

Ana Caroline Marreiros

**PAPEL DO NERVO RENAL NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
RENAL AGUDA EM RATOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina, pelo
programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2022

Ana Caroline Marreiros

**PAPEL DO NERVO RENAL NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
RENAL AGUDA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, pelo programa de Pós-Graduação em Farmacologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior

Coorientador: Dr. Maycon Igor de Oliveira Milanez

São Paulo

2022

Marreiros, Ana Caroline

PAPEL DO NERVO RENAL NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL AGUDA EM RATOS/Ana Caroline Marreiros. -São Paulo, 2022.

VIII, 55f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

Título em inglês: ROLE OF THE RENAL NERVE IN ACUTE RENAL ISCHEMIA AND REPERFUSION IN RATS

1. Fibras Aferentes Viscerais. 2. Neurônios Aferentes. 3. Sistema Nervoso Simpático. 4.Sistema Nervoso Autônomo. 5. Isquemia e Reperfusão. 6.Leucócitos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO ESCOLA PAULISTA
DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA**

Chefe do Departamento de Fisiologia: Profa. Dra. Maria do Carmo Pinho Franco

Chefe da disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória: Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior

Coordenador do programa de pós-graduação em Farmacologia: Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior

Ana Caroline Marreiros

**PAPEL DO NERVO RENAL NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
RENAL AGUDA EM RATOS**

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza

Professora Associada Nível III do Departamento de Fisiologia e Biofísica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

Professora do Departamento de Morfologia e Genética, Escola Paulista de
Medicina da Unifesp, São Paulo

Profa. Dra. Patrizia Reckziegel

Professora Adjunta Nível I A, junto ao Departamento de Farmacologia,
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

São Paulo

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela provisão de todas as minhas necessidades em todos os momentos da minha vida.

À minha família que sempre esteve ao meu lado e me deu suporte para que conseguisse realizar meus sonhos, em especial minha Mãe Conceição e minha irmã/mãe Jocyane, que sempre acreditaram em mim e fizeram de tudo para que eu tivesse as melhores condições de educação, ao meu Irmão James e Tio Mário (meus pais de coração), a minha irmã Janny, Jairon, Avô Jonas, tia Elvira, Gabriel, Arthur, Tia Delma, Jânio e Dona Paula, muito obrigada por todo amor, cuidado, dedicação e empenho que me deram, espero um dia poder retribuir um pouco de todo esforço.

Ao amor da minha vida, meu melhor amigo e companheiro de todas as horas Rafael, por todos esses anos que esteve ao meu lado, muito obrigada por seu amor e cuidado você é uma benção de Deus na minha vida.

Ao Prof. Ruy Ribeiro de Campos Júnior e ao Dr Maycon Igor de Oliveira Milanez, pela ótima orientação e inspiração. A Profa. Cássia Bergamaschi, Profa. Erika Nishi demais professores e alunos pela excelente recepção, acolhimento e incentivo.

Aos meus amigos de laboratório, Maycon, Rafael, Fernanda, Amanda, Nathalia, Madri, Gustavo, Yaslle, Alexandre e Stephanie, aos funcionários do laboratório de fisiologia cardiovascular Antônio, Toninho, Ayrton e Katia, muito obrigada pela maravilhosa convivência e todas as contribuições, ao laboratório da Profa. Cristiane Damas e ao Mestrando Diego pela ajuda e ótima receptividade.

Aos meus amigos, Vera, Maycon, Giuliane, Alzy, Vinícius, André, Paulo, Jéssica, Adriana, Janailton, Letícia, Dino, Andrea, Priscila, Pétala, Isabele, Marilene, Lili, Paulo Gabriel, agradeço por toda ajuda, torcida e orações.

À secretaria de pós graduação e as agências, CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Meus mais profundos agradecimentos!!!

Ana Caroline Marreiros

“Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

Resumo

Estudos anteriores demonstram que a isquemia e reperfusão (IR) pode ocorrer em algumas condições fisiopatológicas e procedimentos cirúrgicos. A lesão por IR é uma das principais causas de complicações clínicas, porém não há um tratamento padronizado. Os rins possuem vasta inervação aferente e eferente, foi sugerido em estudos anteriores que a atividade nervosa simpática renal está aumentada após a IR, alguns acreditam que a neuroinflamação possa contribuir para ativação simpática sustentada. O presente estudo teve como objetivo avaliar a participação das fibras aferentes renais na IR. Todos os experimentos foram aprovados pelo CEUA da UNIFESP (n:1567290421). Dois grupos de ratos Wistar (peso entre 150 e 180 gramas) foram utilizados divididos: 1) Grupo Controle (n =8); 2) Grupo deaferentado renal (n=6). A IR foi induzida pela obstrução total do fluxo sanguíneo para o rim esquerdo por um pinçamento da artéria renal durante 60 min, seguido de reperfusão por 120 min. Parâmetros cardiovasculares e de atividade nervosa vasomotora simpática renal (ANSr) e esplâncnica (ANSe) foram registrados, além de coleta de sangue da artéria femoral em dois tempos, antes da isquemia e após 120 min de reperfusão com objetivo de realizar a contagem total e diferencial das populações de leucócitos. A isquemia renal aumentou a ANSr (20 min: $0,07 \pm 0,04^* \Delta UA$), tal aumento pode ser explicado pelo acionamento das fibras aferentes uma vez que a retirada seletiva das aferências renais promoveu simpatoinibição para o território renal durante a IR (180 min: $-73 \pm 32^* \Delta \text{spikes/s}$), assim como queda da PAM e bradicardia mais expressiva que o grupo controle, porém não houve alterações na ANSe, reforçando a importância da ANSr para manutenção da PA. Quanto a contagem de leucócitos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, somente um aumento importante nas populações de neutrófilos e diminuição de linfócitos após a reperfusão em ambos os grupos, ou seja, a inflamação está presente em ambos os grupos, porém é necessário a aferência para passagem do estímulo. Os resultados mostram que aferentes renais são fundamentais para a resposta simpatoexcitatória preferencial para o território renal durante a IR aguda.

Abstract

Further studies and surgical procedures. Injury due to the main causes there is no treatment for complications, but for the main causes. The rinses have vast inferences in favor of previous studies that the renal sympathetic nerve activity is increased after IR, may contribute to the neuroinflammation being compatible with sympathetic neuroinflammation. The present study aimed to evaluate the participation of the afferent fibers in the RI. All experiments were approved by the CEUA of UNIFESP (n:1567290421). Two groups of Wistar rats (weight between 150 and 180 grams) were used: 1) Control Group (n =8); 2) Renal deafferentate group (n=6). IR was induced by total obstruction of blood flow to the left by renal darim clamping for 60 min, followed by reperfusion for 120 min. Cardiomyopathies and renal sympathetic vasomotor (rSNA) and splanchnic (sSNA) activity were recorded, in addition to femoral arterial blood collection in two, before ischemia and after 120 min of reperfusion in order to perform the total count and the timing of leukocyte populations. Renal ischemia increased rSNA (20 min: $0.07 \pm 0.04^* \Delta U A$), such increase can be explained by the activation of fibers during afferents, since the selective selection of renal afferents promoted sympathoinization to the renal territory at IR (180 min: $-73 \pm 32^* \Delta \text{spikes/s}$), as well as the decrease in MAP and more expressive bradycardia than the control, but there were no changes in sSNA, reinforcing the importance of rSNA for BP maintenance. As for the leukocyte count, no significant differences were observed between the groups, only an important difference in the populations of neutrophils and lymphocytes after reperfusion in both groups, that is, inflammation is in both groups, but it is necessary for both to have an afference for stimulus passage. The results of the preferential phase show that renal afferents are fundamental for the renal sympathoexcitatory response during the IR territory.

Sumário

1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	12
2.1 Geral:	12
2.2 Específicos:	12
3. METODOLOGIA	13
3.1 Animais	13
3.2 Desenho experimental.....	13
3.3 Deaferentação seletiva do nervo renal (Dax).....	14
3.4 Cateterização artério-venosa e registro da PA e FC.....	15
3.5 Isquemia e reperfusão.....	16
3.6 Análise da atividade nervosa simpática renal e esplâncnica	16
3.7 Eutanásia	17
3.8 Contagem total de leucócitos	17
3.9 Contagem diferencial dos leucócitos	18
3.10 Análise estatística	18
4- RESULTADOS	19
4.1 Valores basais hemodinâmicos e de atividade simpática renal e esplâncnica ...	19
4.2. Efeitos da isquemia e reperfusão sobre parâmetros hemodinâmicos e de atividade simpática renal e esplâncnica	21
4.3. Comparação entre os grupos controle e deaferentado (CTR vs DAX). Efeito da isquemia e reperfusão sobre parâmetros hemodinâmicos e de atividade nervosa renal e esplâncnica.	24
4.4. Efeito da isquemia e reperfusão sobre o número de leucócitos. Comparação entre os grupos controle e deaferentado (CTR vs Dax).....	30
5- DISCUSSÃO	33
6- CONCLUSÃO	39

1- INTRODUÇÃO

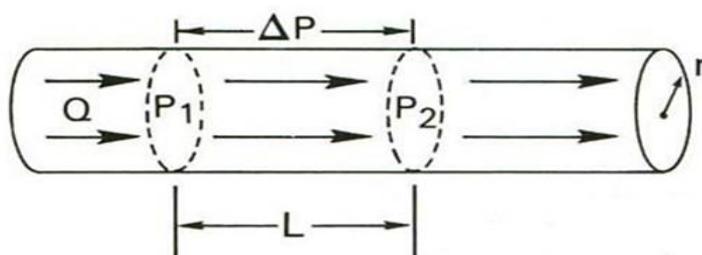
O organismo dos mamíferos é constituído por diversos sistemas, no qual cada um desempenha uma função vital para a sobrevivência. Tal como na natureza é necessário haver equilíbrio, no corpo humano não é diferente, as células, tecidos, órgãos e sistemas interagem entre si, com o objetivo principal de manter um “equilíbrio dinâmico”, pois são esforços contínuos que demandam gasto de energia e estão em constante movimento para garantir que o corpo mantenha seus valores dentro de intervalos que permitem a vida, tal mecanismo é denominado de homeostase. No entanto, quando por algum motivo há um insucesso nesse processo, podem ser desenvolvidos estados patológicos **(CANNON, Walter B.1929)**.

Um exemplo nítido de importância da homeostase e que foi observada primeiramente por Claude Bernard (1813-1878), é a regulação dos níveis de glicose no sangue. Parâmetro de vital importância para o funcionamento do organismo e principalmente do sistema nervoso central (SNC) que a tem como principal “combustível” e tem estoque limitado de glicose, dependendo, portanto, de seu fornecimento constante. Outro exemplo de parâmetro importante para a manutenção da homeostase é o controle da pressão arterial (PA), fundamental para perfusão correta de órgãos e tecidos e conseqüentemente é controlada por diferentes mecanismos de regulação, como por exemplo, os mecanorreceptores e quimiorreceptores localizados em diferentes órgãos, tais receptores enviam projeções ao SNC que em conjunto com mecanismos hormonais, renais e locais atuam de forma orquestrada a fim de corrigi-la sempre que necessário **(BILLMAN, 2020)**.

A primeira medição experimental da PA foi em 1711 pelo pastor Stephen Halles, na Inglaterra, por meio de uma cânula inserida na artéria de um cavalo, ao passo que tal cânula se acoplava à uma coluna de vidro (**KALEHOFF; OPARIL, 2020**).

A PA pode ser definida como a força exercida pelo sangue contra a parede dos vasos, determinada principalmente pela resistência vascular periférica (RVP) e débito cardíaco (DC). Sendo assim, o desempenho ventricular, juntamente com o raio do vaso, sobretudo, das arteríolas, serão determinantes cruciais para os valores de PA e conseqüentemente da perfusão tecidual. De fato, de acordo com a fórmula descrita pela lei de Poiseuille, o raio é um parâmetro elevado a quarta potência e inversamente proporcional a variação de pressão, logo, pequenas alterações no diâmetro vascular terão repercussões importantes sobre os valores de PA e fluxo sanguíneo (**Binda et al., 2013; SUTERA, S & Skalak, R. 2003**).

Lei de Poiseuille



$$Q = \frac{\Delta P \ r^4 \ \pi}{\eta L \ 8}$$

Figura 1. Diagrama representativo das variáveis da Lei de Poiseuille. A representação aponta que para a ocorrência de escoamento é crucial a existência de um gradiente pressórico entre as extremidades do tubo. Q, fluxo; ΔP , variação de pressão; η ,

viscosidade; L, comprimido do tudo; π , constante; modificado de **(AMIRHESSAM, 2015)**.

O SNC é um importante controlador da função cardiovascular momento a momento, destacando a ação do sistema nervoso simpático que tem grande influência sobre a PA, uma vez que suas fibras simpáticas inervam o músculo liso vascular e possuem a capacidade de alterar abruptamente o estado contrátil desses miócitos; logo, evocando modificações imediatas sobre a RVP. Tal fenômeno miogênico vascular causado pelas descargas simpáticas contínuas pode ser denominado como tônus vasomotor simpático **(WYSS; CARLSON, 1999)**.

A atividade vasomotora simpática é regulada, sobretudo, por cinco grupos de neurônios do SNC denominados de pré-motores do simpático, que são as seguintes regiões encefálicas: região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), região rostroventromedial do bulbo (RVMM), núcleos caudais da rafe, grupo de células A5 na ponte e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), destes o RVLM e PVN parecem modular o tono vasomotor simpático de forma mais expressiva, entretanto, é a interação constante entre essas regiões que permitem ajustes cardiovasculares específicos **(CAMPOS; CARILLO; OLIVEIRA-SALES; SILVA *et al.*, 2008; STRACK; SAWYER; HUGHES; PLATT *et al.*, 1989)**. Esses neurônios projetam-se diretamente para a medula espinal, fazendo sinapse com os neurônios pré-ganglionares do simpático localizados sobretudo na coluna intermediolateral (IML) que por sua vez, realizam sinapses com os neurônios pós-ganglionares do simpático localizados em gânglios, ou diretamente à medula da adrenal, finalmente, sendo os efetores nos órgãos alvo,

como coração, vasos sanguíneos e rins **(CAMPOS; CARILLO; OLIVEIRA-SALES; SILVA *et al.*, 2008)**.

As fibras simpáticas renais controlam a função renal, uma vez que influenciam na taxa de filtração glomerular, liberação de renina e conseqüentemente na formação da angiotensina II, que também irá contribuir para regular a PA. Entretanto, caso a atividade vasomotora simpática esteja exacerbada poderá haver lesão renal ou em outros órgãos **(JOHNS; KOPP; DIBONA, 2011)**. A atividade nervosa simpática sofre grande influência da atividade sensorial, ou seja, pode aumentar ou diminuir em resposta a estímulos enviados pelos aferentes distribuídos pelo corpo, como os barorreceptores e quimiorreceptores, tanto ativando ou inibindo o tônus vasomotor simpático momento a momento e informando o status do organismo. Em situações de estresse, por exemplo, esses neurônios sensoriais realizam a transdução do sinal para o núcleo do núcleo do trato solitário (NTS) e a partir dessa região há projeções para as áreas cardiovasculares do SNC já citadas, e assim resultando no controle da atividade dos neurônios pré-motores do simpáticos **(ZANUTTO; VALENTINUZZI; SEGURA, 2010)**.

Em 1938, Corneille Heymans recebeu o Nobel de Fisiologia pelo seu aprofundamento no estudo de uma espécie de receptores que eram acionados pelo estiramento vascular, denominados de barorreceptores. Tais receptores contribuem diretamente para o controle momento a momento da PA no organismo, portanto, são elementos vitais para a homeostasia. Os barorreceptores estão localizados, sobretudo, no seio carotídeo e no arco aórtico, sendo acionados, por exemplo, em situações de choque hipovolêmico; os barorreceptores percebem a variação pressórica indiretamente, por meio do

grau de estiramento da estrutura, sendo menos deformados. Por intermédio de mecanismos de feedback neural, haverá aumento da atividade vasomotora simpática e culminará no aumento da PA, portanto, haverá a manutenção da perfusão e funcionalidade dos tecidos. **(ACCORSI-MENDONÇA; MACHADO, 2013; ESTAÑOL; PORRAS-BETANCOURT; PADILLA-LEYVA; SENTÍES-MADRID, 2011)**. Vale destacar que os barorreceptores arteriais não são importantes somente em situações de emergência, mas também atuam momento a momento, mantendo os níveis de PA, corrigindo-a por ações ditadas pelo sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático **(FISHER; KIM; YOUNG; FADEL, 2010)**.

Adicionalmente, Corneille Heymans também descobriu os quimiorreceptores sinoaórticos; sensíveis a variações de gases sanguíneos, hoje é sabido que existem também os quimiorreceptores centrais, localizados, sobretudo, na porção ventrolateral do bulbo. Os quimiorreceptores periféricos são responsáveis por detectar a pressão parcial de oxigênio, gás carbônico e pH sanguíneo. Assim como os barorreceptores, os quimiorreceptores também enviam os sinais para o SNC, mais precisamente ao NTS, que, de acordo com a necessidade, evocará sinalizações para o controle do tônus vasomotor simpático, do tônus vagal e respiração **(ACCORSI-MENDONÇA; MACHADO, 2013; DE CASTRO, 2009)**.

Os barorreceptores e quimiorreceptores também estão presentes em outras estruturas, como é o caso dos receptores cardiopulmonares, localizados nos átrios, ventrículos e artéria pulmonar. Tais sensores também são fundamentais uma vez que são receptores de baixa pressão e detectam os níveis de enchimento do coração promovendo reflexamente ajustes vasculares,

cardíacos, renais e sobre o volume extracelular (**LONGHURST, 1984**). Além dos mecanismos supracitados, outras classes de aferentes também participam da regulação cardiovascular e renal, como, os aferentes renais.

Além da inervação simpática, os rins possuem receptores sensoriais mecânicos intrapélvicos que são acionados pela alteração da pressão local, já os quimiorreceptores presentes na pelve renal são sensíveis a alterações da composição química da urina como a concentração de cloreto de sódio, por exemplo. Ao contrário da vasta distribuição nervosa simpática pelo rim, segundo Marfurt, a inervação sensorial localiza-se na artéria e veia renais, mas é majoritária na pelve renal. No córtex renal há poucas fibras e na medula, aparentemente não há fibras sensoriais (**KOPP, 2015; MARFURT; ECHTENKAMP, 1991**). A localização dessas fibras foi confirmada por testes imunohistoquímicos, no qual constatou-se a presença do gene da calcitonina (CGRP) e substância P na região pélvica, dois agentes importantes envolvidos no envio de informações sensoriais ao SNC em mamíferos (**KOPP, 2015**).

Evidências apontam que os receptores denominados transientes vanilóides do tipo 1 (TRPV1) são um dos maiores sensores e reguladores da homeostase cardiovascular (**HOLLIS; WANG, 2013**). Além de serem nefroprotetores e cardioprotetores, tais receptores estão presentes nas aferências renais. Em doses baixas, podem ser ativados por capsaicina e inativados quando se administra doses elevadas, como é o caso da deaferentação renal por capsaicina, técnica utilizada para deaferentar seletivamente os rins e investigar como as fibras aferentes se comportam em estados fisiológicos e fisiopatológicos, como por exemplo, em animais com hipertensão renovascular, condição amplamente estudada por meio do modelo

2 rins, 1 clipe (2R1C) desenvolvido por Goldblatt e colaboradores (**HOLLIS; WANG, 2013; KOPP, 2015; NISHI; BERGAMASCHI; CAMPOS, 2015; VEIGA; MILANEZ; FERREIRA; LOPES et al., 2020**). O modelo de Goldblatt trata dos efeitos da isquemia parcial renal; no presente estudo investigamos o papel dos aferentes renais durante a isquemia total e reperfusão renal aguda sobre a atividade vasomotora simpática renal em ratos normotensos.

A isquemia e reperfusão (IR) é uma condição que permeia uma série de condições fisiopatológicas e procedimentos cirúrgicos, como: infarto agudo do miocárdio, AVC, trombozes, além de transplante de órgãos, cirurgias vasculares e circulação extracorpórea (**DORWEILER; PRUEFER; ANDRASI; MAKSAN et al., 2007; FERNÁNDEZ; SÁNCHEZ-TARJUELO; CRAVEDI; OCHANDO et al., 2020**).

Logo, a lesão por isquemia e reperfusão (IR) intriga e sempre intrigou vários cientistas, como Jennings que por volta de 1960 foi um dos primeiros a identificar a existência da lesão tecidual por reperfusão ao investigar IR coronariana em cães, concluindo que a reperfusão piora, paradoxalmente, os danos causados pela isquemia em si (**JENNINGS; SOMMERS; SMYTH; FLACK et al., 1960; KALOGERIS; BAINES; KRENZ; KORTHUIS, 2016**). Seus experimentos partiram de um histórico de investigações sobre o infarto agudo do miocárdio até então não correlacionados com trombos arteriais, desse modo tinha como objetivo inicial descobrir porque os miócitos morriam quando os tornava isquêmicos. Para tanto, foi pioneiro na investigação experimental da lesão por IR realizando isquemia da coronária de cães por 5 min à 2h e, posteriormente, reperfundindo com sangue arterial na intenção de tornar a área saudável novamente. Foi observado, por outro lado, piora do quadro após 120

min da reperfusão em que se pôde verificar alterações morfológicas e funcionais dos miócitos, curiosamente todos os miócitos sobreviveram se a isquemia fosse ≤ 15 min (**JENNINGS, 2013; JENNINGS; CROUT; SMETTERS, 1957; KLONER; GANOTE; WHALEN; JENNINGS, 1974; KLONER; REIMER; JENNINGS, 1976**)

A fisiopatologia da lesão por IR envolve vários fatores sequenciais e/ou simultâneo: hipoxia tecidual, estresse metabólico, ativação do sistema imune com mobilização de leucócitos e ativação do sistema complemento, por fim, se progredir, há morte celular. Assim, tudo inicia com baixo nível de oxigênio tecidual comprometendo os níveis de adenosina trifosfato (ATPs) nas mitocôndrias, mudando, assim, para metabolismo anaeróbico, aumentando espécies reativas de oxigênio (ROS), causando toxicidade para o tecido afetado e por vez para outros órgãos. A etapa final da lesão por IR é a morte celular que pode ser regulada por apoptose, moléculas como as caspases e citocinas pró inflamatórias (TNF-ALFA) estão envolvidas nesse processo de mediação da apoptose celular. As células tubulares renais são as primeiras a sofrer por apoptose durante a lesão por IR (**FERNÁNDEZ; SÁNCHEZ-TARJUELO; CRAVEDI; OCHANDO *et al.*, 2020**).

Outra forma de morte celular é a necrose tecidual, em que a restauração do fluxo sanguíneo, ou seja reperfusão, causa danos à microcirculação, mais especificamente às células endoteliais que sofrem tanto na hipoxia quanto na reoxigenação. Logo depois da reperfusão se pode observar várias alterações como: elevação das células endoteliais por acúmulo de neutrófilos, alterações na produção de metabólitos reativos de oxigênio e óxido nítrico por essas células e perda de vesículas pinocitóticas, as consequências pela lesão de IR

extrapolam para outros territórios, os mais comuns são sistema cardiovascular e pulmonar, por exemplo, podendo até desenvolver síndrome da resposta inflamatória sistêmica **(CARDEN; GRANGER, 2000)**. Ademais, a lesão renal aguda (LRA) envolve desde aspectos metabólicos e neuro-humorais até lesão por isquemia e reperfusão. Esse último é observado em diversas situações cirúrgicas como, por exemplo, cirurgias cardíacas em que um processo de isquemia renal pode levar a LRA que por sua vez está associada a grande morbimortalidade **(KRAMER; HERRON; GROOM; BROWN, 2015)**. Pesquisas mostram forte correlação entre a insuficiência renal aguda (IRA) e altos índices de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados, além de ser um diagnóstico secundário bem prevalente após internações **(XUE; DANIELS; STAR; KIMMEL *et al.*, 2006)**

O modelo de IR é amplamente aplicado na prática experimental com o intuito de se avaliar as repercussões intrarrenais e sistêmicas deflagradas pela ausência momentânea de fluxo sanguíneo renal **(FAUCHER; ALARCAN; MARQUET; BARIN-LE GUELLEC, 2020)**. O método de IR consiste em uma obstrução total do fluxo sanguíneo para o órgão por um pinçamento da artéria renal durante 30 a 60 min, seguido de reperfusão **(FUJII; KURATA; TAKAOKA; MURAOKA *et al.*, 2003; LAMBERT; SCHLAICH, 2017)**.

Visto que os rins possuem vasta inervação aferente e eferente, estudos sugerem que a atividade nervosa simpática renal está aumentada após a IR, o que corrobora com o papel fundamental do simpático na regulação da função renal **(LAMBERT; SCHLAICH, 2017)**. Estudos prévios apontam que após a reperfusão renal há um aumento, entre outras substâncias, nas concentrações de noradrenalina e expressão de tirosina hidroxilase renal, podendo permanecer

elevadas mesmo após 24 horas em ratos (FUJII; KURATA; TAKAOKA; MURAOKA *et al.*, 2003; WU; CHIEN; MA; CHEN, 2009). Outro dado que corrobora quanto a forte correlação entre a atividade simpática e IR, o uso de simpatolíticos em cirurgias eletivas preveniu a incidência de LRA causada pela IR (SOLEZ; IDEURA; SILVIA; HAMILTON *et al.*, 1980).

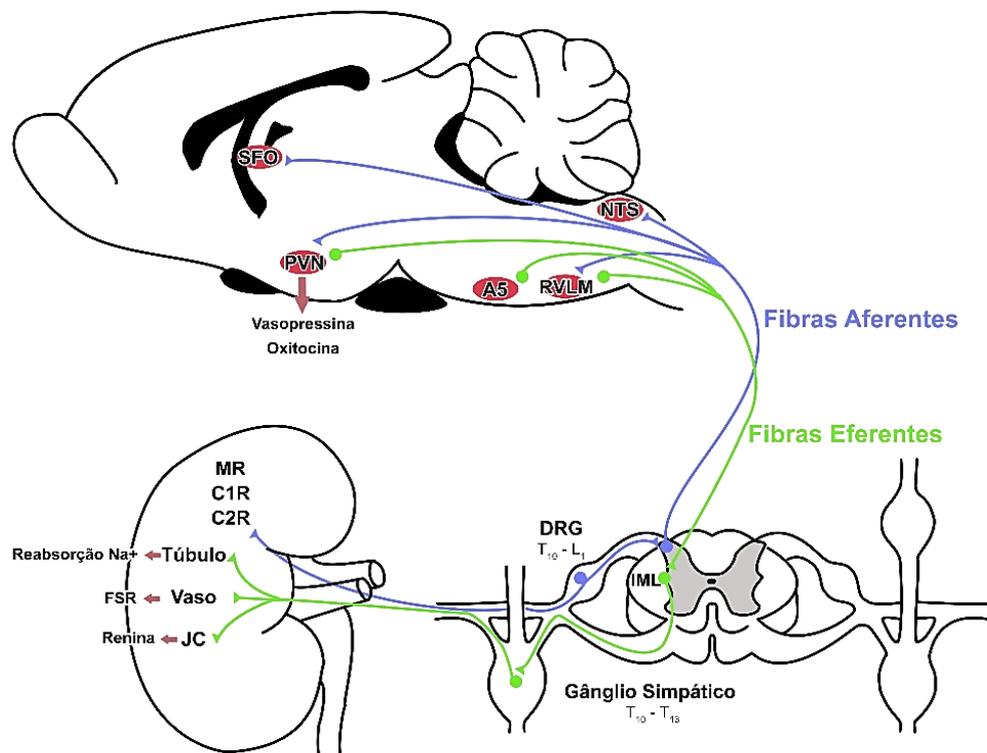


Figura 2. Representação esquemática das vias de comunicação entre os rins e sistema nervoso central (SNC). Mecanorreceptores (MR) e quimiorreceptores (C1R e C2R) renais detectam alterações nos rins, como as que são causadas por inflamação decorrente da lesão por IR renal e enviam informações ao SNC (vias azuis). Os neurônios de primeira ordem estão localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) e se projetam ao corno posterior da medula espinal, neste local fazem sinapse com neurônios que se projetam para núcleos do SNC envolvidos com o controle cardiovascular, como órgão subfornical (SFO) e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Os neurônios pré-motores do simpático (PVN e RVLM) se projetam (vias verdes) para a coluna intermediolateral (IML) que enviam fibras pré-ganglionares aos gânglios simpáticos. Destes, fibras pós-ganglionares se projetam para os rins e inervam túbulos, vasos e aparelho justaglomerular (JC) renais, que quando ativados promovem o aumento da reabsorção de sódio, liberação de renina pelas células justaglomerulares no rim. Modificado de (NISHI; BERGAMASCHI; CAMPOS, 2015).

Recentemente observou-se que muito cedo durante a IR renal já se tem aumento da atividade vasomotora simpática, juntamente com a disponibilidade reduzida de óxido nítrico e aumento de angiotensina II circulante; tais fatores contribuem para a deflagração de expressivas lesões renais **(LAMBERT; SCHLAICH, 2017)**. Além disso, um estudo anterior reportou aumento da atividade do nervo simpático cardíaco, observada por meio do registro direto da atividade nervosa durante a IR cardíaca em ratos **(USTINOVA; SCHULTZ, 1996)**.

Ademais, foi verificado que na IR renal há acionamento dos aferentes renais, causando aumento da atividade neural em neurônios da RVLM, além de neuroinflamação que contribui para ativação sustentada do sistema nervoso simpático **(GRISK, 2020)**. Desta forma, é fundamental o estudo dos aferentes renais para elucidar o mecanismo pelo qual há piora da lesão renal aguda após a reperfusão, pois embora haja outras vias, como a hormonal, é bem estabelecido que o aumento sustentado da atividade simpática para os rins agrava a função renal. Para tanto, no presente estudo foi investigado a ANS para os territórios esplâncnico e renal em animais controles e deaferentados renais durante a IR, desse modo analisamos o papel dos aferentes renais no mecanismo de ativação simpática renal após IR. Além disso, verificamos possível inflamação sistêmica por meio da contagem total e diferencial de leucócitos no sangue antes da isquemia e após reperfusão e a influência da remoção seletiva das fibras sensoriais renais sobre tal fenômeno.

2- OBJETIVOS

2.1 Geral:

O presente estudo teve por objetivo avaliar como a IR renal aguda influencia na ativação vasomotora simpática renal e esplâncnica em animais controles e submetidos à deaferentação renal (Dax).

2.2 Específicos:

- Avaliar as respostas cardiovasculares (PAM e FC) causadas pela IR renal em animais controles (CTR) e Dax;
- Avaliar as respostas vasomotoras simpáticas para o território renal e esplâncnico provocadas pela IR renal em animais controles e Dax;
- Realizar a quantificação total e diferencial dos leucócitos antes e após a IR renal em animais controles e Dax.

3- METODOLOGIA

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso entre 150 e 180 gramas, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética institucional (protocolo 1567290421)

Os animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória em salas especiais aclimatizadas (22 ± 1 °C) e com umidade relativa do ar de $60\pm 5\%$. Além disso, tais salas também possuíam ciclo claro/escuro de 12 horas (das 7 às 19h) e foi oferecido ração padrão e água *ad libitum*. Foram mantidos cinco animais em cada caixa.

Os animais foram distribuídos em dois grupos independentes, controle e Dax e os seguintes protocolos experimentais foram aplicados:

3.2 Desenho experimental

3.2.1 Análise da influência exercida pelos aferentes renais sobre a ativação simpática renal e esplâncnica e parâmetros cardiovasculares causada pela isquemia seguida de reperfusão renal em ratos controles e Dax.

Grupo CTR ($n=8$): avaliação das alterações da ANSr, ANSe, PA e FC em animais controles submetidos à IR renal.

Grupo Dax ($n=6$): avaliação das alterações da ANSr, ANSe, PA e FC em animais deaferentados renais submetidos à IR renal.

Não houve óbitos de animais durante os experimentos.

A Figura 3 representa esquematicamente o protocolo experimental descrito neste tópico.

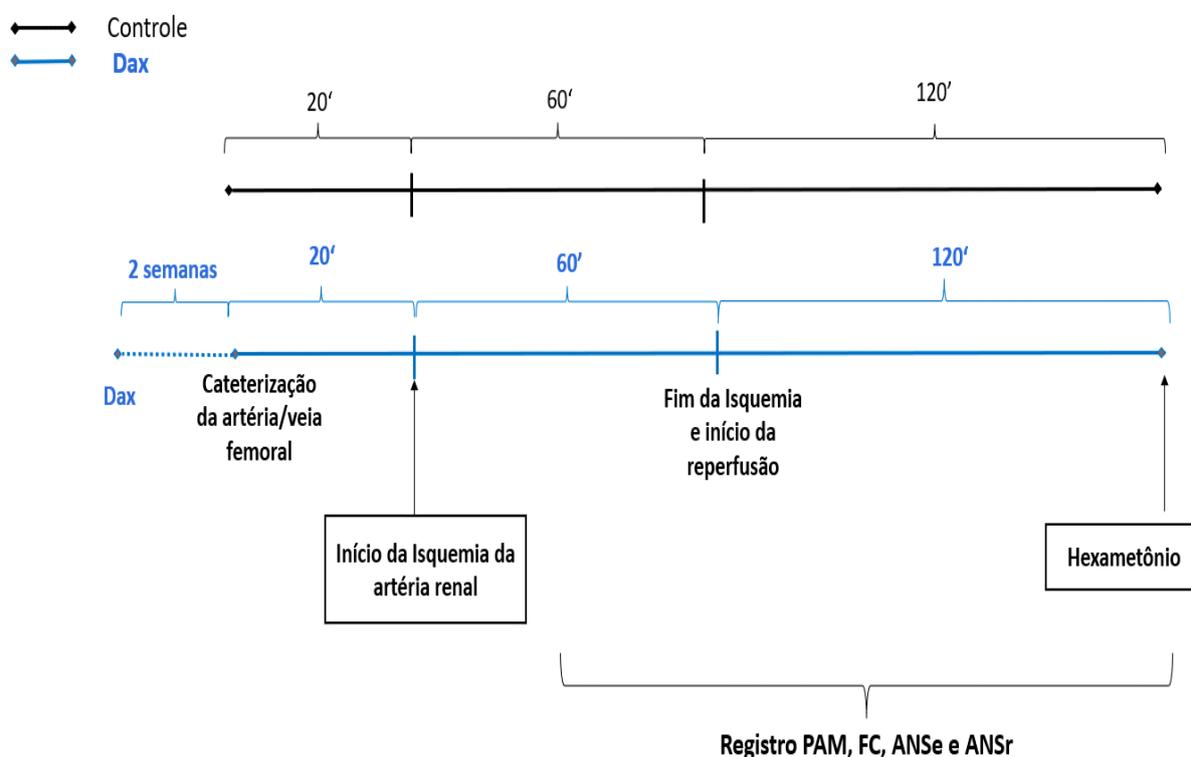


Figura 3. Diagrama indicativo dos experimentos descritos nos tópicos 3.2.1. PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; ANSr: atividade do nervo simpático renal; ANSe: atividade do nervo simpático esplâncnico.

3.3 Deaferentação seletiva do nervo renal (Dax)

Duas semanas antes dos experimentos para induzir IR renal aguda foi realizada a deaferentação renal do rim esquerdo, que foi submetido posteriormente à IR. Os animais foram anestesiados com dose intraperitoneal de Cetamina (80-100 mg/kg Vetbrands, Brasil) e Xilazina (10 mg/kg- vetbrands,

Brasil), em seguida, o rim esquerdo foi exposto retroperitonealmente e a artéria e veia renais cuidadosamente isolados a partir de tecido conjuntivo. A artéria renal foi coberta com um algodão embebido em solução capsaicina 33 mM (diluída em etanol a 0,1% e Tween 80 a 0,1%) por 15 minutos. Imediatamente ao término da cirurgia foi administrado analgésico meloxicam (1 mg/kg, v.o.) e o animal colocado em uma caixa aquecida (fonte de aquecimento) em um local tranquilo e mantido sob monitoramento constante até sua total recuperação, ou seja, até recuperar os seus movimentos normais. O analgésico Meloxicam (1mg/kg, IP, uma vez ao dia) foi administrado por mais 2 dias consecutivos após a aplicação do procedimento cirúrgico. O animal foi acompanhado duas vezes por dia nas 48 horas subsequentes ao procedimento cirúrgico para observação de sinais indicativos de desconforto como utilização do Rat Grimace Scale, presença de diarreia, desidratação, perda de peso ou diminuição na ingesta alimentar que comprometam seu bem-estar, permitindo rápida intervenção, se necessário (VEIGA; MILANEZ; FERREIRA; LOPES *et al.*, 2020).

3.4 Cateterização artério-venosa e registro da PA e FC

Duas semanas após o procedimento de deaferentação, todos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, ip) e posteriormente traqueostomizados. A veia femoral foi cateterizada com tubo de polietileno PE-10, que foram conectados a PE-50 para administração de anestésico adicional (10mg·kg⁻¹·h). A cateterização da artéria femoral também foi feita para o registro da FC e PA.

A PAM e FC foram registradas nos animais anestesiados, após a cateterização, por meio de uma placa analógico-digital PowerLab (PowerLab –

ADInstruments, Austrália). Os valores de PAM e FC foram obtidos a partir do sinal de pressão arterial pulsátil. A frequência de aquisição foi de 4kHz.

3.5 Isquemia e reperfusão

A artéria renal esquerda, previamente isolada, foi ocluída pela colocação de um clipe, e a isquemia total foi mantida por 60 min (GRISK, 2020). Durante o período de isquemia foi realizado simultaneamente o registro da atividade simpática renal e esplâncnica (ANSr e ANSe, respectivamente), PA e FC. Ao final de 60 minutos o fluxo da artéria renal era liberado e o rim reperfundido; tais parâmetros foram avaliados por mais 120 min após a reperfusão.

3.6 Análise da atividade nervosa simpática renal e esplâncnica

Para registro da ANSr e ANSe, os animais foram lentamente anestesiados com tiopental sódico conforme já descrito no tópico 3.4 e posicionados em decúbito ventral em aparelho estereotáxico (David Kopf, USA); uma incisura retroperitoneal esquerda foi feita para expor o nervo simpático renal e esplâncnico. Os nervos foram localizados, dissecados e posicionado em um eletrodo bipolar de prata sendo mantido imerso em óleo mineral durante todo o experimento. A ANSr (rim clipado) e ANSe foram caracterizadas com auxílio do osciloscópio (Tektronix TDS 220, USA) e um amplificador de áudio (Neurolog, UK). O sinal dos nervos foi amplificado 20,000 vezes e filtrado na faixa de frequência de 100 a 1000 Hz (Neurolog, UK), então, a atividade simpática foi retificada e integrada. Todos os registros foram adquiridos em frequência de amostragem mínima de 4 kHz.

Ao final dos experimentos, o nível de ruído de fundo das atividades nervosas foi determinado pela administração i.v. do bloqueador ganglionar hexametônio (30 mg/kg, Sigma-Aldrich Co, EUA). Além disso, a ANSr e ANSe foram analisados posteriormente por meio de um programa digital (Spike Histogram – PowerLab – ADInstruments, Austrália) que permite a discriminação e contagem dos potenciais nervosos (*spikes/s*), a partir do ruído de fundo. Dessa forma, somente foram quantificados os potenciais acima do ruído de fundo do sistema de registro (NISHI; BERGAMASCHI; OLIVEIRA-SALES; SIMON *et al.*, 2013; OLIVEIRA-SALES; NISHI; CARILLO; BOIM *et al.*, 2009). Além disso, quando apropriado, a atividade nervosa foi avaliada em unidades arbitrárias a partir da análise da integral da atividade simpática para valores positivos com time-reset de 200 ms (UA) e expressa como variação do valor basal imediatamente antes de cada teste (Δ).

3.7 Eutanásia

Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (300 mg/Kg) foram eutanasiados com a administração i.v. de 0,4 ml de cloreto de potássio (5%) (Sigma-Aldrich Co, EUA).

3.8 Contagem total de leucócitos

Para a realização deste protocolo experimental, foi coletado sangue antes e após a IR renal de cada animal. Imediatamente após a coleta do sangue, pipetou-se 10 μ l de sangue total e adicionou-se ao tubo que continha 190 μ l do líquido de Türk, a diluição final de 1:20 foi homogeneizada cuidadosamente e em seguida a câmara de Neubauer foi preenchida com 10 μ l da diluição. A contagem

foi realizada nos quatro quadrantes superiores e inferiores, posteriormente realizada a média entre as duas contagens, por fim o valor encontrado foi colocado na fórmula: $\text{Leucóitos/mm}^3 = (\text{leucóitos contados} \times 20 \times 10) \div 4$.

3.9 Contagem diferencial dos leucócitos

Com auxílio de uma pipeta foi retirado 0,05 mL do sangue total coletado e depositado em uma lâmina de microscopia devidamente identificada, em seguida o sangue foi estendido em um ângulo de 45° por toda a lâmina. O esfregaço sanguíneo ficou em repouso para secar completamente e após 24 h foi realizada coloração com corantes panópticos e após secar foi iniciada a contagem diferencial das células no microscópio com objetiva 40x, distinguindo entre linfócito, neutrófilo e monócito.

3.10 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 7®. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de análise de variância (ANOVA de 1 ou 2 vias seguido pelo pós-teste de Fisher). Ademais, quando necessário, foi utilizado teste t de *student* pareado ou não pareado. Apenas foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$ (*).

4- RESULTADOS

4.1 Valores basais hemodinâmicos e de atividade simpática renal e esplâncnica

4.1.1 Valores hemodinâmicos basais

De acordo com a Figura 4, verifica-se que os valores basais de PAM e de FC no grupo controle (CTR) e deaferentado (Dax) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre grupos.

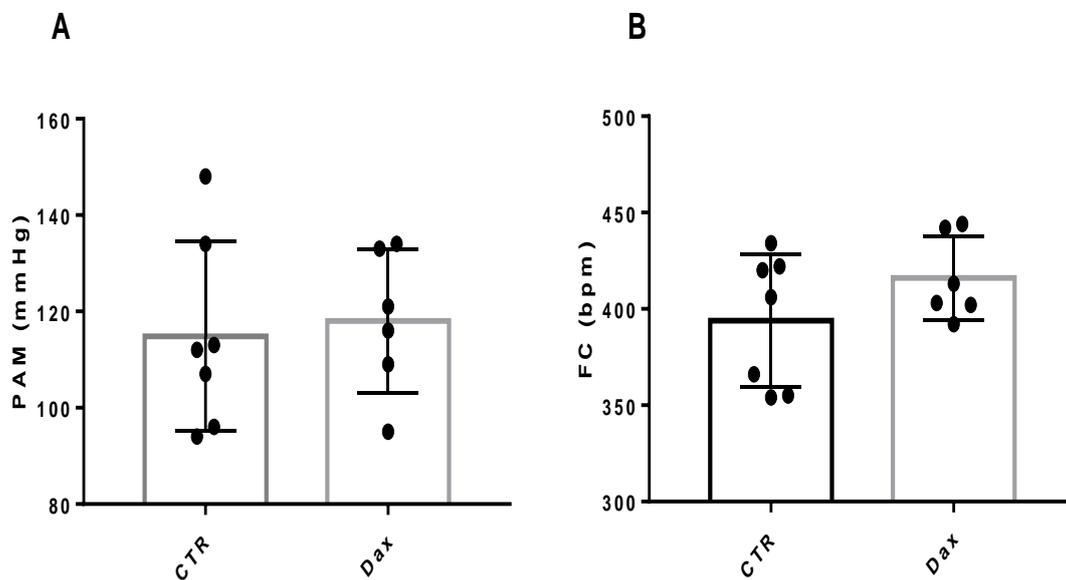


Figura 4. A: Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) do grupo controle (CTR) e deaferentado (Dax). Os valores são expressos em média \pm EPM. Teste t de student não-pareado.

4.1.2 Valores basais de frequência de atividade vasomotora nervosa simpática renal e esplâncnica (spikes/s)

Como se pode observar na Figura 5, não houve diferença estatística significativa nos valores basais da ANSe e ANSr em relação aos spikes/s do grupo Dax ao comparar com o grupo CTR.

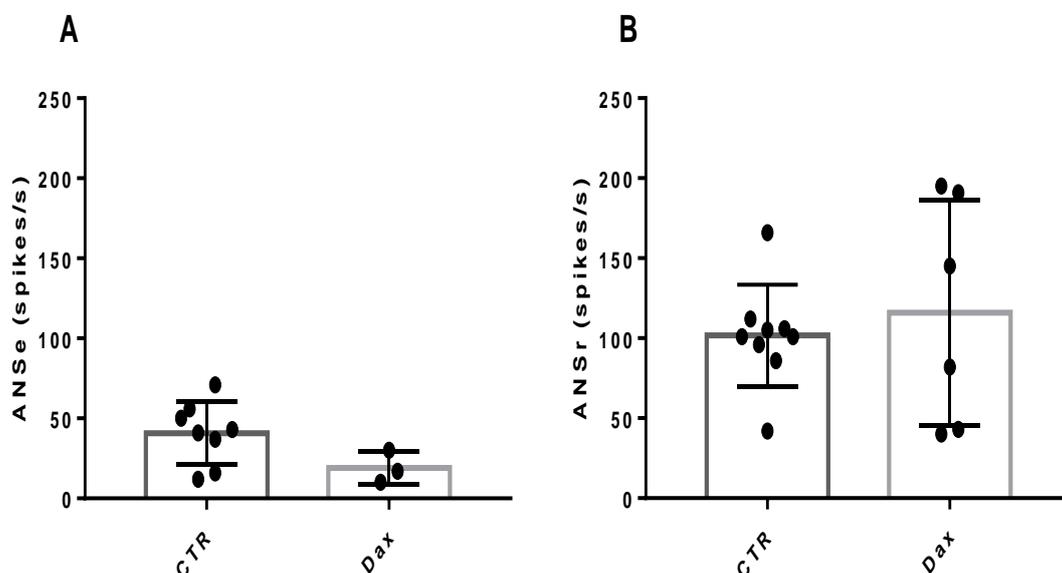


Figura 5. A: Valores basais em spikes/s da atividade do nervo simpático esplâncnico (ANSe) e B: renal (ANSr) no grupo controle (CTR) e deaferentado (Dax). Os valores são expressos em média \pm EPM. Teste t de student não-pareado.

4.1.3 Valores de amplitude da atividade nervosa simpática renal e esplâncnica basais (UA)

Da mesma forma que o observado em relação aos spikes/s registrada nos nervos estudados, a amplitude da ANSe e ANSr não apresentou diferenças estatisticamente significantes com relação ao grupo Dax quando comparado ao

grupo CTR. É importante notar que a amplitude da atividade simpática basal esplâncnica é menor do que a registrada no nervo renal.

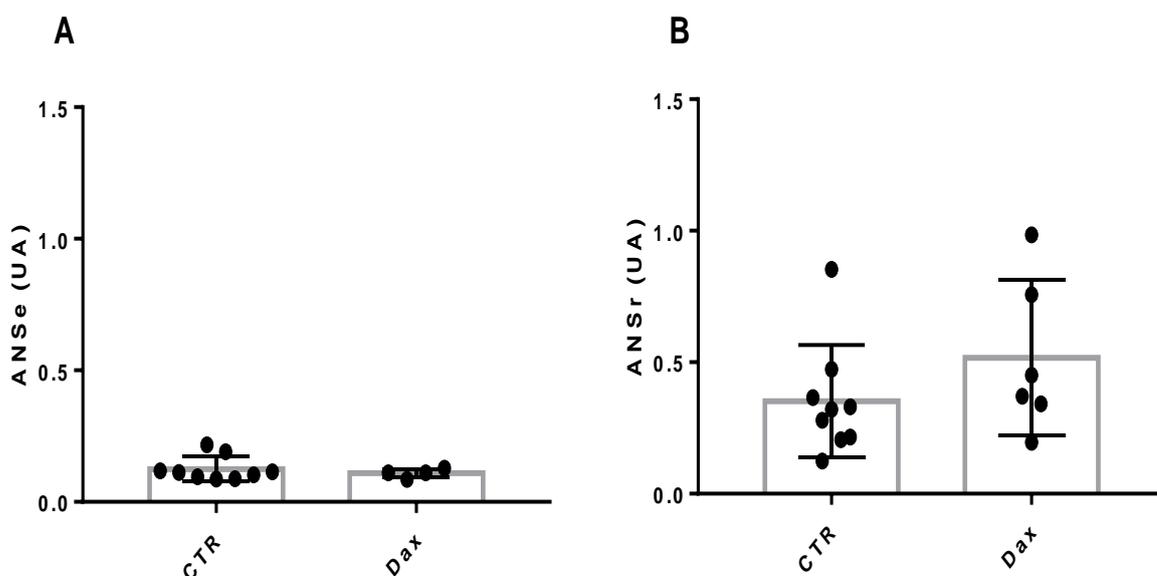


Figura 6. A: Valores basais em amplitude (UA) da atividade do nervo simpático esplâncnico (ANSe) e B: renal (ANSr) no grupo controle (CTR) e deaferentado (Dax). Os valores são expressos em média \pm EPM. Teste t de student não-pareado.

4.2. Efeitos da isquemia e reperfusão sobre parâmetros hemodinâmicos e de atividade simpática renal e esplâncnica

4.2.1 Efeitos da isquemia e reperfusão sobre parâmetros hemodinâmicos e de atividade simpática renal e esplâncnica em animais controle (CTR).

Houve redução significativa da PAM no grupo controle-isquemia e reperfusão renal (CTR) (180 min: $-36 \pm 11^*$ Δ mmHg), quando comparado ao valor basal. Ademais, foi observada também redução significativa da FC durante a reperfusão renal (80 min: $-35 \pm 7^*$; 90 min: $-49 \pm 7^*$; 100 min: $-48 \pm 10^*$; 120

min: $-63 \pm 14^*$; 140 min: $-60 \pm 16^*$; 160 min: $-54 \pm 25^*$; 180 min: $-76 \pm 18^*$ Δ bpm)
(Figura 7).

Além disso, observou-se aumento na amplitude na ANSr (20 min: $0,07 \pm 0,04^*$; 40 min: $20 \pm 9^*$ Δ UA) durante o período de isquemia, porém, sem alterações no número de spikes/s. No que diz respeito a ANSe, não houve alterações estatisticamente significantes, como representado na Figura 8.

No traçado típico demonstrado na figura 9 é possível observar simpatoexcitação durante a isquemia para o território renal nos animais CTR.

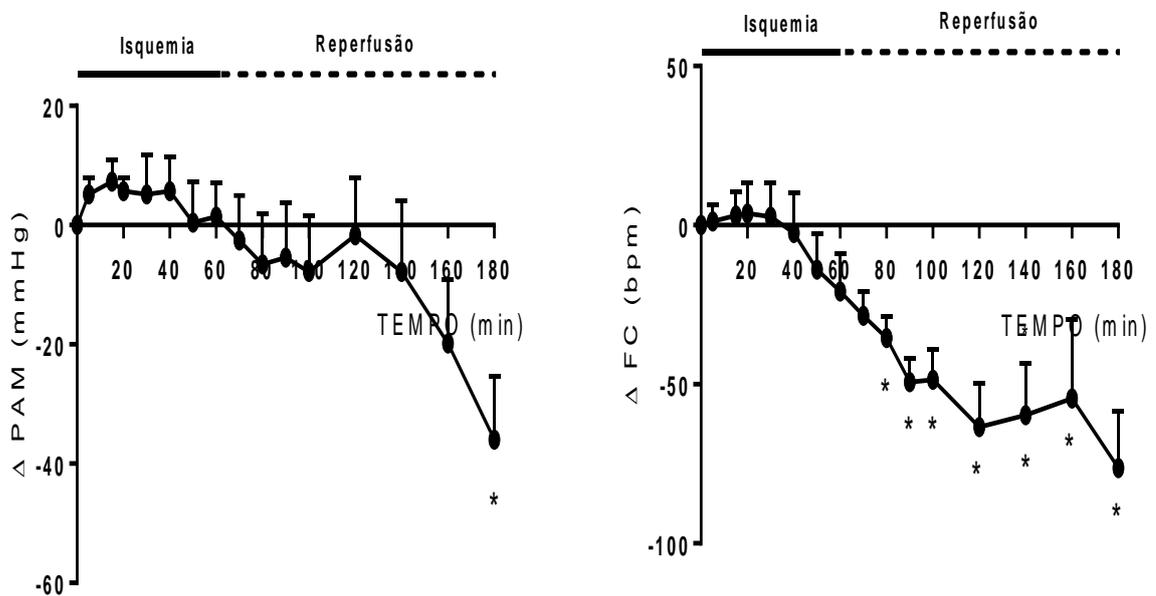


Figura 7. Efeitos da isquemia e reperusão renal sobre a frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) no grupo controle. Valores expressos em média \pm EPM $*p < 0,05$ (Anova de 1 via seguido pelo pós teste de Fisher LSD).

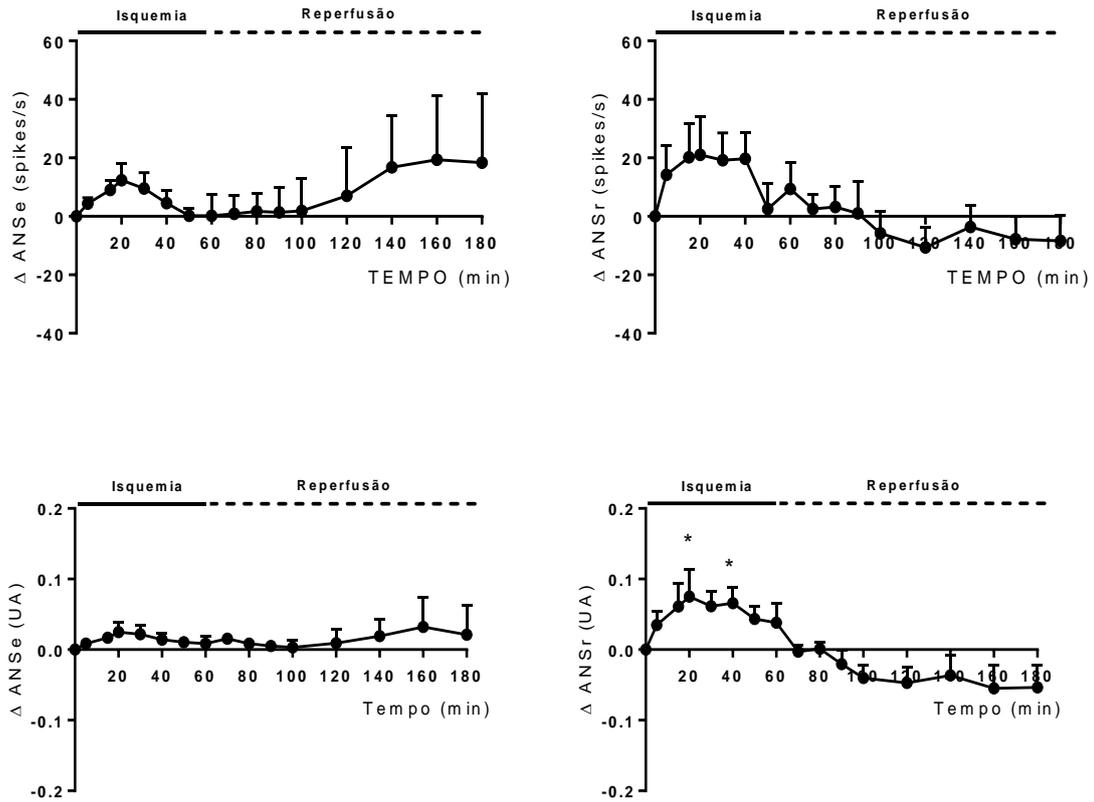


Figura 8. Efeitos da isquemia e reperfusão renal sobre a frequência (spikes/s) e amplitude (UA) da atividade nervosa simpática esplâncnica e renal (ANSe e ANSr, respectivamente) no grupo controle. Valores expressos em média \pm EPM (Anova de 1 via seguido pelo pós teste de Fisher LSD).

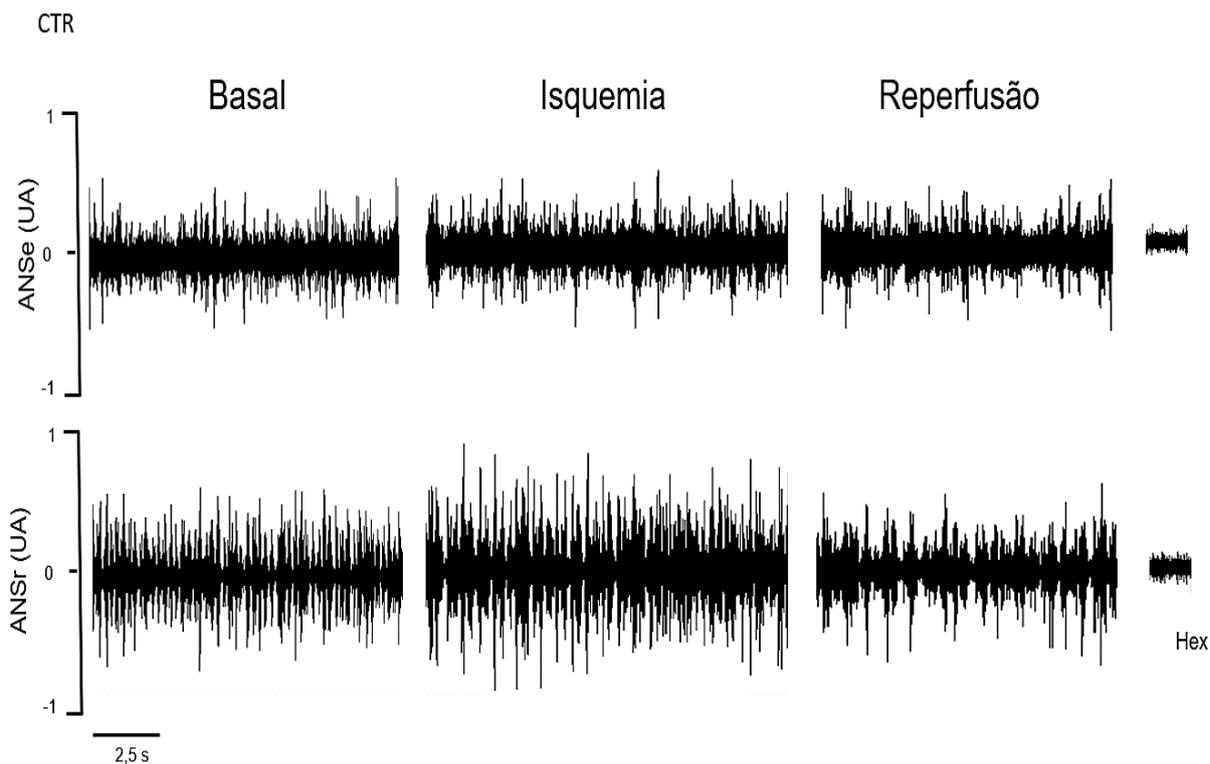


Figura 9. Traçado representativo do registro eletrofisiológico da atividade nervosa simpática esplâncnica e renal (ANSe e ANSr, respectivamente) basal, durante isquemia da artéria renal e após a reperusão em animais controles (CTR). Após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg, i.v.) é possível detectar o ruído de fundo remanescente e subtraí-lo da análise.

4.3. Comparação entre os grupos controle e deaferentado (CTR vs DAX). Efeito da isquemia e reperusão sobre parâmetros hemodinâmicos e de atividade nervosa renal e esplâncnica.

4.3.1 Efeitos da isquemia e reperusão renal sobre parâmetros hemodinâmicos e de atividade simpática renal e esplâncnica em animais deaferentados (Dax).

A Figura 10 revela redução significativa da PAM no grupo Dax após a isquemia (80 min: $-15 \pm 5^*$; 90 min: $-23 \pm 4^*$; 100 min: $-24 \pm 6^*$; 120 min: $-35 \pm 5^*$; 140 min: $-41 \pm 6^*$; 160 min: $-47 \pm 4^*$; 180 min: $-48 \pm 4^*$ Δ mmHg) e redução significativa da FC (15 min: $-23 \pm 6^*$; 20 min: $-25 \pm 7^*$, 30 min: $-22 \pm 3^*$; 40 min: -

26 ± 2*; 50 min: -34 ± 3*; 60 min: -35 ± 4*; 70 min: -37 ± 4*; 80 min: -38 ± 4*; 90 min: -54 ± 3*; 100 min: -50 ± 6*; 120 min: -63 ± 5*; 140 min: -72 ± 7*; 160 min: -80 ± 7*; 180 min: -76 ± 9* Δbpm) em comparação ao valor basal.

Como é possível observar na Figura 11, houve redução significativa com relação aos spikes/s do nervo renal (140 min: -51 ± 27*; 160 min: -59 ± 29*; 180 min: -73 ± 32* Δspikes/s) e em relação à amplitude do nervo renal (160 min: -0,28 ± 0,12*; 180 min: -0,29 ± 0,12* ΔUA), porém, novamente, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação a ANSe.

No traçado típico demonstrado na figura 12 é possível observar a simpatoinibição que ocorre majoritariamente durante a reperfusão para o território renal nos animais Dax.

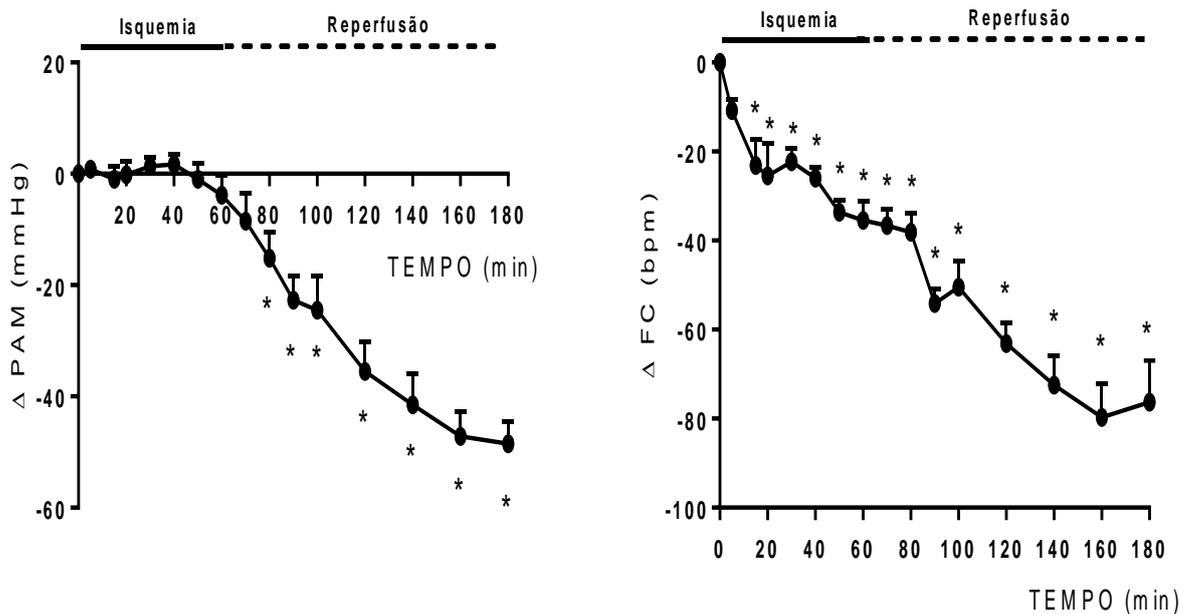


Figura 10. Efeitos da isquemia e reperfusão renal sobre a frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) no grupo Dax. Valores expressos em média ± EPM. * $p < 0,05$ (Anova de 1 via seguido pelo pós teste de Fisher LSD).

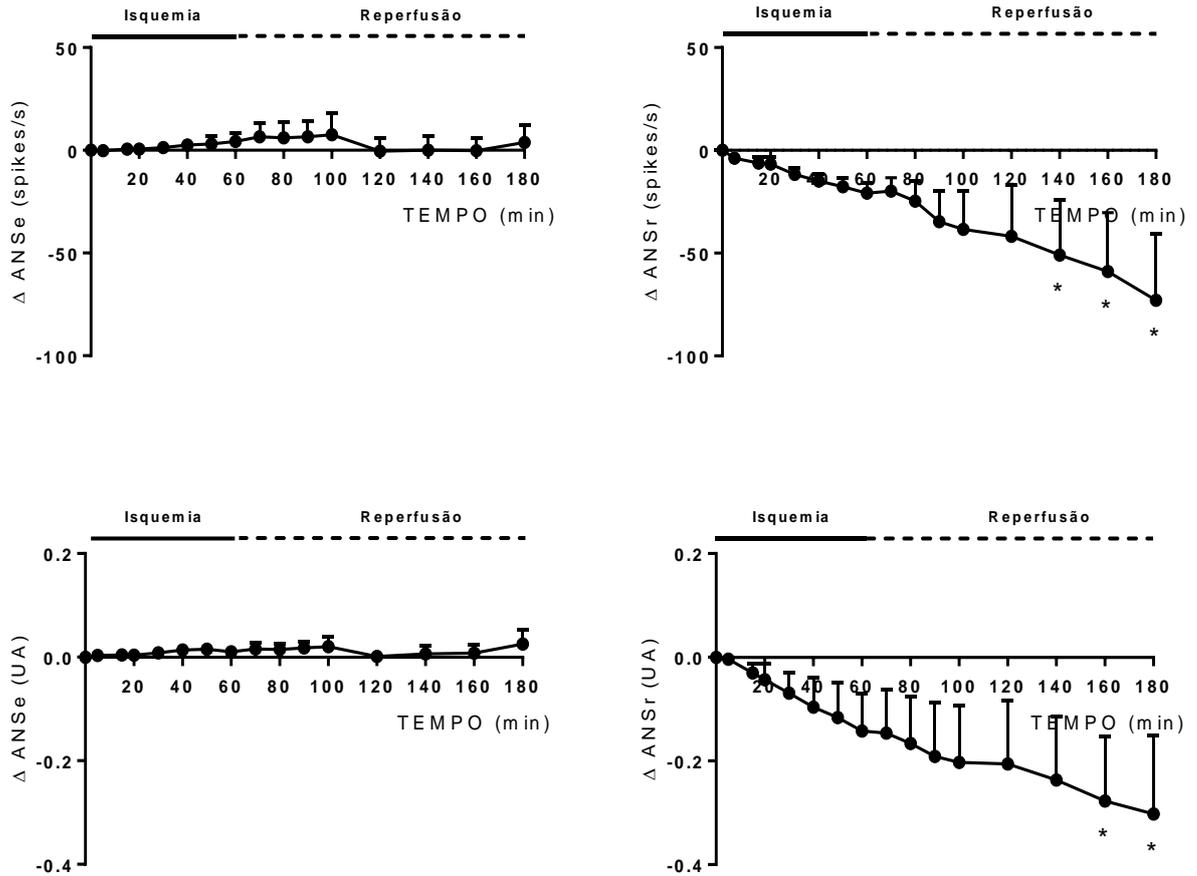


Figura 11. Efeitos da isquemia e reperusão sobre a frequência (spikes/s) e amplitude (UA) da atividade nervosa simpática esplâncnica e renal (ANSe e ANSr, respectivamente) nos animais Dax. Valores expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ (Anova de 1 via seguido pelo pós teste de Fisher LSD).

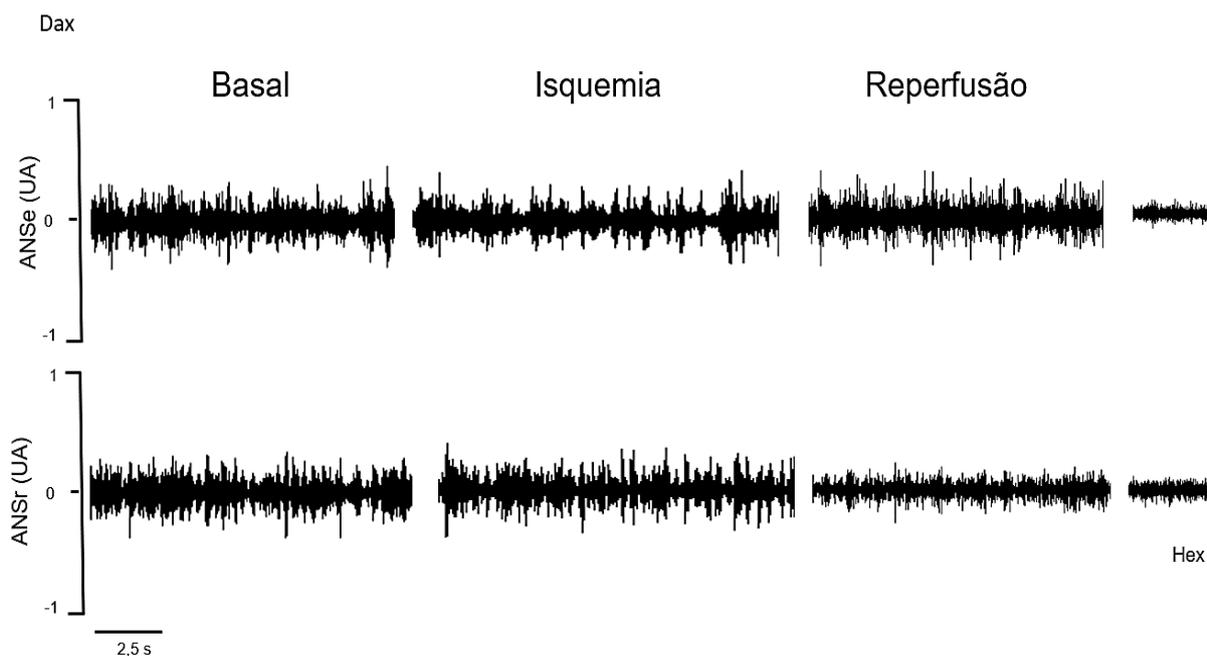


Figura 12. Traçado representativo do registro eletrofisiológico da atividade nervosa simpática esplâncnica e renal (ANSe e ANSr, respectivamente) basal, durante isquemia da artéria renal e após a reperfusão em animais deaferentados (Dax). Após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg, i.v.) é possível detectar o ruído de fundo remanescente e subtraí-lo da análise.

4.3.2 Comparação entre os grupos controle e deaferentado (CTR vs Dax).

Avaliação da isquemia e reperfusão renal sobre parâmetros hemodinâmicos e de atividade nervosa renal e esplâncnica.

Os dados obtidos da comparação entre os grupos controle (CTR) e deaferentado (Dax) frente a isquemia e reperfusão mostraram diminuição acentuada da PAM no grupo deaferentado comparado ao controle (CTR vs Dax: 120 min: $-2 \pm 10^*$ vs $-35 \pm 5^*$; 140 min: $-5 \pm 10^*$ vs $-41 \pm 6^*$; 160 min: $-16 \pm 10^*$ vs $-47 \pm 4^*$; 180 min: $-30 \pm 11^*$ vs $-48 \pm 4^*$ Δ mmHg) bem como, redução significativa na FC (20 min: $4 \pm 10^*$ vs $-25 \pm 7^*$ Δ bpm), como demonstrado na Figura 13.

Em relação à atividade do nervo renal, houve maior diminuição no número de spikes/s no grupo deaferentado quando comparado ao controle (90 min: $1 \pm 11^*$ vs $-35 \pm 15^*$; 140 min: $-6 \pm 7^*$ vs $-51 \pm 27^*$; 160 min: $-10 \pm 7^*$ vs $-59 \pm 29^*$;

180 min: $-10 \pm 7^*$ vs $-62 \pm 29^*$ Δ spikes/s) e diminuição na amplitude do nervo renal (60 min: $0,04 \pm 0,03^*$ vs $0,04 \pm 0,03^*$; 140 min: $-0,04 \pm 0,02^*$ vs $-0,04 \pm 0,02^*$; 160 min: $-0,05 \pm 0,03^*$ vs $-0,28 \pm 0,12^*$; 180 min: $-0,05 \pm 0,03^*$ vs $-0,29 \pm 0,12^*$ Δ UA) (Figura 14). Novamente, destaca-se a resposta preferencial para atividade simpática renal, sem alterações na atividade simpática esplâncnica.

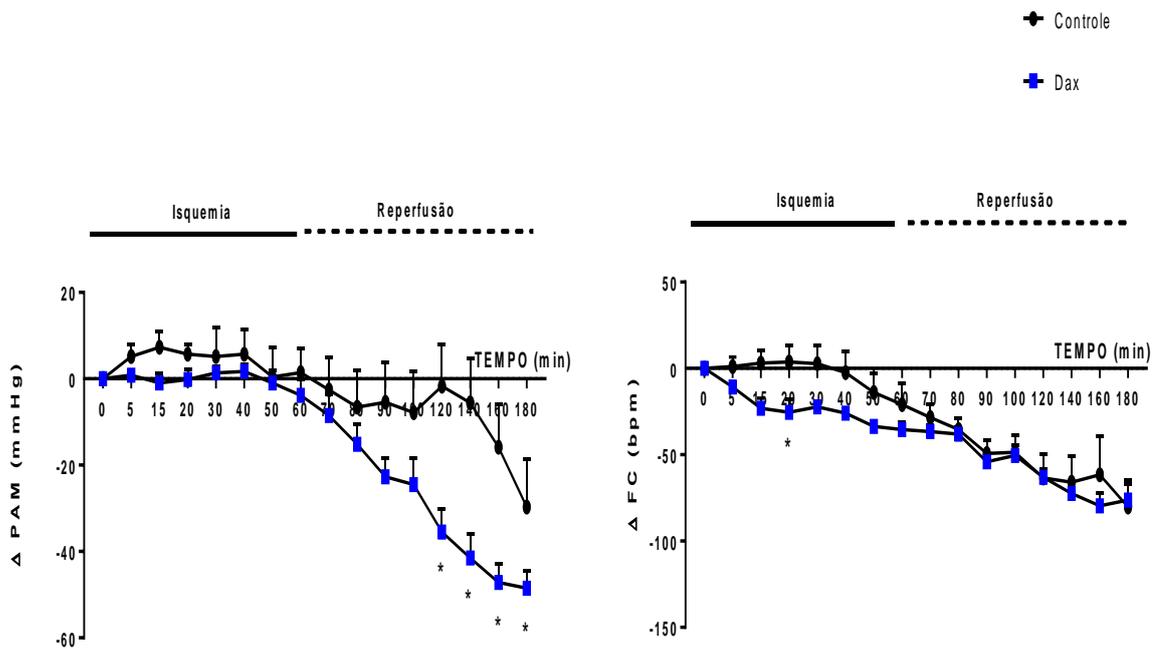


Figura 13. (A) Comparação da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) entre os grupos controle (CTR) e deaferentado (Dax) durante a isquemia e reperfusão. * $p < 0,05$ (Anova de 2 vias seguido pelo pós teste de Fisher LSD). Valores expressos em média \pm EPM.

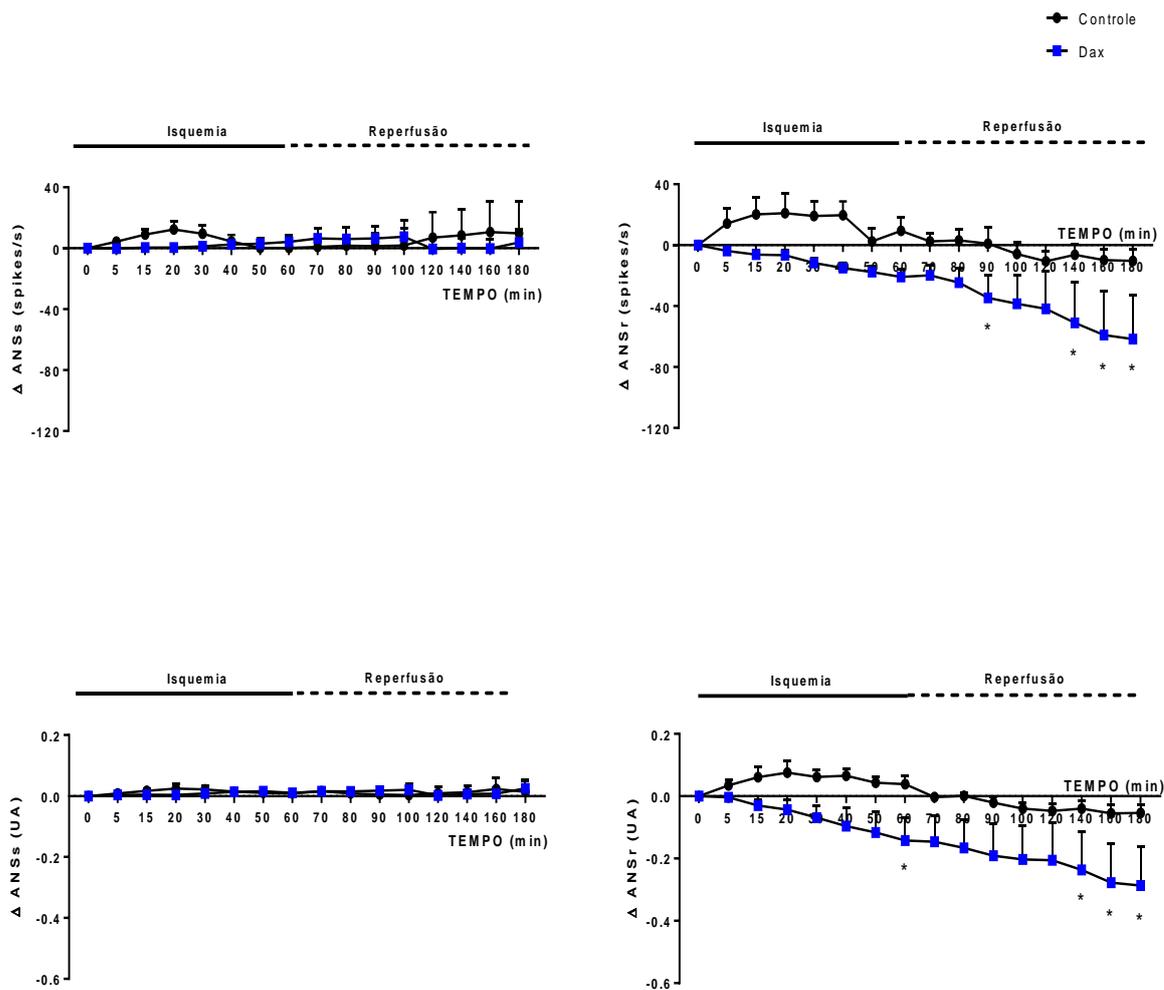


Figura 14. (A) Comparação da atividade nervosa simpática renal e esplâncnica quanto a frequência cardíaca (spikes/s) entre os grupos controle (CTR) e deaferentado (Dax) durante a isquemia e reperusão. * $p < 0,05$ (Anova de 2 vias seguido pelo pós teste de Fisher LSD). Valores expressos em média \pm EPM.

4.4. Efeito da isquemia e reperfusão sobre o número de leucócitos. Comparação entre os grupos controle e deaferentado (CTR vs Dax).

4.4.1 – Comparação do número total de leucócitos entre os grupos (CTR vs Dax) basal e depois da IR renal.

A Figura 15 exhibe os efeitos da IR sobre o número total de leucócitos em ambos os grupos estudados. A IR evocou aumento desse parâmetro nos animais CTR (basal: 6175 ± 253 ; após IR: $11395 \pm 766^*$) e Dax (Dax basal: 7617 ± 369 ; após IR: $9492 \pm 584^\#$). Contudo, não houve alteração dos leucócitos nos animais deaferentados em relação aos ratos intactos.

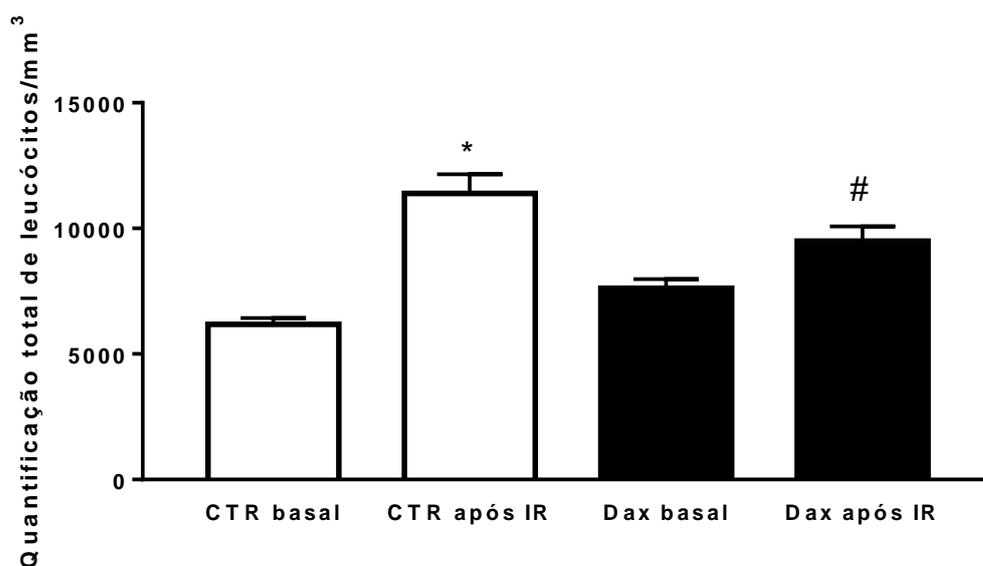


Figura 15. Valores totais de leucócitos /mm³ basal e depois da IR renal nos grupos controle (CTR) e deaferentado (Dax). Os valores são expressos em média \pm EPM. Anova de 1 via seguido pelo pós teste de Fisher LSD. *comparado ao CTR basal, [#]comparado ao Dax basal.

4.4.2 – Comparação da contagem diferencial de leucócitos no grupo controle basal e depois da IR renal.

A Figura 16 exhibe os efeitos da IR sobre a contagem diferencial do número de leucócitos no grupo controle. A IR evocou aumento do número de neutrófilos (basal: 20 ± 4 ; após IR: $81 \pm 2^*$) e redução de linfócitos (basal: 79 ± 4 ; após IR: $18 \pm 2^\#$), entretanto não foi observado diferença significativa com relação aos monócitos.

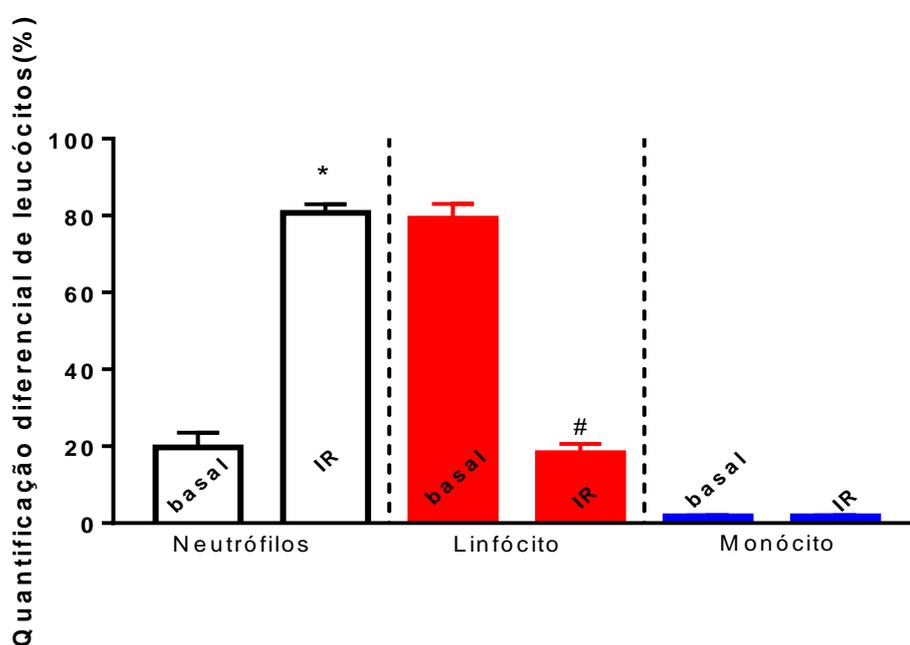


Figura 16. Comparação da porcentagem da contagem diferencial dos leucócitos do grupo controle (CTR) no momento basal e após IR. Os valores são expressos em média \pm EPM. Anova de 1 via seguido pelo pós teste de Fisher LSD. *comparação entre neutrófilo, #comparação entre linfócitos.

4.4.5 – Comparação da contagem diferencial de leucócitos no grupo (Dax) basal e depois da IR renal.

A Figura 17 exhibe os efeitos da IR sobre a contagem diferencial do número de leucócitos no grupo Dax. A IR evocou aumento do número de neutrófilo (basal: 19 ± 4 ; após IR: $81 \pm 2^*$) e redução de linfócitos (basal: 79 ± 4 ; após IR: $18 \pm 2^\#$), entretanto não foi observado diferença significativa com relação aos monócitos.

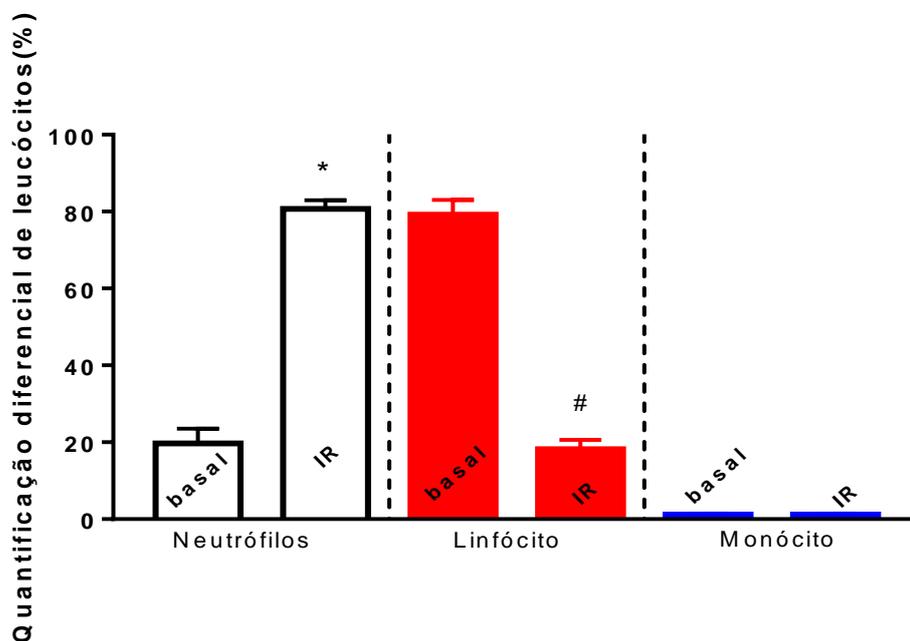


Figura 17. Comparação da porcentagem da contagem diferencial dos leucócitos do grupo deaferentado (Dax) no momento basal e após IR. Os valores são expressos em média \pm EPM. Anova de 1 via seguido pelo pós teste de Fisher LSD. *comparação entre neutrófilo, #comparação entre linfócitos.

5- DISCUSSÃO

Os principais achados da presente dissertação foram:

1. Nos animais CTR foi possível observar redução significativa da PAM e da FC durante a reperfusão renal. Quanto a atividade nervosa simpática, a amplitude da ANSr aumentou de forma significativa durante a isquemia, sem contudo haver alterações na ANSe;
2. No grupo Dax houve redução significativa mais intensa, inclusive durante a isquemia da PAM durante toda a reperfusão e diminuição da FC durante toda a IR. Em relação à ANSr, houve redução da frequência e amplitude da atividade nervosa ao final da reperfusão e não houve diferenças estatísticas em relação a ANSe;
3. O valor de leucócitos total aumentou de forma significativa tanto no grupo CTR e Dax após a IR;
4. Em relação a contagem diferencial de leucócitos, foi possível observar aumento significativo dos neutrófilos tanto no grupo CTR quanto Dax após a IR;
5. A deafferentação renal não produziu alterações nos valores basais dos parâmetros analisados PAM, FC, ANSe e ANSr.

No presente estudo foi percebido que a retirada seletiva das aferências renais promoveu simpatoinibição para o território renal durante a IR, assim como queda da PAM e bradicardia mais expressiva. A bradicardia foi reportada anteriormente no modelo de IR, entretanto, todos os mecanismos subjacentes envolvidos na resposta bradicárdica não são totalmente estabelecidos. Sabe-se

que a adenosina está elevada durante períodos prolongados de hipóxia, portanto durante a isquemia da artéria renal há um acúmulo de adenosina intra-órgão. É razoável supor que, após a liberação do fluxo sanguíneo, o acumulado de adenosina atuaria sistemicamente promovendo redução da FC. De fato, a bradicardia ocorre após a reperfusão renal nos animais CTR. **(RABADI; LEE, 2015)**. Interessantemente, a bradicardia surge antes mesmo da reperfusão nos ratos Dax; nossa interpretação é a de que a maior bradicardia após deaferentação renal ocorreu devido à ausência das aferências renais que poderiam atuar como freio para diminuições de parâmetros hemodinâmicos e da atividade simpática cardíaca na IR. De fato, a sinalização sensorial renal é integrada centralmente em núcleos cardiovasculares, como o PVN e RVLM **(NISHI; MARTINS; MILANEZ; LOPES *et al.*, 2017; ZHENG; PATEL, 2017)**, logo, apesar de não ter sido mensurado diretamente, é razoável a observância de modificações do tônus vasomotor simpático para outras regiões como o território cardíaco. Novos estudos, entretanto, são necessários para comprovar esta hipótese.

Adicionalmente, foi observado uma hipotensão mais robusta no grupo Dax a partir da segunda hora de reperfusão. Tal achado traz à luz o papel das aferências renais na manutenção pressórica após a isquemia do órgão. Wei Cao e colaboradores destacam o acionamento do reflexo renocerebral na IR renal em camundongos, no qual foi possível observar que a IR bilateral conseguiu acionar o sistema renina-angiotensina cerebral e intrarrenal, promovendo aumento da atividade simpática para os rins, porém, a Dax assim como injeções intracerebroventricular de losartana e de tempol, diminuíram de forma significativa a lesão isquêmica uma vez que comprometeu o reflexo renocerebral

(CAO; LI; LI; WU et al., 2017) reforçando o fundamental papel das aferências renais para a manutenção da atividade simpática.

A ANSr dos animais Dax reduziu de forma significativa na reperfusão quando comparado aos animais CTR. Fujii et al. relataram altas concentrações de noradrenalina na veia renal após 2 minutos de início da reperfusão, permanecendo elevada durante 24 horas; acreditamos que durante a isquemia há aumento da atividade simpática renal, o que corrobora com o aumento de noradrenalina circulante após a liberação da artéria renal descrita pelos autores. Possivelmente as aferências renais sinalizam para acionar a atividade simpática renal, pois quando realizado deaferentação percebe-se nítida simpatoinibição. Uma vez que na Dax a NA não estaria exarcebada, corroborando com os dados de Fujii, que viu que em animais desnervados total houve prevenção do transbordamento de NA, além de renoproteção e da função renal **(FUJII; KURATA; TAKAOKA; MURAOKA et al., 2003)**, já é sabido que a infusão na artéria renal de NA causa vasoconstrição renal e piora da função renal através insuficiência renal aguda **(CONGER; ROBINETTE; HAMMOND, 1991)**. O acionamento das fibras sensoriais quimiossensíveis foi relatado por Recordati e colaboradores, evidenciando que durante a oclusão da artéria renal por 1 e 2 minutos foi possível observar aumento da ANSr que foi expressivamente atenuada após liberação do fluxo sanguíneo renal **(RECORDATI; MOSS; WASELKOV, 1978)**.

Ogawa e colaboradores também obtiveram dados sobre a importância dos nervos simpáticos na IR, no qual animais submetidos à desnervação total apresentaram melhora nos parâmetros renais assim como em animais que receberam pré-condicionamento antes da isquemia, porém, em animais

desnervados e pré-condicionados, os efeitos protetores foram abolidos, podendo inferir que o pré-condicionamento pode ter seu mecanismo reno-protetor mediado pelos nervos simpáticos **(OGAWA; MIMURA; KAMINISHI, 2002)**.

No atual estudo foi registrado a atividade dos nervos renal e esplâncnico, uma vez que é sabido que neurônios da RVLM contribuem diretamente para o controle das descargas adrenérgicas nesses leitos, porém, ao contrário do nervo renal, não foram percebidas diferenças significativas com relação a atividade nervosa esplâncnica. Interessantemente, a seletividade dos achados reforça a **hipótese organotópica**, no qual o sistema nervoso é capaz de controlar as descargas adrenérgicas diferentemente para os territórios de acordo com a necessidade biológica. Logo, a ausência de alterações da atividade simpática para o território esplâncnico, pelo menos agudamente, traz à luz o importante papel da ANSr na manutenção da PA que sucede a IR **(GUYENET, 2006)**.

Como já é sabido durante a isquemia há uma restrição total do fluxo sanguíneo da artéria renal, porém quando há reestabelecimento do fluxo na reperfusão é percebido uma piora da função renal, tal fenômeno é denominado de paradoxo da reperfusão, no qual pode haver apoptose e necrose tecidual, **(LIEBERTHAL; LEVINE, 1996)**. Como demonstrado na Figura 18A, o epitélio e endotélio quando íntegros são separados por uma camada intersticial, porém a IR deflagra extravasamento de fluído na porção intersticial, culminando em extravasamento da porção intersticial e dano ao endotélio, promovendo liberação de moléculas de adesão, que favorecem a ativação e migração de leucócitos, resultando em maior dano endotelial causando o aumento da permeabilidade microvascular e extravasamento do líquido intersticial. A resposta imune desencadeada causa lesão das células epiteliais tubulares

podendo promover apoptose e morte celular (Figura 18B). A microscopia eletrônica do capilar peritubular evidencia a necrose tubular (**BONVENTRE; YANG, 2011**)

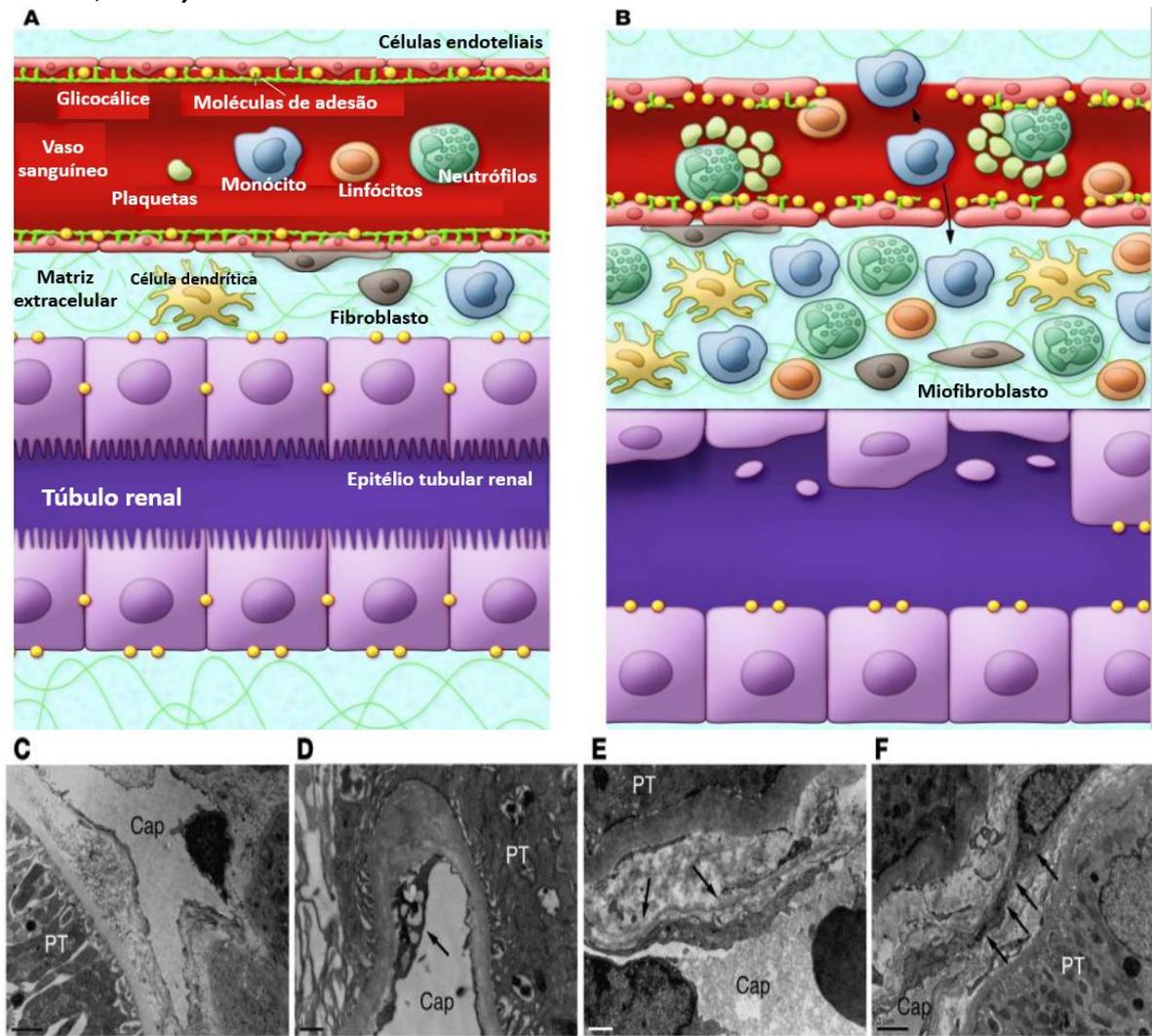


Figura 18. A epitélio e endotélio íntegros, B após IR ocorre aumento da resposta inflamatória culminando em dano ao epitélio tubular renal. Fotomicrografia eletrônica (CAP – capilar peritubular, PT – epitélio tubular): C epitélio e endotélio íntegros, D e infiltração da porção intersticial e migração de leucócitos, F lesão das células epiteliais tubulares. Modificado (**BONVENTRE; YANG, 2011**)

Quanto as contagens de leucócitos no sangue periférico, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CTR e Dax quanto ao valor total de leucócitos, somente um aumento significativo após IR de neutrófilos e diminuição de linfócitos em ambos os grupos. Tal diferença pode ter ocorrido

devido as diferenças dos grupos celulares, uma vez que os neutrófilos são da imunidade inata acionada como primeira resposta. Estudos anteriores mostram um aumento nas células polimorfonucleares no rim após a isquemia aguda, sendo os neutrófilos rapidamente recrutados para funcionar como mediadores celulares nas alterações microvasculares e ao parênquima renal. Em transplantes a infiltração de neutrófilos é vista como uma característica negativa a preservação do enxerto **(BOROS; BROMBERG, 2006; LINFERT; CHOWDHRY; RABB, 2009)**. Nossos achados demonstraram linfocitopenia após a IR renal, possivelmente a explicação para redução de linfócitos foi devido a apoptose celular identificada por Prass em modelo de isquemia cerebral com camundongos, que observou linfocitopenia em sangue periférico, baço e timo por fenotipagem celular e citometria de fluxo **(PRASS; MEISEL; HÖFLICH; BRAUN et al., 2003)** Estudos clínicos em pacientes admitidos com AVC demonstraram leucocitose, neutrofilia **(BUCK; LIEBESKIND; SAVER; BANG et al., 2008)** e linfocitopenia com aumento de apoptose como marcador de dano cerebral e maior risco de infecção pós acidente isquêmico **(PRASS; MEISEL; HÖFLICH; BRAUN et al., 2003; URRÁ; CERVERA; VILLAMOR; PLANAS et al., 2009)**.

6- CONCLUSÃO

A IR foi capaz de promover bradicardia e aumento da ANSr, sem alteração significativa da atividade vasomotora simpática para o território esplâncnico. Porém, quando os aferentes renais foram seletivamente retirados, foi possível observar simpatoinibição para o território renal, hipotensão na reperfusão e bradicardia mais expressiva, reforçando a importância das aferências renais na manutenção dos padrões hemodinâmicos.

Não observamos diferenças na comparação entre os grupos CTR e Dax quanto as contagens total e diferencial de leucócitos, porém foi possível observar leucocitose, neutrofilia e linfocitopenia em ambos os grupos. Assim, é razoável afirmar que nas condições experimentais deste estudo o perfil inflamatório em sangue periférico encontrado não é influenciado pela atividade vasomotora simpática e aferências renais.

4. REFERÊNCIAS

CANNON, Walter B. Organization for physiological homeostasis. *Physiological reviews*, v. 9, n. 3, p. 399-431, 1929.

ACCORSI-MENDONÇA, D.; MACHADO, B. H. Synaptic transmission of baro- and chemoreceptors afferents in the NTS second order neurons. *Auton Neurosci*, 175, n. 1-2, p. 3-8, Apr 2013.

AMIRHESSAM, T. Fluid Flow Through Carbon Nanotubes And Graphene Based Nanostructures. . **2015**.

BILLMAN, G. E. Homeostasis: The Underappreciated and Far Too Often Ignored Central Organizing Principle of Physiology. *Front Physiol*, 11, p. 200, 2020.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*, 121, n. 11, p. 4210-4221, Nov 2011.

BOROS, P.; BROMBERG, J. S. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*, 6, n. 4, p. 652-658, Apr 2006.

BUCK, B. H.; LIEBESKIND, D. S.; SAVER, J. L.; BANG, O. Y. *et al*. Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke*, 39, n. 2, p. 355-360, Feb 2008.

CAMPOS, R. R.; CARILLO, B. A.; OLIVEIRA-SALES, E. B.; SILVA, A. M. *et al*. Role of the caudal pressor area in the regulation of sympathetic vasomotor tone. *Braz J Med Biol Res*, 41, n. 7, p. 557-562, Jul 2008.

CAO, W.; LI, A.; LI, J.; WU, C. *et al*. Reno-Cerebral Reflex Activates the Renin-Angiotensin System, Promoting Oxidative Stress and Renal Damage After Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxid Redox Signal*, 27, n. 7, p. 415-432, Sep 01 2017.

CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190, n. 3, p. 255-266, Feb 2000.

CONGER, J. D.; ROBINETTE, J. B.; HAMMOND, W. S. Differences in vascular reactivity in models of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 39, n. 6, p. 1087-1097, Jun 1991.

DE CASTRO, F. Towards the sensory nature of the carotid body: hering, de castro and heymansdagger. *Front Neuroanat*, 3, p. 23, 2009.

DORWEILER, B.; PRUEFER, D.; ANDRASI, T. B.; MAKSAN, S. M. *et al*. Ischemia-Reperfusion Injury : Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 33, n. 6, p. 600-612, Dec 2007.

ESTAÑOL, B.; PORRAS-BETANCOURT, M.; PADILLA-LEYVA, M.; SENTÍES-MADRID, H. [A brief history of the baroreceptor reflex: from Claude Bernard to Arthur C. Guyton. Illustrated with some classical experiments]. **Arch Cardiol Mex**, 81, n. 4, p. 330-336, 2011 Oct-Dec 2011.

FAUCHER, Q.; ALARCAN, H.; MARQUET, P.; BARIN-LE GUELLEC, C. Effects of Ischemia-Reperfusion on Tubular Cell Membrane Transporters and Consequences in Kidney Transplantation. **J Clin Med**, 9, n. 8, Aug 12 2020.

FERNÁNDEZ, A. R.; SÁNCHEZ-TARJUELO, R.; CRAVEDI, P.; OCHANDO, J. *et al.* Review: Ischemia Reperfusion Injury-A Translational Perspective in Organ Transplantation. **Int J Mol Sci**, 21, n. 22, Nov 13 2020.

FISHER, J. P.; KIM, A.; YOUNG, C. N.; FADEL, P. J. Carotid baroreflex control of arterial blood pressure at rest and during dynamic exercise in aging humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 299, n. 5, p. R1241-1247, Nov 2010.

FUJII, T.; KURATA, H.; TAKAOKA, M.; MURAOKA, T. *et al.* The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. **Eur J Pharmacol**, 481, n. 2-3, p. 241-248, Nov 28 2003.

GRISK, O. The sympathetic nervous system in acute kidney injury. **Acta Physiol (Oxf)**, 228, n. 2, p. e13404, 02 2020.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, 7, n. 5, p. 335-346, May 2006.

HOLLIS, M.; WANG, D. H. Transient receptor potential vanilloid in blood pressure regulation. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 22, n. 2, p. 170-176, Mar 2013.

JENNINGS, R. B. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury. **Circ Res**, 113, n. 4, p. 428-438, Aug 02 2013.

JENNINGS, R. B.; CROUT, J. R.; SMETTERS, G. W. Studies on distribution and localization to potassium in early myocardial ischemic injury. **AMA Arch Pathol**, 63, n. 6, p. 586-592, Jun 1957.

JENNINGS, R. B.; SOMMERS, H. M.; SMYTH, G. A.; FLACK, H. A. *et al.* Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. **Arch Pathol**, 70, p. 68-78, Jul 1960.

JOHNS, E. J.; KOPP, U. C.; DIBONA, G. F. Neural control of renal function. **Compr Physiol**, 1, n. 2, p. 731-767, Apr 2011.

KALEHOFF, J. P.; OPARIL, S. The Story of the Silent Killer : A History of Hypertension: Its Discovery, Diagnosis, Treatment, and Debates. **Curr Hypertens Rep**, 22, n. 9, p. 72, 08 27 2020.

KALOGERIS, T.; BAINES, C. P.; KRENZ, M.; KORTHUIS, R. J. Ischemia/Reperfusion. **Compr Physiol**, 7, n. 1, p. 113-170, 12 06 2016.

KLONER, R. A.; GANOTE, C. E.; WHALEN, D. A.; JENNINGS, R. B. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. **Am J Pathol**, 74, n. 3, p. 399-422, Mar 1974.

KLONER, R. A.; REIMER, K. A.; JENNINGS, R. B. Distribution of coronary collateral flow in acute myocardial ischaemic injury: effect of propranolol. **Cardiovasc Res**, 10, n. 1, p. 81-90, Jan 1976.

KOPP, U. C. Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 308, n. 2, p. R79-95, Jan 15 2015.

KRAMER, R. S.; HERRON, C. R.; GROOM, R. C.; BROWN, J. R. Acute Kidney Injury Subsequent to Cardiac Surgery. **J Extra Corpor Technol**, 47, n. 1, p. 16-28, Mar 2015.

LAMBERT, E.; SCHLAICH, M. The role of renal sympathetic nerves in ischemia reperfusion injury. **Auton Neurosci**, 204, p. 105-111, 05 2017.

LIEBERTHAL, W.; LEVINE, J. S. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. **Am J Physiol**, 271, n. 3 Pt 2, p. F477-488, Sep 1996.

LINFERT, D.; CHOWDHRY, T.; RABB, H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. **Transplant Rev (Orlando)**, 23, n. 1, p. 1-10, Jan 2009.

LONGHURST, J. C. Cardiac receptors: their function in health and disease. **Prog Cardiovasc Dis**, 27, n. 3, p. 201-222, 1984 Nov-Dec 1984.

MARFURT, C. F.; ECHTENKAMP, S. F. Sensory innervation of the rat kidney and ureter as revealed by the anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) from dorsal root ganglia. **J Comp Neurol**, 311, n. 3, p. 389-404, Sep 15 1991.

NISHI, E. E.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. The crosstalk between the kidney and the central nervous system: the role of renal nerves in blood pressure regulation. **Exp Physiol**, 100, n. 5, p. 479-484, Apr 20 2015.

NISHI, E. E.; BERGAMASCHI, C. T.; OLIVEIRA-SALES, E. B.; SIMON, K. A. *et al.* Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, 26, n. 7, p. 858-865, Jul 2013.

NISHI, E. E.; MARTINS, B. S.; MILANEZ, M. I.; LOPES, N. R. *et al.* Stimulation of renal afferent fibers leads to activation of catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. **Auton Neurosci**, 204, p. 48-56, 05 2017.

OGAWA, T.; MIMURA, Y.; KAMINISHI, M. Renal denervation abolishes the protective effects of ischaemic preconditioning on function and haemodynamics in ischaemia-reperfused rat kidneys. **Acta Physiol Scand**, 174, n. 3, p. 291-297, Mar 2002.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; NISHI, E. E.; CARILLO, B. A.; BOIM, M. A. *et al.* Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, 22, n. 5, p. 484-492, May 2009.

PRASS, K.; MEISEL, C.; HÖFLICH, C.; BRAUN, J. *et al.* Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. **J Exp Med**, 198, n. 5, p. 725-736, Sep 01 2003.

RABADI, M. M.; LEE, H. T. Adenosine receptors and renal ischaemia reperfusion injury. **Acta Physiol (Oxf)**, 213, n. 1, p. 222-231, Jan 2015.

RECORDATI, G. M.; MOSS, N. G.; WASELKOV, L. Renal chemoreceptors in the rat. **Circ Res**, 43, n. 4, p. 534-543, Oct 1978.

SOLEZ, K.; IDEURA, T.; SILVIA, C. B.; HAMILTON, B. *et al.* Clonidine after renal ischemia to lessen acute renal failure and microvascular damage. **Kidney Int**, 18, n. 3, p. 309-322, Sep 1980.

STRACK, A. M.; SAWYER, W. B.; HUGHES, J. H.; PLATT, K. B. *et al.* A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. **Brain Res**, 491, n. 1, p. 156-162, Jul 03 1989.

URRA, X.; CERVERA, A.; VILLAMOR, N.; PLANAS, A. M. *et al.* Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. **Neuroscience**, 158, n. 3, p. 1174-1183, Feb 06 2009.

USTINOVA, E. E.; SCHULTZ, H. D. Renal sympathetic nerve activity during cardiac ischemia and reperfusion in rats. **Am J Physiol**, 271, n. 4 Pt 2, p. R1033-1040, Oct 1996.

VEIGA, A. C.; MILANEZ, M. I. O.; FERREIRA, G. R.; LOPES, N. R. *et al.* Selective afferent renal denervation mitigates renal and splanchnic sympathetic nerve overactivity and renal function in chronic kidney disease-induced hypertension. **J Hypertens**, 38, n. 4, p. 765-773, 04 2020.

WU, M. S.; CHIEN, C. T.; MA, M. C.; CHEN, C. F. Protection of ischemic preconditioning on renal neural function in rats with acute renal failure. **Chin J Physiol**, 52, n. 5 Suppl, p. 365-375, Nov 30 2009.

WYSS, J. M.; CARLSON, S. H. The role of the central nervous system in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, 1, n. 3, p. 246-253, Jun 1999.

XUE, J. L.; DANIELS, F.; STAR, R. A.; KIMMEL, P. L. *et al.* Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. **J Am Soc Nephrol**, 17, n. 4, p. 1135-1142, Apr 2006.

ZANUTTO, B. S.; VALENTINUZZI, M. E.; SEGURA, E. T. Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. **Biomed Eng Online**, 9, p. 4, Jan 11 2010.

ZHENG, H.; PATEL, K. P. Integration of renal sensory afferents at the level of the paraventricular nucleus dictating sympathetic outflow. **Auton Neurosci**, 204, p. 57-64, 05 2017.

SUTERA, S & Skalak, R. (2003). The History of Poiseuille's Law. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 25. 1-20. 10.1146/annurev.fl.25.010193.000245.

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PAPEL DO NERVO RENAL NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL AGUDA EM RATOS.", protocolada sob o CEUA nº 1567290421 (ID 011599), sob a responsabilidade de **Ruy Ribeiro de Campos Junior** e equipe; *Ruy Ribeiro de Campos Junior; Ana caroline Marreiros* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 11/05/2022.

We certify that the proposal "ROLE OF THE RENAL NERVE IN ISCHEMIA AND ACUTE KIDNEY REPERFUSION IN RATS.", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 1567290421 (ID 011599), under the responsibility of **Ruy Ribeiro de Campos Junior** and team; *Ruy Ribeiro de Campos Junior; Ana caroline Marreiros* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/11/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2022** a **06/2024**

Área: **Fisiologia Cardiovascular E Respiratória/farmacologia**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 9 semanas**

N: **60**

Linhagem: **WISTAR**

Peso: **250 a 300 g**

Local do experimento: **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular**

São Paulo, 11 de maio de 2022



Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo



Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo