TZENG, E., BILLIAR, T.R. (1997). Role of NO and Nitrogen Intermediates in Regulation of Cell Functions. In: Goligorsky, M.S., Gross, S.S. (eds) Nitric Oxide and the Kidney. **Springer**, Boston, MA.

KIRSZTAJN GM. Proteinúria: muito mais que uma simples dosagem. **J Bras Patol Med Lab**. 2010 Jun;46(3).

KLUGER MA, OSTMANN A, LUIG M, MEYER MC, GOERKE B, PAUST HJ, MEYER-SCHWESINGER C, STAHL RA, PANZER U, TIEGS G, STEINMETZ OM. B-cell-derived IL-10 does not vitally contribute to the clinical course of glomerulonephritis. **Eur J Immunol**. 2014;44(3):683–693.

KNIGHT EL, RIMM EB, PAI JK, REXRODE KM, CANNUSCIO CC, MANSON JE, STAMPFER MJ, CURHAN GC. Kidney dysfunction, inflammation, and coronary events: a prospective study. **J Am Soc Nephrol**. 2004 Jul;15(7):1897-903.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656–660, 1999.

KOSIERADZKI M, ROWIŃSKI W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. **Transplant Proc**. 2008;40(10):3279–3288.

KURTZ, T. W.; DICARLO, S. E.; MORRIS, R. C., Jr. Logical issues with the pressure natriuresis theory of chronic hypertension. **American journal of hypertension**, v. 29, n. 12, p. 1325–1331, 2016.

CHUNG, K. W. et al. Mitochondrial damage and activation of the STING pathway lead to renal inflammation and fibrosis. **Cell metabolism**, v. 30, n. 4, p. 784- 799.e5, 2019.

LEGOUIS D, RICKSTEN SE, FAIVRE A, VERISSIMO T, GARIANI K, VERNEY C, GALICHON P, BERCHTOLD L, FERAILLE E, FERNANDEZ M, PLACIER S, KOPPITCH K, HERTIG A, MARTIN PY, NAESENS M, PUGIN J, MCMAHON AP, CIPPÀ PE, DE SEIGNEUX S. Altered proximal tubular cell glucose metabolism during acute kidney injury is associated with mortality. **Nat Metab**. 2020 Aug;2(8):732-743.

LENNON, R.; RANGLES, M. J.; HUMPHRIES, M. J. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 160, 2014.

LEUNG DW, CACHIANES G, KUANG WJ, GOEDDEL DV, FERRARA N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**. 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.

LI C, JACKSON RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **Am J Physiol - Cell Physiol**. 2002;282(2 51-2).

LI H, QIN S, LIANG Q, XI Y, BO W, CAI M, TIAN Z. Exercise Training Enhances Myocardial Mitophagy and Improves Cardiac Function via Irisin/FNDC5-PINK1/Parkin Pathway in MI Mice. **Biomedicines**. 2021 Jun 21;9(6):701.

LI, X. et al. The effects of HIF-1 α overexpression on renal injury, immune disorders and mitochondrial apoptotic pathways in renal ischemia/reperfusion rats. **Translational andrology and urology**, v. 9, n. 5, p. 2157–2165, 2020.

LI X, LIAO J, SU X, LI W, BI Z, WANG J, SU Q, HUANG H, WEI Y, GAO Y, LI J, LIU L, WANG C. Human urine-derived stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury in a rat model via exosomal miR-146a-5p which targets IRAK1. **Theranostics** 2020; 10(21):9561-9578.

LI, J. et al. NOX4 is a potential therapeutic target in septic acute kidney injury by inhibiting mitochondrial dysfunction and inflammation. **Theranostics**, v. 13, n. 9, p. 2863–2878, 2023.

LIU H, LI Y, XIONG J. The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha in Renal Disease. **Molecules**. 2022 Oct 28;27(21):7318.

LIU Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. **Kidney Int** 2006;69:213-7.

LIU Y, FU Y, LIU Z, SHU S, WANG Y, CAI J, TANG C, DONG Z. Irisin is induced in renal ischemia-reperfusion to protect against tubular cell injury via suppressing p53. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**. 2020 Jul 1;1866(7):165792.

LYNCH, M. R.; TRAN, M. T.; PARIKH, S. M. PGC1 α in the kidney. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 314, n. 1, p. F1–F8, 2017.

MAHFOUDH-BOUSSAID A, ZAOUALI MA, HADJ-AYED K, MILED AH, SAIDANE-MOSBAHI D, ROSELLO-CATAFAU J, BEN ABDENNEBI H. Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1 in ischemic kidney: The role of nitric oxide. **J Biomed Sci**. 2012;19(1):1–8.

MARIANI LH, MARTINI S, BARISONI L, CANETTA PA, TROOST JP, HODGIN JB, PALMER M, ROSENBERG AZ, LEMLEY KV, CHIEN HP, ZEE J, SMITH A, APPEL GB, TRACHTMAN H, HEWITT SM, KRETZLER M, BAGNASCO SM. Interstitial fibrosis scored on whole-slide digital imaging of kidney biopsies is a predictor of outcome in proteinuric glomerulopathies. **Nephrol Dial Transplant**. 2018 Feb 1;33(2):310-318.

MARUMO T, SCHINI-KERTH VB, BUSSE R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. **Diabetes**. 1999 May;48(5):1131-7.

MCGETTRICK AF, O'NEILL LAJ. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. **Cell Metab.** 2020 Oct 6;32(4):524-536.

MENG J, WANG J, STEINHOFF M, DOLLY JO. TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. **Sci Rep.** 2016 Feb 18;6:21226.

MENK, J., SOLLINGER, D., SCHAMBERGER, B., HEEMANN, U., LUTZ, J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Curr Opin Organ Transplant.*, v. 19, n. 4, p. 395-400, 2014.

MISSERI R, MELDRUM DR, DINARELLO CA, DAGHER P, HILE KL, RINK RC, MELDRUM KK. TNF- α mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling. **Am J Physiol - Ren Physiol.** 2005;288(2 57-2):406-412.

MIYAJIMA, A. et al. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. **Kidney international**, v. 58, n. 6, p. 2301-2313, 2000.

MOLITORIS BA. Ischemic acute renal failure: exciting times at our fingertips. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 1998;7(4):405-6.

MORAN K, MULHALL J, KELLY D, SHEEHAN S, DOWSETT J, DERVAN P, FITZPATRICK JM. Morphological changes and alterations in regional intrarenal blood flow induced by graded renal ischemia. **J Urol.** 1992 Aug; 148 (2 Pt 1):463-6.

MUNGER, J. S. et al. The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**, v. 96, n. 3, p. 319-328, 1999.

OBERG BP, MCMENAMIN E, LUCAS FL, MCMONAGLE E, MORROW J, IKIZLER TA, HIMMELFARB J. Increased prevalence of oxidative stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney Int.** 2004 March; 65(3):1009-16.

PARTOVIAN, C. et al. Effects of a chronic high-salt diet on large artery structure: role of endogenous bradykinin. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 5, p. H1423-8, 1998.

PENG TI, JOU MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. **Ann N Y Acad Sci.** 2010;1201:183-188.

PICKKERS P, DARMON M, HOSTE E, JOANNIDIS M, LEGRAND M, OSTERMANN M, PROWLE JR, SCHNEIDER A, SCHETZ M. Acute kidney injury in critically ill patients: an updated review on pathophysiology and management. **Intensive Care Med.** 2021; 47(8):835-850.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCK, K. E. Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações. 4. ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2000. 547-566 p.

RIELLA, C.M. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.

RIFKIN, D. B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. **The journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7409–7412, 2004.

ROSICKÁ, M. et al. Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. **Physiological research**, v. 52, n. 1, p. 61–66, 2003.

SABIO G, DAVIS RJ. TNF and MAP kinase signaling pathways. **Semin Immunol**. June 2014; 26(3):237-45.

SALAHUDEEN AK, YANG M, HUANG H, DORE S, STEC DE. Fenoldopam preconditioning: Role of heme oxygenase-1 in protecting human tubular cells and rodent kidneys against cold-hypoxic injury. **Transplantation**. 2011;91(2):176–182.

DOS SANTOS, B. F. **Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético**. Disponível em: <<https://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-11.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2025

SCANTLEBERRY AM, TAMMARO A, MILLS JD, RAMPANELLI E, KORS L, TESKE GJ, BUTTER LM, LIEBISCH G, SCHMITZ G, FLORQUIN S, LEEMANS JC, ROELOFS JJ. The dysregulation of metabolic pathways and induction of the pentose phosphate pathway in renal ischaemia-reperfusion injury. **J Pathol**. 2021 Apr;253(4):404-414.

SHARFUDDIN, A. A.; MOLITORIS, B. A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Nature reviews. Nephrology**, v. 7, n. 4, p. 189–200, 2011.

SHOKEIR AA, HUSSEIN AM, BARAKAT N, ABDELAZIZ A, ELGARBA M, AWADALLA A. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and Nrf2-dependent genes by ischaemic pre-conditioning and post-conditioning: New adaptive endogenous protective responses against renal ischaemia/reperfusion injury. **Acta Physiol**. 2014;210(2):342–353.

SIMS, J. E. & SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**. 2010 Feb;10(2):89-102.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Diretrizes para o manejo da insuficiência renal aguda. 2020. Disponível em: https://www.sbn.org.br/fileadmin/user_upload/sbn/2020/01/04/Diretrizes_Insuficiencia_Renal_Aguda.pdf. Acesso em: 17 out. 2024

SODRÉ FL, COSTA JCB, LIMA JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**. 2007 Sep;43(5):329–37.

STENVINKEL P, KETTELER M, JOHNSON RJ, LINDHOLM B, PECOITS-FILHO R, RIELLA M, HEIMBÜRGER O, CEDERHOLM T, GIRNDT M. IL-10, IL-6, and TNF-alpha:

central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. **Kidney Int.** 2005 Apr;67(4):1216-33.

STREETZ, K. L. et al. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 47, n. 4, p. 661–673, 2001.

SUGIYAMA S, HANAKI Y, OGAWA T, HIEDA N, TAKI K, OZAWA T. The effects of sun 1165, a novel sodium channel blocker, on ischemia-induced mitochondrial dysfunction and leakage of lysosomal enzymes in canine hearts. **Biochem Biophys Res Commun.** 1988;157(2):433–439.

TAGUCHI S, AZUSHIMA K, YAMAJI T, URATE S, SUZUKI T, ABE E, TANAKA S, TSUKAMOTO S, KAMIMURA D, KINGUCHI S, YAMASHITA A, WAKUI H, TAMURA K. Effects of tumor necrosis factor inhibition α on renal fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. **Sci Rep** 11, 23587 (2021).

THRALL, M. A. WEISER, G. ALLISON, R. W. CAMPBELL, T.W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2 ed. São Paulo: **Roca**, cap. 23, p. 284-285, 2015.

VENKATACHALAM, M.A. & RENNKE, H.G. - The structural and molecular basis of glomerular filtration. **Circ Res**, 1978; 43(3): 337-347.

VERROUST, P.J., BIRN, H., NIELSEN, R., KOZYRAKI, R. & CHRISTENSEN, E.I. - The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. **Kidney International**, 2002; 62(3): 745–756.

VIDIGAL PG. LABORATORY INVESTIGATION OF THE PATIENT WITH RENAL DYSFUNCTION. In: Erichsen ES, Iana LG, Faria RMDF, Santos SME, editores. Laboratory medicine for the clinician. Belo Horizonte: **Coopmed**; 2009. p.439-68.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. DE A. Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista brasileira de oto-rino-laringologia**, v. 73, n. 1, p. 123–127, 2007.

VORONOV E, CARMI Y, APTE RN. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. **Front Physiol.** 2014 Mar 28;5:114.

WANG, M. et al. Resveratrol inhibits TNF- α -induced inflammation to protect against renal ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 35, n. 5, p. e202000506, 2020.

WEI Q, XIAO X, FOGLE P, DONG Z. Changes in metabolic profiles during acute kidney injury and recovery following ischemia/reperfusion. **PLoS One.** 2014 Sep 5;9(9):e106647.

WEI S, BI J, YANG L, ZHANG J, WAN Y, CHEN X, WANG Y, WU Z, LV Y, WU R. Serum irisin levels are decreased in patients with sepsis, and exogenous irisin suppresses ferroptosis in the liver of septic mice. **Clin Transl Med.** 2020; 10(5): e173.

WU HH, HSIAO TY, CHIEN CT, LAI MK. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat. **J Biomed Sci.** 2009;16(1):1–10.

XING B, CHEN H, ZHANG M, ZHAO D, JIANG R, LIU X, ZHANG S. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. **Stroke.** 2008;39(8):2362–2369.

YAMASOWA, H. et al. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 312, n. 1, p. 153–159, 2004.

YANG Z, WEI J, WANG Y, DU Y, SONG S, LI J, SU Z, SHI Y, WU H. Irisin Ameliorates Renal Tubulointerstitial Fibrosis by Regulating the Smad4/ β -Catenin Pathway in Diabetic Mice. **Diabetes Metab Syndr Obes.** 2023 Jun 2;16:1577-1593.

ZACCHELLO, G., BONDIO, M., SAIA, S., LARGAIOLLI, G., VEDALDI, R. & RUBALTELLI, F.F. - Simple estimate of creatinine *clearance* from plasma creatinine in neonates. **Archives of Disease in Childhood**, 1982; 57(4): 297-300.

ZHANG R, JI J, ZHOU X, LI R. Irisin Pretreatment Protects Kidneys against Acute Kidney Injury Induced by Ischemia/Reperfusion via Upregulating the Expression of Uncoupling Protein 2. **Biomed Res Int.** 2020 Aug 31;2020:6537371.