

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ISABELLA CARDOSO SILVA**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES NA SÍNDROME  
CARDIORRENAL: análise dos níveis de expressão dos receptores  
purinérgicos**

**PATOS DE MINAS - MG**  
**DEZEMBRO DE 2021**

**ISABELLA CARDOSO SILVA**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES NA SÍNDROME  
CARDIORRENAL: análise dos níveis de expressão dos receptores  
purinérgicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Mestre em Biotecnologia

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Ribas  
Fürstenau**

**PATOS DE MINAS - MG**

**DEZEMBRO DE 2021**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2021	<p>Silva, Isabella Cardoso, 1995- ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES NA SÍNDROME CARDIORRENAL [recurso eletrônico] : análise dos níveis de expressão dos receptores purinérgicos / Isabella Cardoso Silva. - 2021.</p> <p>Orientadora: Cristina Ribas Fürstenau . Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.671">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.671</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biotecnologia. I. , Cristina Ribas Fürstenau,1979- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. III. Título.</p>
--------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

# **ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES NA SÍNDROME CARDIORRENAL: análise dos níveis de expressão dos receptores purinérgicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Mestre em Biotecnologia.

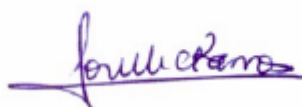
Aprovado em 09/12/2021

BANCA EXAMINADORA



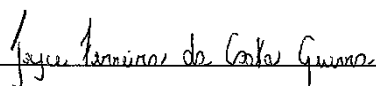
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Ribas Fürstenau (Orientadora)



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcela Sorelli Carneiro Ramos



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joyce Ferreira da Costa Guerra

Patos de Minas – MG

2021

*Dedico este trabalho à minha família,  
Cristiovane, Lenir e Junior, vocês são flores  
de luz na minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, nosso Pai, soberanamente justo e bom, pela oportunidade de crescimento intelectual e moral. Sou grata a todos os desafios enfrentados neste período, levarei comigo, pela eternidade do espírito imortal, todas as experiências.

Aos meus pais, Lenir e Cristiovane, por serem minha base, exemplos de coragem, dedicação, perseverança e por nunca medirem esforços para me proporcionar o melhor. Agradeço o amparo constante, o ombro amigo, o pulso firme, e acima de tudo o amor incondicional.

Ao meu irmão, Cristiovane Júnior, obrigada por ser o melhor irmão mais velho. Agradeço o carinho, o companheirismo, as conversas, e por me ensinar o melhor caminho a seguir.

À minha avó, Ambrosina (*in memoriam*), que acompanhou o início desta jornada e tenho a certeza que de onde estiver, está acompanhando o encerramento desse ciclo. Agradeço por ter sido minha segunda mãe, por sempre me dar um colo aconchegante e me encher de mimos, pela convivência cheia de alegria e amor. Não tenho palavras para descrever a saudade que sinto, mas com imensa gratidão por viver todos esses anos ao seu lado.

Ao meu avô, José Cardoso (*in memoriam*), por me ensinar, na prática, os caracteres da pessoa de bem. Agradeço por ser sinônimo de alegria, vontade, amor e caridade. Obrigada por me ensinar a ser CARDOSO, e CARDOSO nunca para no meio da estrada. A saudade é grande, mas sou eternamente grata aos seus ensinamentos.

À minha avó, Maria Natalícia, por ser um porto seguro, pelos conselhos e apoio, me encorajando a seguir em frente.

Aos meus amigos que me auxiliaram nos momentos mais críticos da jornada. Ao Instituto do Jovem do Centro Espírita Eurípedes Barsanulfo, pela convivência e pelos ouvidos e ombros acolhedores. À Fernanda, prima/irmã, por ser minha melhor amiga e compartilhar comigo sua experiência. Ao Diogo, meu grande amor, por estar ao meu lado e me apoiar incondicionalmente.

À professora Cristina, que aceitou um grande desafio de me orientar a distância, duplamente árduo com a situação pandêmica. Agradeço muitíssimo por todo o conhecimento, por todo o esforço empreendido para obter os melhores resultados. Obrigada por todo o apoio, segurança, paciência e carinho. Sua orientação, mesmo a distância, foi realizada de forma impecável.

À professora Marcela, que muito contribui neste trabalho, agradeço por sempre ter um coração enorme e de boa vontade. Obrigada por sempre atender com presteza as minhas demandas.

Ao professor Ivson e que aceitou participar da banca examinadora e que muito contribuiu com este trabalho pelas sugestões no exame de qualificação. À professora Joyce aceitou participar da banca examinadora e contribuir para a melhoria do trabalho.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, Isabella Hernandes, Geovanne e Jefferson, pela amizade, colaboração, troca de experiências. Obrigada por serem as minhas mãos na execução de tarefas, quando não pude estar junto com vocês. Agradeço por todo o apoio, mesmo em uma pandemia, conseguimos estreitar nossos laços e sustentar-nos mutuamente.

Aos colegas do Laboratório 308 bloco L da UFABC, sou imensamente grata pela receptividade, por tornarem minhas viagens a Santo André mais agradáveis, pelos ensinamentos e carinho. Em especial, Raquel e Carol, o auxílio prestado foi fundamental no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho. Agradeço por atender minhas demandas com presteza e boa vontade.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia por todo o aprendizado, auxílio e incentivo.

À UFU, a instituição de ensino que me orgulho em dizer que sou discente.

À UFABC, que me acolheu com carinho e proporcionou uma estrutura ideal para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A síndrome cardiorenal (SCR) é caracterizada por distúrbios no coração e nos rins em que a disfunção aguda ou crônica em um órgão pode induzir uma disfunção aguda ou crônica no outro. Quando a insuficiência renal aguda gera uma disfunção cardíaca aguda, esta síndrome é classificada como SCR do tipo 3 (SCR3). O sistema vascular também é afetado pela SCR, porém estudos sobre possíveis alterações vasculares decorrentes da SCR distantes do sítio da isquemia renal, como na aorta por exemplo, são escassos. A sinalização purinérgica, mediada por purinas (ATP, ADP, adenosina) impacta de maneira importante o sistema vascular, regulando o tônus e a inflamação vascular, entre outros processos. O objetivo do presente estudo foi analisar os níveis de expressão gênica dos receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio (FGA) em aortas de camundongos submetidos à SCR3. Foram utilizadas aortas torácicas de camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de insuficiência renal por isquemia unilateral do pedículo renal esquerdo por 60 minutos, seguida de reperfusão por 8 e 15 dias. O RNA total das aortas dos animais Sham (controle), IR8 e IR15 foi extraído para análise da expressão dos genes de interesse por RT-qPCR. Após 15 dias de reperfusão, os níveis séricos de ureia apresentaram um significativo aumento de 34% em relação ao grupo controle. Ainda, razão entre o peso do rim direito/comprimento da tibia apresentou um acréscimo de 17% no grupo IR15 em relação ao grupo Sham, validando o êxito da indução do modelo experimental. A expressão gênica do receptor P2Y<sub>1</sub> diminuiu significativamente, cerca de 82% aos 8 e 15 dias de reperfusão. Os níveis de mRNA dos receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  não foram alterados entre os grupos experimentais. Entretanto, a expressão da FGA apresentou um importante aumento, aproximadamente 690 vezes, na aorta dos camundongos IR15 em relação ao grupo Sham. Esses achados contribuem para melhor compreensão do impacto da SCR3 sobre os vasos sanguíneos distantes da isquemia renal, embora estudos complementares se façam necessários. Ainda, considerando o importante papel dos receptores purinérgicos para a função vascular, estes resultados podem futuramente apontar novos direcionamentos diagnósticos e terapêuticos a serem considerados em pacientes com doença renal.

**Palavras-chave:** Receptores P2. Síndrome Cardiorenal. Inflamação. Aorta. Sinalização Purinérgica.



## ABSTRACT

Cardiorenal syndrome (CRS) characterizes by disorders of the heart and kidneys, in which acute or chronic dysfunction in one organ can induce acute or chronic dysfunction in the other. When acute renal failure leads to acute cardiac dysfunction, this syndrome is classified as SCR type 3 (SCR3). The vascular system is also affected by SCR but studies on possible vascular changes resulting from SCR distant from the site of renal ischemia, such as in the aorta, are scarce. Purinergic signaling, mediated by purines (ATP, ADP, adenosine) significantly impacts the vascular system, regulating vascular tone and inflammation, among other processes. The present study aimed to analyze the levels of gene expression of purinergic receptors P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> and the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and fibrinogen  $\alpha$  chain (FGA) in aortas from mice submitted to SCR3. C57BL/6 mice were submitted to the model of renal failure due to unilateral ischemia of the left renal pedicle for 60 minutes, followed by reperfusion for 8 and 15 days. Total RNA from thoracic aortas of Sham animals (control), IR 8 and IR 15 was extracted to analyze the expression levels of genes of interest by RT-qPCR. After 15 days of reperfusion, serum urea levels showed a significant increase, around 34% compared to the control group. Besides, the right kidney weight/tibia length ratio showed an increase of 17% in the IR15 group compared to the Sham group, validating the successful induction of the experimental model. The gene expression of the P2Y<sub>1</sub> receptor decreased significantly, about 82 % at 8 and 15 days of reperfusion. The mRNA levels of the P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors and the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were not altered between the experimental groups. However, the expression of FGA showed an important increase, approximately 690 times, in the aorta of IR15 mice compared to the Sham group. These findings contribute to a better understanding of the impact of SCR3 on blood vessels distant from renal ischemia, although further studies are needed. Also, considering the important role of purinergic receptors for vascular function, these results may in the future point to new diagnostic and therapeutic directions to be considered in patients with kidney disease.

**Keywords:** P2 receptors. Cardiorenal Syndrome. Inflammation. Aorta. Purinergic Signaling.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 – Representação da fisiopatologia da Síndrome Cardiorrenal do tipo 3 (SCR3).

Figura 2 – Representação do controle do tônus vascular pela Sinalização Purinérgica.

Figura 3 – Esquema sobre a liberação de ATP durante condições inflamatórias.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Adenosina 5'-difosfato  
AMP: Adenosina 5'-monofosfato  
AT-II: Angiotensina II  
ATP: Adenosina 5'-trifosfato  
cAMP: 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico  
CD73: Ecto-5' nucleotidase  
CE: Células endoteliais  
CMLV: Células musculares lisas vasculares  
DAMPS: Padrões moleculares associados ao dano  
DCV: Doenças cardiovasculares  
ECA: Enzima conversora de angiotensina  
EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio  
E-NPPs: Ecto-nucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterases  
E-NTPDases: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases  
EROs: Espécies reativas de oxigênio  
FBG: Fibrinogênio  
FGA: cadeia  $\alpha$  do Fibrinogênio  
ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$   
IL-6: Interleucina 6  
IR: Isquemia/ reperfusão  
IRA: Insuficiência renal aguda  
MIP-2: Proteína inflamatória de macrófago  
MMP-2: Metaloproteinases de matriz 2  
MMP-9: Metaloproteinases de matriz 9  
NA: Noradrenalina  
NO: Óxido nítrico  
PBUTs: Toxinas urêmicas ligadas a proteínas  
PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina  
RAAS: Sistema renina-angiotensina-aldosterona  
SCR: Síndrome Cardiorrenal  
SNS: Sistema nervoso simpático

TF: Fator tecidual

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$

UDP: Uridina 5'-difosfato

Up<sub>4</sub>A: Tetrafosfato de adenosina uridina

UTP: Uridina 5'-trifosfato

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular-1

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VSMC: Células musculares lisas vasculares

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	14
1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Problema .....	14
1.2 Hipóteses.....	15
1.3 Objetivos.....	15
1.3.1 Objetivo Geral .....	15
1.3.2 Objetivos Específicos .....	15
1.4 Justificativa .....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1. Síndrome Cardiorenal (SCR) .....	16
2.2. Fisiopatologia da Síndrome Cardiorenal .....	18
2.3. Síndrome Cardiorenal e Sistema Vascolar .....	20
2.4. Sinalização Purinérgica .....	23
2.5. Receptores Purinérgicos no Sistema Vascolar .....	25
CAPÍTULO 2 .....	30
VASCULAR CHANGES IN CARDIORENAL SYNDROME: a look at purinergic receptors levels .....	31
CONCLUSÃO .....	47
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	48
REFERÊNCIAS .....	50
ANEXOS (Normas da Revista Life Sciences) .....	59

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Problema

Entre os rins e o coração ocorrem extensas interações fisiológicas, envolvendo o controle do volume de líquido extracelular pelos rins e a circulação sistêmica pelo coração. A síndrome cardiorrenal (SCR) é caracterizada pela disfunção primária no rim ou no coração que inicia o comprometimento combinado de ambos os órgãos (RONCO et al., 2010). Quando o dano agudo ocorre primeiramente no rim e gera uma disfunção cardíaca aguda, é denominada síndrome cardiorrenal tipo 3 (SCR3) (BAGSHAW et al., 2013).

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no mundo. Estima-se que, em 2019, em torno de 17,9 milhões de pessoas morreram por DCVs, representando 32% de todas as mortes em nível global (WHO, 2021). De acordo com dados do Censo Brasileiro de Nefrologia, em julho de 2019, o número total estimado de pacientes em diálise foi de 139.691, com um aumento médio de 5,43% em relação a 2018 (NEVES et al., 2021), ratificando a SCR como um grave problema de saúde pública. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na síndrome cardiorrenal ainda não estão completamente descritos, mas sabe-se que, além dos rins e do coração, o sistema vascular é amplamente afetado nesta condição, através de fatores neuro-humorais (BOCK; GOTTLIEB, 2010), mecânicos, bioquímicos e de toxinas urêmicas ligadas a proteínas (do inglês PBUTs, *protein-bound uremic toxins*) (GUO et al., 2017), causando disfunção endotelial e morte celular (BOCK; GOTTLIEB, 2010).

Descrita por Burnstock em 1970, a sinalização purinérgica, mediada por ATP e outras purinas e pirimidinas, atua de maneira significativa sobre os vasos sanguíneos, influenciando na regulação do tônus e da inflamação vascular, estimulando o crescimento de células endoteliais, promovendo a agregação plaquetária, entre outros processos (ERLINGE; BURNSTOCK, 2008). O ATP extracelular se liga aos receptores purinérgicos do tipo P2 de células endoteliais (CE) provocando vasodilatação através da produção de óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (BURNSTOCK, 2017). O ATP também pode atuar como um vasoconstritor, quando liberado juntamente com a noradrenalina (NA), ligando-se aos receptores P2 das células musculares lisas vasculares (CMLV) (BURNSTOCK, 2007a).

## 1.2 Hipótese

A hipótese deste estudo é de que vasos distantes do sítio de isquemia renal, como a aorta por exemplo, sofrem modificações nas suas funções biológicas e tais alterações são provocadas, em parte, por um comprometimento do funcionamento dos receptores purinérgicos do tipo P2 presentes nos vasos sanguíneos.

## 1.2 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo geral:

Verificar o impacto da SCR3 sobre s receptores purinérgicos vasculares distantes do sítio isquêmico.

### 1.3.2 Objetivos específicos:

A partir do protocolo de isquemia/reperfusão (IR) renal em camundongos, em animais *Sham* (controle), IR 8 dias de reperfusão e IR 15 dias de reperfusão, verificar se a síndrome cardiorrenal:

a. modifica os níveis de expressão gênica dos receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> em aorta torácica;

b. altera o perfil inflamatório através da expressão gênica das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e Fibrinogênio  $\alpha$  em aorta torácica.

## 1.4 Justificativa

Na SCR3 (síndrome renocárdica aguda), a sequência temporal de eventos inicia-se com lesão renal aguda, que leva a uma disfunção cardíaca aguda, a qual pode se manifestar em forma de arritmia, edema pulmonar, entre outros (RONCO et al., 2010).

Existe uma compreensão limitada dos mecanismos fisiopatológicos de como a insuficiência renal aguda (IRA) contribui para o aumento do risco de eventos cardiovasculares (BAGSHAW et al., 2010). De acordo com Kingma e colaboradores (2006), utilizando um modelo canino de IRA, houve um aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, contribuindo para a diminuição da responsividade coronariana observada à acetilcolina, adenosina, bradicinina e L-arginina. Ainda, a reatividade vascular também foi significativamente diminuída de maneira dependente ou independente do endotélio (KINGMA et al., 2006).

Sabe-se que a sinalização purinérgica, mediada por nucleotídeos e nucleosídeos, influenciam distintas respostas vasculares. Assim, com o endotélio intacto, o ATP liberado provoca vasodilatação, mas quando há dano endotelial, o ATP pode atuar como um vasoconstritor via receptores P2 no músculo liso vascular, o que pode levar ao vasoespasmolocal (BURNSTOCK, 2017). Ainda, quando o ATP é liberado como co-transmissor com a noradrenalina (NA) a partir de terminais nervosos simpáticos perivasculares, também leva à vasoconstrição (BURNSTOCK, 2017).

Dado o impacto das DCVs para a saúde pública no mundo todo, bem como a importância da SCR no contexto das DCVs, é importante ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares fisiopatológicos envolvidos nesta síndrome, o que pode impactar de maneira importante no direcionamento de futuras abordagens de prevenção e tratamento da SCR. Nossa aposta é de que, além dos mecanismos já conhecidos, a sinalização purinérgica também contribua para as modificações vasculares decorrentes da SCR. Desde a sua descoberta, na década de 1970, a importância do sistema purinérgico na regulação dos processos cardiovasculares vem ganhando destaque em patamares semelhantes ao de reguladores clássicos, como o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Muitos dos componentes desta sinalização já são utilizados na prática clínica para algumas patologias, como distúrbios na agregação plaquetária. Nesse sentido, a investigação dos receptores purinérgicos vasculares no contexto da SCR, em local distante do sítio isquêmico, pode representar um avanço tanto do ponto de vista de aprofundamento teórico, como do ponto de vista de vislumbrar novas estratégias terapêuticas.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Síndrome Cardiorrenal (SCR)**

Os rins são importantes órgãos excretores do corpo humano, que mantêm o equilíbrio hidroeletrólítico, contribuindo para a homeostase (SETTE et al., 2013). O sistema cardiovascular é o responsável pela circulação sanguínea, transportando nutrientes e oxigênio para as células (SETTE et al., 2013). Estes dois sistemas estão relacionados e, por esta razão, quando há um distúrbio de um órgão pode haver uma disfunção no outro (RONCO et al., 2010). Ainda, as doenças cardíacas e renais possuem fatores de risco em comum envolvendo a vasculatura, os quais incluem a hipertensão, diabetes, tabagismo, sedentarismo, entre outros (HADJIPHILIPPOU; KON, 2016). A coexistência dos distúrbios renais e cardiovasculares



aumenta significativamente a morbidade e a mortalidade dos pacientes. Neste contexto, um estudo realizado por Pavan documentou alta taxa de mortalidade em decorrência da IRA associada a uma disfunção cardíaca aguda (PAVAN, 2014).

Com a escassez de definição formal e estadiamento da doença cardíaca-renal, foi realizada uma conferência de consenso em 2008, da *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI), que denominou e definiu a síndrome cardiorrenal (SCR) como "distúrbios do coração e dos rins, em que a disfunção aguda ou crônica em um órgão pode induzir uma disfunção aguda ou crônica do outro" (RONCO et al., 2010). Em relação ao estadiamento da síndrome, a mesma foi categorizada em 5 tipos, sendo elas:

- Síndrome cardiorrenal aguda (tipo 1): é caracterizada por piora aguda da função cardíaca (edema pulmonar, choque cardiogênico, insuficiência cardíaca aguda), levando a uma lesão renal aguda (RONCO et al., 2010).
- Síndrome cardiorrenal crônica (tipo 2): é definida pelas anormalidades crônicas da função cardíaca, insuficiência cardíaca crônica, que causam uma progressiva e permanente doença renal crônica (RONCO et al., 2008).
- Síndrome renocárdica aguda (tipo 3): resulta da insuficiência renal aguda e é caracterizada por disfunção cardíaca aguda, cardiomiopatia urêmica, arritmias e isquemia (RONCO et al., 2010; HADJIPHILIPPOU; KON, 2016).
- Síndrome renocárdica crônica (tipo 4): na síndrome cardiorrenal tipo 4, ocorre primeiramente o desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) levando à disfunção cardíaca (RONCO et al., 2010; HADJIPHILIPPOU; KON, 2016).
- Síndromes cardiorrenais secundárias (tipo 5): esta síndrome é definida por disfunção cardíaca e renal simultânea como parte de uma condição sistêmica, seja ela aguda ou crônica (RONCO et al., 2010; HADJIPHILIPPOU; KON, 2016).

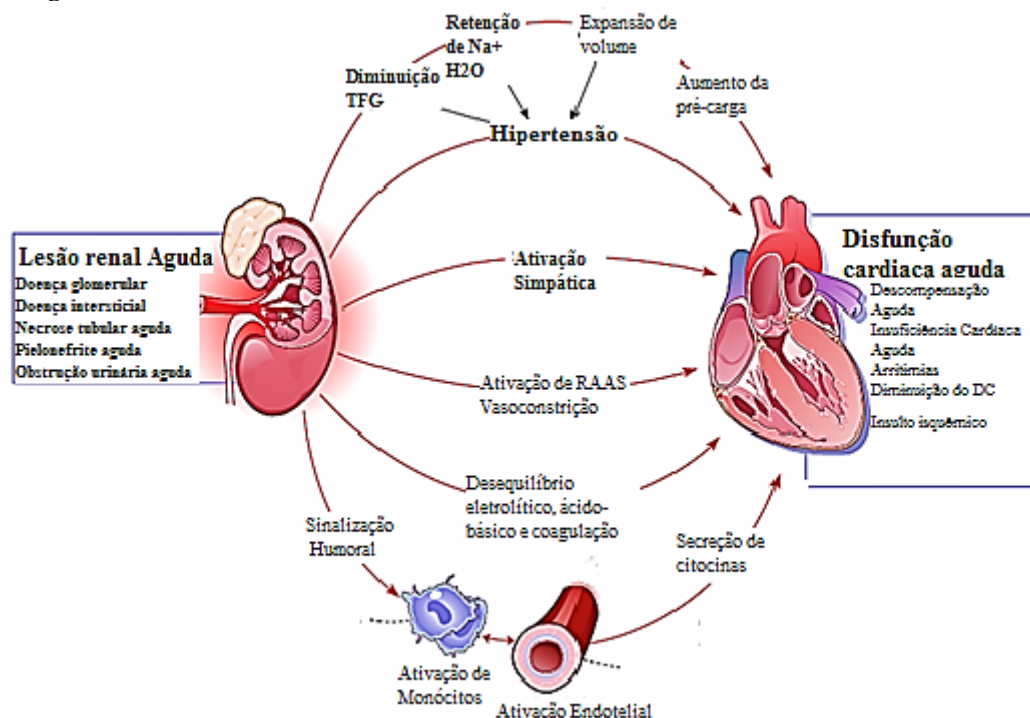
Neste trabalho foi desenvolvido o modelo de síndrome cardiorrenal tipo 3 (SCR3), a partir da oclusão do pedículo renal esquerdo de camundongos por 60 minutos, desenvolvendo a insuficiência renal, seguida de reperfusão por 8 ou 15 dias.

## 2.2 Fisiopatologia da SCR

O insulto primário ao órgão causa a ativação de uma série de mecanismos de resposta pelos sistemas neural e hormonal. Mecanismos evolutivos projetados para manter o volume sanguíneo constante e a perfusão de órgãos sob condições em constante mudança são claramente responsáveis pela SCR (BOCK; GOTTLIEB, 2010). Embora em alguns casos esses mecanismos sejam inicialmente compensatórios, muitos contribuem para a piora e progressão funcional da SCR em longo prazo (LIU et al., 2012). Existem poucos estudos sobre os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a lesão renal aguda (LRA) contribui para a lesão ou disfunção cardíaca aguda (BAGSHAW et al., 2013).

A maioria dos estudos avalia a patogênese da SCR em modelos de IR, pois resultam em efeitos distantes e as alterações observadas no coração podem ser importantes na morbimortalidade observada clinicamente (KELLY, 2003). Nestes modelos demonstrou-se que a LRA provoca uma resposta imune sistêmica caracterizada pelo aumento dose-resposta nos níveis circulantes de mediadores pró e anti-inflamatórios (BAGSHAW et al., 2013).

**Figura 1 - Síndrome Cardiorenal do tipo 3 (SCR3).** Interações fisiopatológicas entre coração e rim na SCR tipo 3 ou "síndrome renocárdica aguda", em que há piora abrupta da função renal, por exemplo, insuficiência renal aguda ou glomerulonefrite, causando distúrbio cardíaco agudo, como por exemplo, insuficiência cardíaca, arritmia, edema pulmonar. TFG= taxa de filtração glomerular; RAAS= Sistema Renina-Angiotensina-Adosterona; DC= Débito Cardíaco.



Fonte: (Adaptado de RONCO et al., 2008).

Quando a disfunção renal primária se desenvolve, ocorre ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), dos barorreceptores sensíveis à pressão, da sinalização celular e de mecanismos do sistema nervoso simpático (SNS). Em curto prazo, essas respostas ajudam a manter o equilíbrio hemodinâmico através da reposição de sódio e água (BOCK; GOTTLIEB, 2010). No longo prazo, entretanto, a sobrecarga aguda de sódio e volume fazem parte da patogênese (RONCO et al., 2008) e podem piorar a função renal por congestão venosa e hipertensão intra-abdominal, além de alterar o débito cardíaco, aumento da pré e pós-carga por meio de autorregulação corporal total (BOCK; GOTTLIEB, 2010).

A insuficiência cardíaca direita contribui diretamente na fisiopatologia da SCR, fornecendo pré-carga inadequada para manter o débito cardíaco, criando assim um preenchimento arterial insuficiente e perfusão renal comprometida. O comprometimento do débito cardíaco leva à diminuição da perfusão arterial renal e a ativação neuro-hormonal tem sido considerada um evento-chave na SCR (TABUCANON; TANG, 2020).

A liberação de renina e a ativação do RAAS conferem extrema avidéz ao sódio, vasoconstrição, retenção de líquidos, diminuição da perfusão glomerular e aumento de fatores pró-fibróticos do neurohormônio, levando à remodelação ventricular (BOCK; GOTTLIEB, 2010). Os neurohormônios precipitam uma cascata de eventos que geram uma lesão oxidativa que levam à disfunção endotelial, inflamação e morte celular, tanto nos rins quando no coração (GRIENDLING et al., 1994). A ativação do SNS pode levar à vasoconstrição e ao aumento da demanda de oxigênio no miocárdio, a qual pode acarretar em isquemia cardíaca se o suprimento de oxigênio não for suficiente (BAGSHAW et al., 2013). A resposta vasoconstritora é desencadeada pela liberação de NA na fenda sináptica, que se liga aos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos na membrana das células musculares lisas (KRIEGER; FRANCHINI; KRIEGER, 1996). Após a liberação, a NA liga-se aos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos promovendo aumento da permeabilidade do cálcio tanto na membrana celular como no retículo sarcoplasmático e inicia-se a contração da célula muscular lisa (KRIEGER; FRANCHINI; KRIEGER, 1996).

O sistema RAAS inicia-se pela renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins. A renina cliva o angiotensinogênio produzido no fígado, gerando angiotensina I. Através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), a angiotensina I é convertida em angiotensina II (AT-II) (KRIEGER; FRANCHINI; KRIEGER, 1996). A AT-II ativa a NADPH oxidase e NADH oxidase e sua ativação em um órgão tem o potencial de levar à disfunção progressiva em outro órgão através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BOCK; GOTTLIEB, 2010). O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de ERO (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil) e mecanismos endógenos de

defesa antioxidantes (BRAUNWALD, 2019). A inflamação altera o funcionamento da ERO e promove a formação de mais ERO e NA, contribuindo para os ciclos de retroalimentação positiva na conexão cardiorrenal (BONGARTZ et al., 2005).

A perda do equilíbrio oxidativo resulta na ativação e produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, IL-1, PCR e TNF- $\alpha$  (BAGSHAW et al., 2013). Sabe-se que essas citocinas têm efeitos prejudiciais no coração. No modelo de IR, os efeitos negativos do TNF- $\alpha$  incluem disfunção ventricular esquerda e apoptose de miócitos cardíacos e células endoteliais (KELLY, 2003). As concentrações elevadas de TNF- $\alpha$  entre os pacientes com insuficiência cardíaca sintomática correlacionam-se diretamente com a piora da gravidade da doença (KRIEGER; FRANCHINI; KRIEGER, 1996).

A injúria renal também contribui para alterações funcionais na capacidade de resposta das células imunes e alterações na migração de leucócitos, adesão e extravasamento nos tecidos, no rim e em órgãos distais, como o coração (YAP; LEE, 2012). Os leucócitos são células importantes no tocante à disfunção cardíaca após isquemia e bloqueio da função (MA et al., 1992). A contagem elevada de glóbulos brancos está associada a um risco aumentado de infarto agudo do miocárdio (ERNST et al., 1987). Outros fatores como hipertensão, anemia e toxinas urêmicas também podem contribuir para a SCR (LIU et al., 2012).

### **2.3 Síndrome Cardiorrenal e Sistema Vascular**

A manutenção do volume sanguíneo, do tônus vascular e da estabilidade hemodinâmica depende de um conjunto de finas interações entre o coração e o rim. Sendo assim, a SCR não afeta apenas estes órgãos, mas também o sistema vascular, o qual é influenciado através de fatores neuro-humorais (BOCK; GOTTLIEB, 2010), mecânicos, bioquímicos e de toxinas urêmicas ligadas a proteínas (do inglês PBUTs, *protein-bound uremic toxins*) (GUO et al., 2017).

Após injúria, as células endoteliais expressam moléculas de adesão como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a P-selectina em sua superfície, as quais suportam a ligação e a invasão de células inflamatórias (NISHIMURA et al., 2017). Além disso, alterações pró-inflamatórias patológicas são iniciadas por eventos que ocorrem durante a isquemia. Tais eventos preparam o cenário para a ativação do sistema imunológico inato e adaptativo durante a reperfusão, efeitos que são amplificados pelo estresse oxidativo induzido pelo restabelecimento do suprimento sanguíneo (YU; KALOGERIS; KORTHUIS, 2019).

Como já mencionado, os fatores neuro-humorais são fortes precipitadores e mediadores de uma cascata de lesão oxidativa que leva à disfunção endotelial generalizada, inflamação e morte celular na SCR (BOCK; GOTTLIEB, 2010). O sistema renina-angiotensina está intrinsicamente ligado a este processo, pois é ativado pelo sistema nervoso simpático renal a partir da redução da perfusão renal, levando ao aumento da reabsorção de sódio e água, expandindo assim o volume plasmático (BONGARTZ et al., 2005).

A sobrecarga do volume plasmático em decorrência da ativação do RAAS resulta na congestão venosa local, afetando os rins e os órgãos esplênicos, levando à retenção renal e esplênica. Além disso, a congestão venosa local pode desencadear uma congestão vascular sistêmica. Portanto, os efeitos da congestão venosa resultam em respostas mecânicas, biológicas e imunológicas, que contribuem para o desenvolvimento da SCR (TABUCANON; TANG, 2020). Ainda, a AT-II ativa a NADPH e a NADH oxidase nas CMLV, miócitos cardíacos e células epiteliais tubulares renais, gerando superóxido (GRIENDLING et al., 1994), uma ERO que contribui nos processos de senescência, inflamação e disfunção orgânica progressiva (BOCK; GOTTLIEB, 2010).

Os impactos que a SCR promove na vasculatura, em sítios distantes do sítio de IR, ainda não estão bem elucidados. No entanto, a elevação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em pacientes com doença renal, insuficiência cardíaca congestiva e fenômenos ateroscleróticos podem sugerir um possível papel dessas citocinas na modulação da inflamação durante a SCR3 (COLOMBO et al., 2012).

A produção de citocinas pró-inflamatórias como consequência da insuficiência cardíaca pode ser decorrente da ativação neuro-hormonal, congestão venosa ou congestão venosa sistêmica (TABUCANON; TANG, 2020). As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  interrompem o equilíbrio vasomotor, aumentando a degradação do NO através da ativação da NADPH oxidase e aumentando a produção de superóxido (KAUR; DHAUNSI; TURNER, 2004). Assim, o aumento do estresse oxidativo pode ser responsável pela diminuição da vasodilatação mediada pelo NO (COLOMBO et al., 2012).

Além disso, citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- $\alpha$ , promovem a adesão de leucócitos ao endotélio via depleção de NO e expressão de moléculas de adesão (COLOMBO et al., 2012). Em resposta ao estiramento biomecânico da SCR, o próprio endotélio vascular pode se tornar uma fonte primária de produção de citocinas. Vários estudos *in vitro* mostraram que a endotelina-1 (ET-1) (HASDAI et al., 1997), IL-6 (KAWAI et al., 2002) e TNF- $\alpha$  (WANG et al., 2003) podem ser secretadas poucas horas após a exposição ao estiramento (COLOMBO et al., 2012). Outro fator importante a ser considerado é que AT-II, além de aumentar o estresse

oxidativo, induz a expressão de TNF- $\alpha$  (SRIRAMULA; FRANCIS, 2015). Ambos induzem a atividade de metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2016) desempenhando um papel importante na hipertrofia vascular na hipertensão.

Além dos efeitos inflamatórios, as células endoteliais estão envolvidas na patogênese das anormalidades da coagulação durante a infecção grave (LEVI; VAN DER POLL, 2010). A ativação da coagulação produz proteases que interagem com os zimogênios da proteína de coagulação e também com receptores celulares específicos para induzir as vias de sinalização. As proteases de coagulação ativadas podem afetar receptores celulares específicos nas células inflamatórias e nas células endoteliais e, assim, modular a resposta inflamatória (LEVI; VAN DER POLL, 2010). Existe, portanto, existe uma conversa cruzada entre a inflamação e coagulação.

Existem diversas moléculas envolvidas na cascata de coagulação, no entanto, o fibrinogênio (FBG), uma glicoproteína de 340 kDa com diferentes locais de ligação, desempenha papéis sobrepostos na coagulação do sangue, fibrinólise, interações celulares e de matriz, resposta inflamatória, cicatrização de feridas e neoplasia (MOSESSON, 2005). Além de ser uma molécula importante na coagulação, o fibrinogênio interage com o ambiente perivascular e afeta o desenvolvimento de doenças de maneiras que vão além de seus papéis tradicionais na cascata hemostática aguda (DAVALOS; AKASSOGLU, 2012). O fibrinogênio foi identificado como um fator de risco significativo e também como um modulador de processos inflamatórios em várias condições patológicas (LEVI; VAN DER POLL, 2010). Neste sentido, foi demonstrado que FBG é regulador chave do desenvolvimento de fibrose renal após lesão renal (CRACIUN et al., 2014) e está associado à formação e progressão da aterosclerose (GUO et al., 2009).

Ao contrário da inflamação, estresse oxidativo, lesão renal, disfunção cardíaca e problemas vasculares e endoteliais, o acúmulo sistêmico de toxina urêmica ligada à proteína (PBUT) foi reconhecido como um contribuinte não convencional para a SCR (SAVIRA et al., 2019). O comprometimento renal causa uma sobrecarga de PBUTs que, ligados à albumina, tornam-se solutos não dialisáveis (SAVIRA et al., 2019). Sendo assim, as PBUTs têm sido apontadas como um fator de risco não tradicional para disfunção cardíaca, renal e vascular (SAVIRA et al., 2019).

As PBUTs impactam as CMLV e as CE. Os principais efeitos dos PBUTs nas CMLV estão na regulação da proliferação celular, migração, senescência, calcificação e indução de inflamação, os quais estão profundamente ligados à ocorrência de aterosclerose e eventos cardiovasculares subsequentes (GUO et al., 2017). Nas CE, as PBUTs promovem vasodilatação

endotélio-dependente anormal, acompanhada de diminuição da produção de NO, levando à rigidez e calcificação da artéria (CHUNG et al., 2009) e aumento do fator de von Willebrand, fator tecidual (TF), VCAM-1 e ICAM-1 (SABATIER et al., 2009).

Sabe-se que o ATP é co-liberado de terminações nervosas em conjunto com a NA, atuando nos processos de vasoconstrição, controle do tônus e da pressão arterial (BURNSTOCK, 2017). Nesse contexto, assim como as toxinas urêmicas, é possível hipotetizar que os componentes da sinalização purinérgica também estejam entre os fatores de risco não tradicionais para a disfunção vascular observada na SCR.

## 2.4 Sinalização Purinérgica

Adenosina 5'-trifosfato (ATP) é um nucleotídeo que está presente em todas as células. Esta molécula é constituída pelo nucleosídeo adenosina, associado a três radicais fosfatos conectados em cadeia. É um importante substrato para as reações metabólicas com gasto energético, pois armazena energia em suas ligações químicas (WATSON et al., 2015). Os nucleotídeos também estão presentes na constituição das moléculas de DNA e RNA (AGTERESCH et al., 1999).

O papel do ATP, entretanto, não se limita apenas à sua função intracelular. Em 1929, Drury e Szent-Györgyi publicaram um trabalho sobre o papel dos compostos purínicos extracelulares, em particular da adenosina, atuando no coração e nos vasos sanguíneos com efeito dilatador (DRURY; SZENT-GYÖRGYI, 1929). Mais tarde, na década de 1970, Burnstock propôs o conceito de sinalização purinérgica, descrevendo o ATP como uma molécula sinalizadora, atuando como o neurotransmissor responsável pela transmissão neuromuscular não-adrenérgica e não-colinérgica em bexiga urinária (BURNSTOCK, 1972).

A sinalização purinérgica não é efetuada apenas pelo ATP. Outros nucleotídeos purínicos, como adenosina 5'-difosfato (ADP), e o nucleosídeo adenosina; e pirimidínicos, como uridina 5'-trifosfato (UTP) e uridina 5'-difosfato (UDP), também podem atuar como efetores dessa sinalização (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Além da neurotransmissão, o ATP está envolvido na regulação de vários processos biológicos, como contração muscular, função cardíaca, ativação e agregação plaquetária, indução de apoptose e atividade anticâncer (BOURS et al., 2006). Ainda, tem efeitos na função gastrointestinal e hepática (ROMAN; FITZ, 1999), na resposta imune e sobre os efeitos inotrópicos, cronotrópicos e arritmogênicos no miocárdio (VASSORT, 2001).

Para que atuem como moléculas sinalizadoras entre as células, os nucleotídeos precisam atingir o meio extracelular. Assim, os nucleotídeos podem ser liberados no meio extracelular de diversas maneiras, como explicado a seguir. Tendo em vista que as células possuem grande quantidade de nucleotídeos em seu citosol, a lise celular, o choque traumático e a inflamação, podem levar à liberação dos nucleotídeos para o meio extracelular (BOURS et al., 2006). Ademais, pode ocorrer a liberação de nucleotídeos por exocitose por células secretoras/excitatórias, como terminais nervosos e células cromafins, em que há liberação de vesículas contendo nucleotídeos, de um modo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (YEGUTKIN, 2008a). Outra via de liberação de sinalizadores purinérgicos se dá através de tecidos não excitáveis, como células epiteliais e endoteliais, células hematopoiéticas, entre outras, sob tensão de cisalhamento, pressão hidrostática, como também em resposta à bradicinina, serotonina e outros agonistas farmacológicos de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  (YEGUTKIN, 2008b).

A sinalização por estas moléculas ocorre através de diferentes receptores purinérgicos (purinoceptores) ancorados à membrana plasmática. Após sua liberação no compartimento extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeos interagem com os receptores da membrana celular, desencadeando a resposta de sinalização. Os receptores purinérgicos são classificados em dois grandes tipos, P1 e P2, sendo os do tipo P1 responsivos à adenosina e os do tipo P2 responsivos ao ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-glicose (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Entre os receptores purinérgicos do tipo P1, são reconhecidos quatro subtipos:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ , acoplados à proteína G (BURNSTOCK, 2007a; BURNSTOCK, 2007b). Na ativação dos receptores P1, o segmento intracelular do receptor interage com a proteína G apropriada, com subsequente ativação do mecanismo de transdução do sinal intracelular. Os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  associam-se à proteína  $G_s$  e podem ativar a via do AMPc. Os receptores  $A_1$  e  $A_3$ , no entanto, quando associados a proteína  $G_i$  podem impedir a mesma via (JACOBSON; GAO, 2006).

Os receptores P2 são subclassificados de acordo com seu mecanismo de ação. Assim, são reconhecidos sete subtipos de receptores ionotrópicos P2X ( $P2X_{1-7}$ ) e oito subtipos de receptores metabotrópicos P2Y acoplados à proteína G ( $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$ ,  $P2Y_{11}$ ,  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{13}$  e  $P2Y_{14}$ ) (BURNSTOCK, 2007b). Diferentemente dos demais purinoceptores, os membros da família dos receptores P2X exibem uma topologia de subunidades de caudas N e C-terminais intracelulares, possuindo motivos de ligação de consenso para proteínas quinases, além de duas regiões transmembrana e uma alça extracelular rica em resíduos de cisteína (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). A ativação desses receptores pelo ATP causa uma alteração na condutância iônica da membrana, resultando no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular,



gerando um potencial de ação que está associado à vasoconstrição da musculatura lisa e visceral (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

Os receptores P2Y metabotrópicos são determinados por uma topologia de subunidade de um terminal NH<sub>2</sub> extracelular e um terminal COOH intracelular, o último possuindo motivos de ligação de consenso para proteínas quinases e sete regiões transmembrana, que ajudam a formar a bolsa de acoplamento (BURNSTOCK, 2007a). Enquanto P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub> são ativados basicamente por nucleosídeos trifosfatados, os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>12</sub> são ativados principalmente por nucleosídeos difosfatados (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). Todos os receptores P2Y acoplam-se a proteínas G heterotriméricas (G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>i/o</sub> e G<sub>12/13</sub>), consistindo de uma subunidade  $\alpha$  (G $\alpha$ ) firmemente associada às subunidades  $\beta\gamma$  (G $\beta\gamma$ ) na superfície interna da membrana plasmática, estimulando diferentes efetores (NISHIMURA et al., 2017), ativando a fosfolipase C (PLC), libertando cálcio intracelular ou afetando a adenilil ciclase e alterando os níveis de AMP cíclico (BURNSTOCK; KNIGHT 2004).

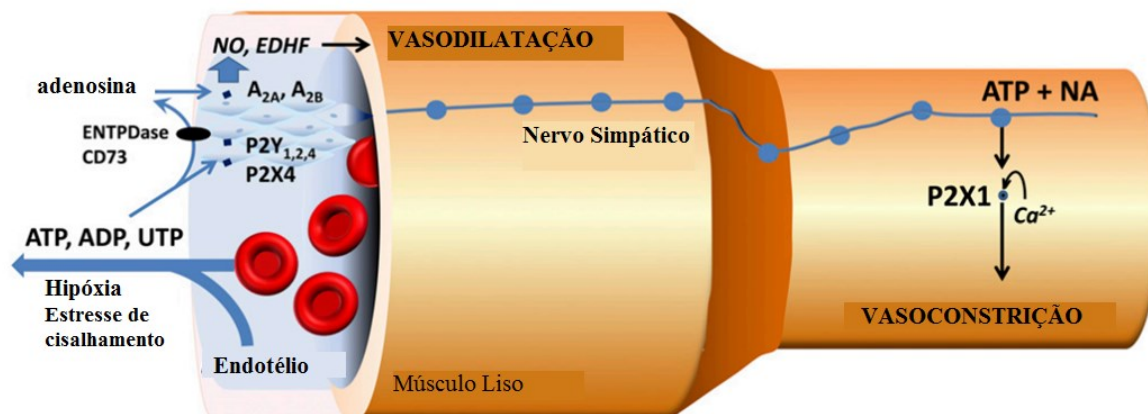
A sinalização purinérgica é encerrada pela ação das ectonucleotidases, enzimas específicas que hidrolisam os nucleotídeos até seus respectivos nucleosídeos e fosfatos livres. Atualmente, são reconhecidas quatro famílias de ectonucleotidases, as E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), as E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases), as fosfatases alcalinas e as ecto-5'-nucleotidases, todas com ampla distribuição tecidual (ZIMMERMANN, 2000). São moléculas de grande importância, já que modulam a sinalização purinérgica, regulando a quantidade e disponibilidade dos agonistas dos purinoceptores.

## 2.5 Receptores Purinérgicos no Sistema Vascular

Sabe-se que a sinalização pelos nucleotídeos causa a vasoconstrição e a vasodilatação, estimula o crescimento de CMLV, regula a agregação plaquetária, a coagulação, o remodelamento vascular, a angiogênese, entre outros processos (ERLINGE; BURNSTOCK, 2008). No sistema vascular, as CE têm um papel importante, pois medeiam a vasodilatação para contrabalancear os efeitos contráteis ou a liberação neural de ATP e NA (Figura 2) (BURNSTOCK, 2007a).

**Figura 2: Controle do tônus vascular pela sinalização purinérgica.** *O ATP liberado dos terminais nervosos simpáticos atua nos receptores P2X<sub>1</sub> do músculo liso causando vasoconstrição. Dentro do vaso sanguíneo, os nucleotídeos liberados principalmente do endotélio e de eritrócitos por estresse de*

*cisalhamento e hipóxia atuam nos receptores endoteliais P2X<sub>4</sub> e P2Y, liberando NO e EDHF, levando à vasodilatação.*



Fonte: (Adaptado de BURNSTOCK; RALEVIC, 2014).

O ATP liberado pelo estresse de cisalhamento atua nos receptores P2 endoteliais para estimular a vasodilatação, via liberação de NO, EDHF e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (BURNSTOCK, 2017). O mecanismo de liberação de NO induzido por ATP a partir de CE, provavelmente, envolve canais Cl<sup>-</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> e proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (ABBRACCHIO et al., 2006).

Os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> são dominantes nas células endoteliais vasculares, onde medeiam a liberação de NO e subsequente vasodilatação, bem como a proliferação celular e a expressão de proteínas de adesão para monócitos (ABBRACCHIO et al., 2006). Com um endotélio intacto, o ATP liberado provoca vasodilatação, mas quando há dano endotelial, o ATP pode atuar como um vasoconstritor via receptores P2 no músculo liso vascular, o que pode levar ao vasoespasmolocal (BURNSTOCK, 2017). Quando o ATP é liberado como co-transmissor com a NA, a partir dos terminais nervosos simpáticos perivasculares, produz vasoconstrição. O ATP é liberado mais precocemente do que a NA, onde o induz a fase inicial da vasoconstrição, enquanto a NA inicia o desenvolvimento mais lento e constrições tônicas mais duradouras (BURNSTOCK, 2017). As ações contráteis do ATP liberadas pelos terminais nervosos simpáticos perivasculares são mediadas principalmente pelos receptores P2X<sub>1</sub>, confirmados pelo uso de camundongos *knockout* para este receptor (NICHOLS et al., 2014).

As hemácias contêm concentrações milimolares de ATP, o qual pode ser liberado dos eritrócitos humanos em resposta à deformação mecânica ou hipóxia (BURNSTOCK, 2017). O ATP liberado se liga aos receptores P2Y no endotélio e estimula a vasodilatação. Assim, os glóbulos vermelhos funcionam como um sensor de O<sub>2</sub>, contribuindo para a regulação do fluxo sanguíneo e da liberação de O<sub>2</sub>, disponibilizando ATP de acordo com o estado de oxigenação

da hemoglobina. Já as CMLV expressam receptores P2Y<sub>12</sub> que medeiam a contração após a estimulação com ADP (ERLINGE; BURNSTOCK, 2008).

Os receptores P2Y<sub>1</sub> já foram clonados e caracterizados em humanos, ratos, camundongos, vacas, perus e *Xenopus* (BURNSTOCK, 2007). Estão envolvidos na ativação inicial da agregação plaquetária, na alteração da forma das plaquetas e na ativação do colágeno em condições de cisalhamento (HECHLER; CATTANEO; GACHET, 2005). A estimulação de P2Y<sub>1</sub> em células endoteliais humanas ativa o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), levando à angiogênese (BURNSTOCK, 2017).

Um estudo com camundongos *knockout* para P2Y<sub>6</sub> revelou o papel central deste receptor na determinação do tônus miogênico arterial (KAUFFENSTEIN et al., 2016). Aumentos na pressão induzem tônus miogênico na artéria mesentérica e essa resposta é prejudicada pela inibição farmacológica e pelo nocaute do gene P2Y<sub>6</sub> (NISHIMURA et al., 2017). Sabe-se também que UDP estimula o crescimento de células musculares lisas cultivadas da aorta de ratos através da ativação dos receptores P2Y<sub>6</sub> (BURNSTOCK, 2017). De acordo com Gschwend e colaboradores (2003), a insuficiência cardíaca crônica leva ao aumento da resistência vascular periférica resultante do aumento do tônus miogênico das artérias mesentéricas de ratos (GSCHWEND et al., 2003). A deficiência de P2Y<sub>6</sub> reduz os aumentos crônicos induzidos por insuficiência cardíaca no tônus miogênico, pois, provavelmente, a pressão induz a liberação de UDP através do hemicanal Cx43 e P2X<sub>7</sub>, no qual o UDP age de maneira autócrina ou parácrina via P2Y<sub>6</sub> para induzir vasoconstrição (NISHIMURA et al., 2017).

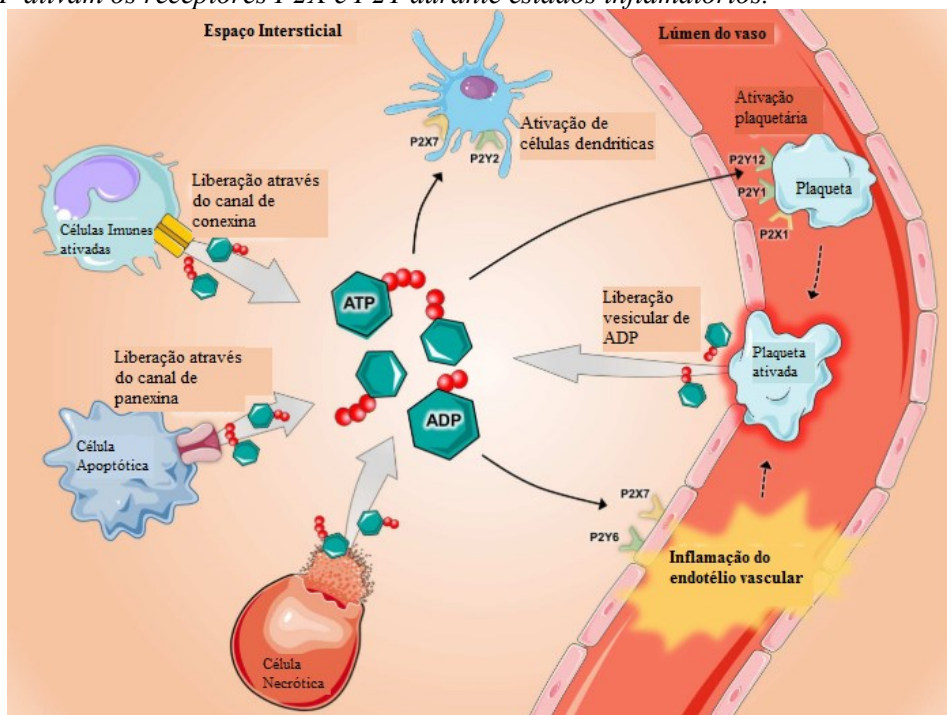
Estudos utilizando rim de rato isolado e perfundido demonstraram que Up<sub>4</sub>A, um dinucleotídeo, é um potente vasoconstritor secretado pelas CE. A porção uridina pode conferir uma afinidade para os subtipos de receptores P2Y, afetando o tônus vascular através dos receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub> (JANKOWSKI et al., 2005). A migração de CMLV é induzida por UTP e Up<sub>4</sub>A, através da ativação de receptores P2Y<sub>2</sub>; e UDP, atuando através de receptores P2Y<sub>6</sub>. Ocorre uma regulação positiva dos receptores P2Y<sub>2</sub> nas células do músculo liso vascular induzida por citocinas, resultando em respostas mitogênicas aumentadas à UTP e ATP, um evento chave no remodelamento vascular (BURNSTOCK, 2017).

Os receptores purinérgicos também atuam como reguladores da inflamação dos leitos vasculares. Nos últimos anos, o papel destes receptores na sinalização pró-inflamatória na vasculatura tem sido evidenciada (Figura 4). Os receptores da família P2Y estão amplamente distribuídos nas células imunes (neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T) (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; BOURS et al., 2006), nas células sanguíneas e

vasculares, e estão envolvidos na modulação da inflamação e nas respostas imunológicas (HECHLER; GACHET, 2015). O ATP e outros nucleotídeos liberados em condições patológicas agem como padrões moleculares associados ao dano, conhecidos como DAMPs (do Inglês, *damage-associated molecular patterns*), ativando e recrutando células do sistema imunológico (FERRARI et al., 2021).

Após o dano vascular, por exemplo, o receptor P2Y<sub>1</sub> atua no recrutamento e adesão *in vitro* de leucócitos nas artérias femorais inflamadas de ratos, quando estimulados por TNF- $\alpha$  (ZERR et al., 2011). Os receptores P2Y<sub>2</sub> são o subtipo dominante nos macrófagos. ATP e UTP, atuando através de receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub>, promovem a adesão de neutrófilos às células endoteliais (ABBRACCHIO et al., 2006). Seye e colaboradores (2003), avaliando células endoteliais da linhagem HCAEC, indicaram que o receptor P2Y<sub>2</sub> estimulou a expressão da VCAM-1 de maneira dose e tempo-dependente em resposta ao ATP e ao UTP (SEYE et al., 2003). Garcia e colegas (2014), mostraram que o receptor P2Y<sub>6</sub> aumenta as respostas pró-inflamatórias nos macrófagos e exibe um papel pró-aterogênico nas células hematopoiéticas (GARCIA et al., 2014).

**Figura 3: Liberação de ATP durante condições inflamatórias.** Durante condições de inflamação, como na lesão por IR, hipóxia, doença inflamatória do intestino, lesão pulmonar aguda e trombose vascular, ATP e ADP são liberados no espaço extracelular. Uma vez liberados, o ATP e o ADP atuam como potentes moléculas de sinalização, ligando-se e ativando os receptores P2X (canais iônicos) e os receptores P2Y (receptores acoplados à proteína G). Na imagem estão representados exemplos de como ATP e ADP ativam os receptores P2X e P2Y durante estados inflamatórios.



Fonte: (Adaptado de (LE et al., 2019).)

Além disso, o TNF- $\alpha$  também estimula a expressão de P2Y<sub>6</sub> em macrófagos, aumentando a secreção de citocinas e a resposta inflamatória (RIEGEL et al., 2011). Bar e colaboradores avaliaram a função do receptor P2Y<sub>6</sub> em macrófagos, CE e CMLV da aorta torácica de camundongos, a partir da geração de animais deficientes para esse receptor. Assim, a ativação do receptor P2Y<sub>6</sub> por UDP promoveu a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e proteína inflamatória de macrófago (MIP-2) (BAR et al., 2008). Neste sentido, as citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel fundamental na instalação e progresso da inflamação e estão correlacionadas com a sinalização purinérgica (HECHLER; GACHET, 2015). No entanto, os efeitos que a SCR3 promove na vasculatura e sua relação com a sinalização purinérgica em sítios distantes do sítio de IR, ainda não estão claros. Desta forma, no presente trabalho, pioneiro no nosso grupo de pesquisa com este modelo experimental, a elucidar o impacto da SCR3 sobre a expressão dos receptores purinérgicos em aortas de camundongos submetidos à IR renal unilateral.

## **CAPÍTULO 2**

### **STUDY OF VASCULAR CHANGES IN CARDIORENAL SYNDROME: ANALYSIS OF EXPRESSION LEVELS OF PURINERGIC RECEPTORS**

Isabella Cardoso Silva, Isabela Dorta Molina Hernandez, Geovane Felipe Alves, Raquel Silva Neres dos Santos, Carolina Victória Junho, Marcela Sorelli Carneiro-Ramos, Cristina Ribas Fürstenau.

## Vascular changes in cardiorenal syndrome: a look at purinergic receptors levels

Isabella Cardoso Silva<sup>a</sup>, Isabela Dorta Molina Hernandez<sup>b</sup>, Geovane Felipe Alves<sup>b</sup>, Raquel Silva Neres dos Santos<sup>b</sup>, Carolina Victória Junho<sup>b</sup>, Marcela Sorelli Carneiro-Ramos<sup>b</sup>, Cristina Ribas Fürstenau<sup>b,\*</sup>.

<sup>a</sup>Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Patos de Minas, MG, Brazil

<sup>b</sup>Center for Natural and Human Sciences (CCNH), Federal University of ABC (UFABC), Santo André, SP, Brazil.

\*Corresponding author

E-mail: c.furstenau@ufabc.edu.br

### ABSTRACT

*Aims:* Cardiorenal Syndrome (CRS) type 3 is caused by acute renal failure generating acute cardiac dysfunction. Although blood vessels are also affected by CRS there are few studies upon vascular alterations in vessel beds distant from renal ischemia. Purinergic signaling significantly impacts the vascular system, regulating distinct processes, including vascular tone and inflammation. The aim of this research was to analyze the gene expression levels of purinergic receptors P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> and pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and  $\alpha$ -chain fibrinogen (FGA) in aortas from mice submitted to CRS type 3 (CRS3).

*Main methods:* Aortas from C57BL/6 mice were submitted to renal failure by unilateral ischemia of the left pedicle for 60 minutes, followed by reperfusion times of 8 and 15 days. Morphometric analyzes and serum measurements were performed to confirm the experimental model. Total RNA from thoracic aortas of Sham animals (control group), IR 8 and IR 15 were extracted for gene expression analysis by RT-qPCR.

*Key findings:* After 15 days of reperfusion, serum urea levels and the right kidney weight/tibia length ratio (RKW/ TL) showed significant increases, validating the experimental model. P2Y<sub>1</sub> gene expression decreased about 82% after 8 and 15 days of reperfusion. mRNA levels of P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  did not change between experimental groups. However, the expression of FGA showed an important increase, approximately 690 times, in the aorta of IR 15 mice compared to Sham animals.

*Significance:* Data point that vascular purinergic signaling is impacted by CRS3, probably contributing to the establishment of the inflammatory status on blood vessels distant from renal ischemia. New studies are needed to better understand the significance of the increased aorta FGA in response to renal ischemic/ reperfusion injury. Finally, these results may hereafter help in further diagnostic and therapeutic directions for patients with kidney disease.

Keywords: Kidney Disease. Cardiorenal Syndrome. Inflammation. Aorta. P2 Receptors.

### Introduction

Cardiorenal syndrome (CRS) is characterized by primary kidney or heart dysfunction that initiates combined involvement of both organs. Five types of CRS are known, and when

the acute damage occurs primarily in the kidney causing an acute cardiac dysfunction it is called cardiorenal syndrome of type 3 (CRS3)[1,2].

Maintenance of blood volume, vascular tone and body hemodynamic stability depends on a set of close interactions between the heart and kidney [3]. Therefore, CRS3 not only affects the kidneys and heart but also the vascular system [4]. During renal ischemia, neurohumoral, mechanical, and biochemical factors initiate vascular alterations [5]. To support binding and invasion of inflammatory cells, endothelial cells (EC) express adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and P-selectin on their surface [6]. Such events set the stage for the activation of the innate and adaptive immune systems during reperfusion, effects that are amplified by oxidative stress induced by restoration of the blood supply [7]. The impact of CRS on the vasculature, especially in blood vessels distant from the I/R site, is still not completely understood. However, the elevation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in patients with kidney disease, congestive heart failure, and atherosclerotic phenomena may suggest a possible role of these cytokines in modulating vascular inflammation during CRS3 [4].

Purinergic signaling mediated by ATP and other purines and pyrimidines act significantly on blood vessels, influencing vascular tone regulation, stimulating the growth of endothelial cells, promoting platelet aggregation, among other processes [8]. Considering that cells have large amounts of nucleotides in their cytosol, these can be released into the extracellular environment in different ways, such as cell lysis, traumatic shock, shear stress, inflammation, and others [9]. Extracellular ATP binds to P2 type purinergic receptors, causing vasodilation through the production of nitric oxide (NO), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) [10]. ATP can also act as a vasoconstrictor when released together with norepinephrine (NA) and binding to P2 receptors on vascular smooth muscle cells (VSMC) [11].

In addition to controlling vasomotion, purinergic signaling also participates in the modulation of inflammatory processes in the vasculature. After vascular damage and under TNF- $\alpha$  stimulation, P2Y<sub>1</sub> acts on *in vitro* recruitment and adhesion of leukocytes in inflamed femoral arteries of rats[12]. Furthermore, TNF- $\alpha$  also stimulates the expression of the P2Y<sub>6</sub> receptor in macrophages, increasing cytokine secretion and inflammatory response [13]. In EC, up-regulated P2Y<sub>2</sub> receptor increases the expression of VCAM-1 [14], which promotes the binding of monocytes and lymphocytes to those cells, contributing to the installation of the inflammatory condition.



Many of the components of purinergic signaling are already used in clinical practice for the treatment of some pathologies, like platelet aggregation disorders for example. The investigation of vascular purinergic receptors in the context of CRS may represent an advance both from the standpoint of theoretical deepening and from the standpoint of hereafter devising new therapeutic strategies for patients with kidney disease. From this framework, this work aims to clarify the impact of CRS3 on the expression levels of vascular purinergic receptors in the aorta of mice.

## **Materials and methods**

The aortas used in experimental protocols were obtained from mice submitted to the model of renal failure by ischemia and reperfusion (I/R), as explained further.

### *Experimental groups*

The experimental protocols were approved by the Research Ethics Committee of UFABC (CEUA-UFABC protocol nº 5231210417). The experiments were done following the Federal Law Arouca (2008). Male C57BL/6 mice, 6 to 8 weeks old, weighing between 20 and 28 g, were kept in collective cages (maximum of five animals/ cage), and subjected to a 12-hour light/dark cycle at a room temperature of 25 °C, with water and mouse chow ad libitum. Renal failure was performed according to Feitoza et al. (2008), as described in the supplementary material. The animals were distributed into the following experimental groups:

- Sham group: animals that did not suffer renal pedicle occlusion, only the surgical procedure, and were euthanized after 15 days;
- Group IR 8 days of reperfusion: animals that suffered renal pedicle occlusion for 60 minutes, the blood flow was released subsequently, and were euthanized after 8 days;
- Group IR 15 days of reperfusion: animals that suffered renal pedicle occlusion for 60 minutes, the blood flow was released subsequently, and were euthanized after 15 days.

The reperfusion times mentioned before were chosen according to previous studies that identified morphological, molecular and functional changes in the heart and kidneys of animals in these periods [15,16]. Euthanasia procedures are detailed in the Supplementary Material (Figure S1). The confirmation of the renal failure occurred based on the measurement of serum urea levels using LabTest Diagnóstica AS kits (Lagoa Santa, Minas Gerais), according to the

manufacturer's instructions. Besides, morphometric parameters of body weight (g), heart weight (g), right and left kidney weight (g) and tibia length (mm) validated the experimental model.

#### *Gene Expression Analysis by Real Time PCR*

Real-time PCR (qPCR) was used to assess the gene expression levels of purinergic receptors P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> and for the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and Fibrinogen  $\alpha$  (FGA) in mouse aortas thoracic of all experimental groups (Sham, IR 8 days of reperfusion and IR 15 days of reperfusion). Initially, the Trizol® reagent (GIBCO - Life Technologies) was used for the extraction of total RNAs. Then, the extracted RNA was reverse transcribed to produce cDNA, using the Proto Script kit (New England BioLabs®). After that, cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) under ideal conditions. Specific primers for P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> and  $\beta$ -actin were synthesized according to Kauffenstein et al. [17]. Primers for IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were kindly provided by Profa. Dr. Marcela Sorelli Carneiro Ramos. The FGA primer was designed using Primer Blast NCBI, MFEprimer-3.1 and Oligo Analyzer tools. All primers sequences used are depicted in Table 1. PCR was performed using SYBR Green PCR mixture (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a thermocycler (real-time PCR, Agilent's Stratagene Real Time PCR). For each gene of interest and each experimental group, samples were run in duplicate in two or three independent experiments and data were normalized with the  $\beta$ -actin gene.

**Table 1: List of primers used in gene expression evaluation**

Gene	Protein	Sequence of <i>Primers</i> 5' – 3'	
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
P2ry1	P2Y <sub>1</sub>	CTGTGTGGACCCATTCTTT	TCGGGACAGTCTCCTTCTGA
P2ry2	P2Y <sub>2</sub>	TGCGCTGATGAACTTTGTTT	GGCAGGAAACAGGAAGAACA
P2ry6	P2Y <sub>6</sub>	TCTTCCATCTTGCATGAGACA	TCTTCCATCTTGCATGAGACA
FGA	Fibrinogen $\alpha$	GGGTACCTGCCTCATCTTG	GGCATTGTGGTTCCAGTCA
IL1B	IL-1 $\beta$	AGTTGACGGACCCAAAAGA	GCTCTTGTTGATGTGCTGCT
IL6	IL-6	CTCTGCAAGAGACTTCCATCC	CTCTGTGAAGTCTCCTCTCCG
TNFA	TNF- $\alpha$	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
ACTB	$\beta$ -actin	GGGAAATCGTGCGTGACATC	GCCACAGGATTCCATACCCAA

#### *Analysis of results*

The results obtained were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant for values of  $p < 0.05$ . The GraphPad Prism software, version 6.00 for Windows was used as a computational tool for statistical analysis of the data.

## Results

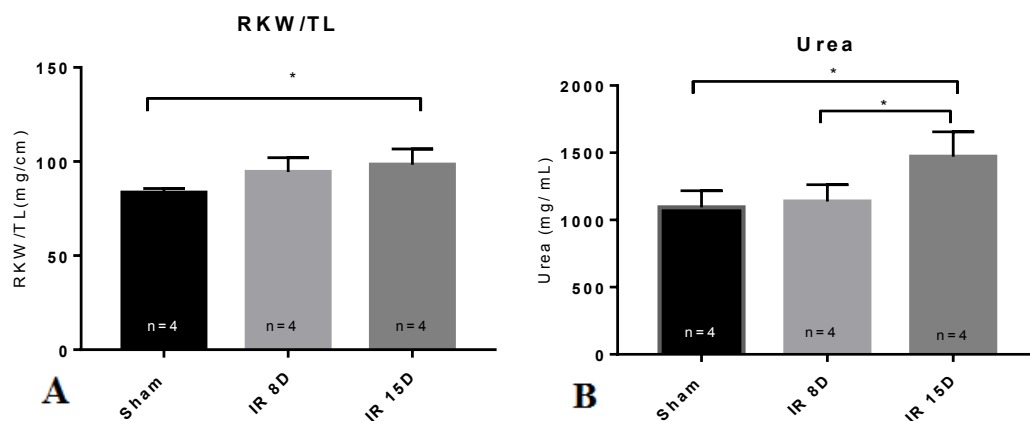
### Morphometric analysis

To characterize the experimental model of renal I/R, morphometric analyzes were performed, as shown in Table 2. The right kidney weight/tibia length (RKW/TL) (mg/cm) ratio had a significant 17% increase in the IR group after 15 days of reperfusion (Table 2 and Figure 1A). Also, for the characterization of the CRS3 model, we proceeded with serum urea levels dosage. There was a significant increase in the IR group after 15 days of reperfusion compared to the Sham and IR 8 days of reperfusion animals of approximately 34% and 29%, respectively (Figure 1B).

**Table 2: Morphometric data of Sham, IR 8 days and IR 15 days groups.**

	Heart		Right kidney		Left kidney	
	HW/BW (mg/g)	HW/TL (mg/cm)	RKW/BW (mg/g)	RKW/TL (mg/cm)	LKW/BW (mg/g)	LKW/TL (mg/cm)
Sham	5,62 ± 0,47	76,83 ± 9,64	6,12 ± 0,33	83,43 ± 2,24	6,18 ± 0,13	84,48 ± 7,01
IR 8 days	5,55 ± 0,15	78,47 ± 0,98	6,68 ± 0,57	94,37 ± 7,68	6,29 ± 0,47	89,09 ± 9,42
IR 15 days	5,53 ± 0,36	78,16 ± 2,48	6,95 ± 0,45	98,31 ± 8,40*	5,42 ± 0,60	76,43 ± 6,33

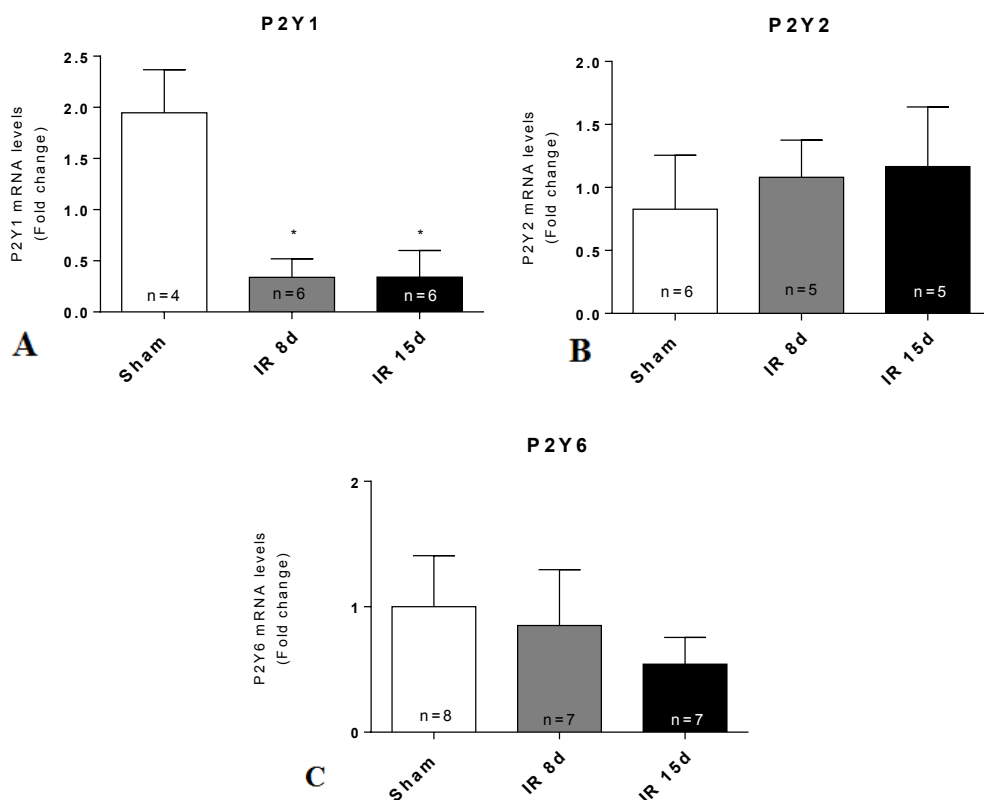
HW: heart weight. BW: body weight. TL: tibial length. RKW: right kidney weight. LKW: left kidney weight. \*represents significant difference compared to the Sham group,  $p < 0.05$  ( $n = 4$  per group) (means ± SD).



**Figure 1: Morphometric characterization of the experimental model.** A: Right kidney weight (RKW)/tibia length (TL) (mg/cm) ratio. B: Serum urea dosage (mg/ml). Data (means  $\pm$  SD) compared by One-way ANOVA followed by Bonferroni test. (\*represents statistically significant difference between groups,  $p < 0.05$ ).

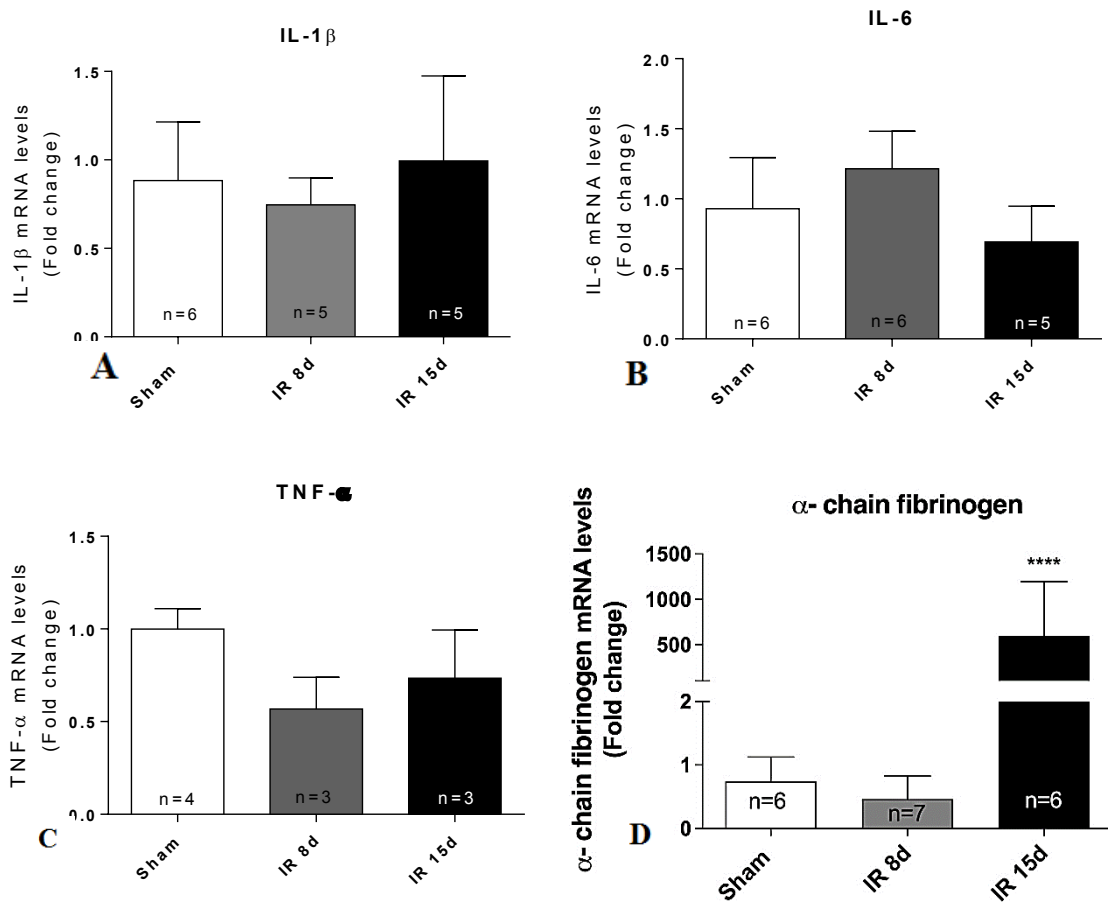
### Gene Expression Analysis

The levels of P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors gene expression was evaluated in aortas from mice of the three experimental groups investigated: Sham, IR 8 days of reperfusion and IR 15 days of reperfusion. P2Y<sub>1</sub> receptor gene expression levels were more than 80% significantly decreased in both IR groups after 8 and 15 days of reperfusion (Figure 2A). Regarding P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors, no significant differences were observed between the groups analyzed (Figure 2B and 2C).



**Figure 2 - Relative levels of gene expression of purinoceptors in aortas from Sham, IR 8 days of reperfusion (IR 8d) and IR 15 days of reperfusion (IR 15d).** A: P2Y<sub>1</sub> gene expression levels. B: P2Y<sub>2</sub> gene expression levels. C: P2Y<sub>6</sub> gene expression levels. Data (mean  $\pm$  SD) were compared by One-way ANOVA followed by Bonferroni test (\*represents statistically significant difference Sham vs. IR 8d and Sham vs. IR 15d groups,  $p < 0.05$ ,  $\beta$ -actin: gene of reference).

In addition to the assessment of purinoceptor gene expression levels, we also quantified the expression of pro-inflammatory cytokines to investigate the impact of inflammation on a vessel distant from the renal I/R (Figure 3). The cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were not altered by IR at the reperfusion times evaluated. However, the expression of the fibrinogen alpha chain showed an important increase of approximately 690 times in the aorta of the IR mice after 15 days of reperfusion compared to the Sham group.



**Figure 3 - Relative levels of gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and  $\alpha$ -chain fibrinogen in aorta from Sham, IR 8 days of reperfusion (IR 8d) and IR 15 days of reperfusion (IR 15d) animals. A: IL-1 $\beta$  gene expression levels, B: IL-6 gene expression levels. C: TNF- $\alpha$  gene expression levels. D: FGA gene expression levels. Data (mean  $\pm$  SD) were compared by One-way ANOVA followed by Bonferroni test. (\*\*\*\* represents statistically significant difference between groups Sham vs. IR 15d.  $p < 0.0001$ ,  $\beta$ -actin: reference gene).**

## Discussion

Cardiorenal syndrome (CRS) impacts the heart, kidneys and blood vessels [4]. Considering the role of ATP and other purines as regulators of cardiovascular function, it is reasonable to propose that purinergic signaling components are also among the risk factors for vascular dysfunction observed in the CRS. Therefore, the present study aimed to elucidate the

impact of CRS3 on vascular purinergic receptors at a site distant from renal I/R, evaluating the thoracic aorta of mice.

Initially, we validated the experimental model showing a significant increase of 17% in the right kidney weight/tibia length (RKW/TL in mg/cm) ratio in the IR 15 days group compared to Sham animals. Furthermore, the serum urea levels dosage also confirmed the establishment of the CRS3 in the IR group after 15 days of reperfusion since urea concentration was significantly increased when compared to control animals and IR 8 days group. In line with these findings, Trentin-Sonoda et. al (2015), when characterizing the same experimental model, observed an increase around 15% increase in the ratio between the right kidney weight/body weight in animals following a renal injury after 8 days of reperfusion compared to the Sham group, and a 40% decrease in left kidney weight/body weight ratio in the IR group after 15 days of reperfusion. In addition, they also observed 11% higher serum urea levels in IR animals after 15 days of reperfusion, compared to those found in Sham mice [15]. Therefore, our data point to right kidney hypertrophy at 15 days of reperfusion after renal injury to possibly compensate for the left kidney damage.

Regarding gene expression analyzes, we verified that P2Y<sub>1</sub> receptor mRNA levels were significantly decreased around 82% in both IR groups after 8 days and 15 days of reperfusion, comparing to Sham animals. On the other hand, the gene expression of P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> purinoceptors were not altered between the different experimental groups studied.

Purinergic signaling is widely reported in the control of vascular tone, cell proliferation, migration and death, in addition to vascular inflammation [8]. Giachini and colleagues (2014), evaluating vascular dysfunction and remodeling in thoracic aortas from hypertensive rats, showed that endothelium-dependent relaxation induced by the 2-MeS-ADP agonist decreased in aortas from vehicle-treated angiotensinII-hypertensive rats compared to control rats treated with vehicle, and this response was elicited through the activation of P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors [18]. Moreover, P2Y<sub>1</sub> plays an important role in the migration response and is crucial in vascular cell proliferation. In the work of Liu and colleagues (2015), it was shown that ADP antagonist, MRS2179, significantly inhibited VSMC proliferation compared to the control group, decreased the extent of intimal hyperplasia, reduced migration of macrophages and significantly decreased the expression of the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in cells [19]. Considering the results obtained in the present study, the inhibition of the purinergic receptor P2Y<sub>1</sub> indicates that CRS3 impacts vascular purinergic signaling at a site distant from renal ischemia and may interfere with the biological processes controlled by it, as it will be further discussed.

It is known that ATP and other nucleotides released under pathological conditions act as molecular patterns associated with damage (DAMPs) activating and recruiting cells of the immune system [20]. The endothelial P2Y<sub>1</sub> receptor plays a key role in acute vascular inflammation through leukocyte recruitment [21]. Zerr and colleagues (2011) highlighted the important contribution of this receptor in the purinergic regulation of TNF $\alpha$ -induced vascular inflammation. The *in vitro* adhesion of isolated mouse monocytes to the TNF- $\alpha$ -stimulated murine endothelial cell monolayer and their migration across cell layers were strongly reduced in P2Y<sub>1</sub>-deficient endothelial cells compared to wild-type endothelial cells [12]. Recently, Cardoso and collaborators (2017) showed that melatonin is a negative modulator of endothelial P2Y<sub>1</sub>, inhibiting leukocyte adhesion and TNF- $\alpha$  production mediated by this receptor, exerting an anti-inflammatory effect [22]. Based on the results of the present study, it is possible to suggest that the expression of P2Y<sub>1</sub>, a pro-inflammatory receptor, is downregulated in acute times, 8 and 15 days after renal I/R, in order to rescue the organism homeostasis.

P2Y receptors are reported in the literature to play important roles in the physiology and pathophysiology of the cardiovascular diseases [8,23,24], being considered as interesting therapeutic targets. Hechler et al. (2008), using apolipoprotein E (ApoE) and P2Y<sub>1</sub> deficient mice, demonstrated that aortic root lesions of ApoE<sup>-/-</sup> and P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup> mice were reduced in size and exhibited less inflammation compared to the lesions from ApoE<sup>-/-</sup> animals [25]. Besides, P2Y<sub>1</sub> knockout mice were resistant to thromboembolism induced by thromboplastin injection [26]. In addition, decreased diapedesis of leukocytes in the femoral arteries of P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup> mice and decreased expression of adhesion molecules in endothelial cells were also observed [12], pointing to beneficial effects in silencing this receptor. In this sense, the renal I/R model used in the present study seems to have an impact on vascular purinergic signaling far from the ischemic site, decreasing the levels of expression of a purinergic receptor known to be involved in blood vessel inflammation, at least in acute times of reperfusion. For sure, these suggestions must be further elucidated to better conclude about the role of P2Y<sub>1</sub> in such I/R model. Furthermore, considering the context of the renal disease, these data may hereafter broaden the paths for discussing therapeutic strategies for patients with CRS.

In order to elucidate the inflammatory status in distant sites of renal ischemia, the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and FGA were evaluated in the aortas of Sham, IR 8 days of reperfusion and IR 15 days of reperfusion animals. No significant differences were observed for IL-1 $\beta$  and IL-6 cytokines. As aforementioned P2Y<sub>1</sub> stimulates the production of TNF- $\alpha$ , in line with the attempt to restore homeostasis by inhibiting the expression of P2Y<sub>1</sub>, there was also no difference in the expression of TNF- $\alpha$  in the arteries of the animals submitted

to renal I/R in the times evaluated. On the other hand, our data showed an exacerbated increase in the gene expression of the  $\alpha$ -chain of fibrinogen (FGA), of approximately 690 times, in the aortas of renal I/R mice after 15 days of reperfusion. This huge increase may suggest vascular local production of fibrinogen, in addition to possible vascular damage, as it will be further discussed.

Although it is well described as a plasma protein produced in the liver, extrahepatic fibrinogen synthesis also occurs in some pathological situations. Data from different research groups, in different animal models, show that it is possible that the pulmonary epithelium secretes fibrinogen [27–29] and incorporates it into the extracellular matrix under certain pathological conditions. Sørensen-Zender and colleagues (2013), using two models of renal I/R in mice, demonstrated that fibrinogen massively accumulates in the kidney after I/R, and this accumulation is not just a consequence of the leakage of fibrinogen from the circulation, but also local expression by stressed renal tubular cells [30]. Considering the substantial increase of fibrinogen mRNA levels in the aorta of IR 15 days mice, our data may point to the local expression of fibrinogen. However, further experiments are needed to confirm this hypothesis.

Fibrinogen significantly interacts in the pathways of coagulation and inflammation and is temporally and spatially correlated in the same tissues, organs and pathologies [23, 24]. Menocal et al.(2014), using a balloon injury model in the murine iliac artery, demonstrated an overexpression of fibrinogen  $\gamma$ -chain mRNA in aging injured arteries, which is related to increased macrophage adhesion in the presence of IL -18 [33]. According to studies in cultured rat vascular smooth muscle cells, fibrinogen stimulates the expression of C-reactive protein (CPR) depending on time and dose [34]. Other data show that fibrinogen up-regulates the expression of IL-6, TNF- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase in VSMCs [35]. In addition, Wang et. Al (2015) demonstrated that fibrinogen has a pro-inflammatory effect on VSMC by inhibiting the expression of the anti-inflammatory cytokines PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  and stimulating the production of the pro-inflammatory cytokine MMP-9, which contributes to the atherogenic effect [36]. Although the experimental model under study showed super gene expression of FGA, the mRNA levels of the evaluated proinflammatory cytokines were not modified. The increase observed in FGA levels is such a big new fact that needs to be deepened in our model of study, since the increase in fibrinogen is correlated with the development of an inflammatory condition.

Another interpretation that should be taken into account is that the binding of fibrinogen to platelets triggers a signaling cascade that is necessary for a complete irreversible aggregation response and is therefore considered a key step in platelet activation [37]. Recent data



demonstrate that ADP $\beta$ S (stable ADP analogue) via P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors evoked a series of transient increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> of primary rat megakaryocytes and stimulated fibrinogen binding to the plasma membrane, which served as a marker for activation of  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 platelet integrin [38]. In this way, through the increase observed in FGA gene expression, it is possible to suggest that platelet activation and aggregation are occurring more prominently at 15 days of reperfusion. After activation, platelets secrete ADP and thromboxane (Tx) A<sub>2</sub>, both provide short-range signals for local amplification of the hemostatic response [39]. Thus, ADP released into the extracellular space could act on vascular purinergic receptors. However, the results presented here show that P2Y<sub>1</sub> gene expression was inhibited while P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> expression was not altered. In this perspective, further research is relevant, aiming to understand these pathways in this experimental model.

Beyond the effects on coagulation and inflammation, fibrinogen plays an important role in the physiology of the extracellular matrix by binding to a variety of compounds, such as basic fibroblast growth factor (FCFb), fibronectin, albumin, thrombospondin, von Willebrand factor, fibulin, endothelial growth factor (VEGF) and IL-1 [40]. Wang et al. (2005), when culturing mice aortic discs in a medium containing fibrin/fibrinogen, observed an angiogenic response. According to these data, the endothelial cells of the microvessels started to form networks on the third day and expanded over time [41]. Thus, increase in FGA at 15 days of reperfusion suggests a vascular compromise, since fibrinogen plays an important role in coagulation, inflammation, atherogenesis and vascular remodeling.

Again, we emphasize that CRS3 appears to impact vascular purinergic signaling in a distant site from the renal ischemia with the inhibition of P2Y<sub>1</sub> expression, which may have beneficial effects for the organism. On the other hand, we observed an increase in the FGA gene expression in IR animals after 15 days of reperfusion, indicating vascular damage. In short, the accurate molecular mechanisms involved in these effects remain unknown and further studies are needed to confirm these data. Although the expression of pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  was not significantly modified in the aortas of experimental groups evaluated in this study, we cannot rule out the hypothesis of the establishment and progress of an inflammatory condition in one site distant from renal I/R. In this sense, intermediate and longer reperfusion times are necessary to clarify the results obtained so far and to expand the knowledge of the impact of this experimental model on vascular purinergic signaling.

## Conclusions

After confirming the experimental model of unilateral renal I/R in to induce CRS type 3, we demonstrated an inhibition in aorta P2Y<sub>1</sub> receptor gene expression levels after acute reperfusion times, possibly to maintain the homeostasis of organism. On other hand, FGA, a plasma protein with recognized functions in coagulation, inflammation and vascular remodeling cascade was overexpressed, suggesting the initiation of a vascular compromise. The expression of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and the purinergic receptors P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> were not significantly altered. In general, CRS3 appears to impact purinergic signaling in blood vessels distant from renal ischemia, which may represent an additional mechanism to be considered in the therapeutic approach of patients with acute kidney injury. Future experiments are needed to better understand the effects of CRS type 3 in the vasculature.

## Conflict of interest statement

None.

## References

- [1] C. Ronco, P. McCullough, S.D. Anker, I. Anand, N. Aspromonte, S.M. Bagshaw, R. Bellomo, T. Berl, I. Bobek, D.N. Cruz, L. Daliento, A. Davenport, M. Haapio, H. Hillege, A.A. House, N. Katz, A. Maisel, S. Mankad, P. Zanco, A. Mebazaa, A. Palazzuoli, F. Ronco, A. Shaw, G. Sheinfeld, S. Soni, G. Vescovo, N. Zamperetti, P. Ponikowski, Cardio-renal syndromes: Report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative, *Eur. Heart J.* 31 (2010) 703–711. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp507>.
- [2] S. Hadjiphilippou, S.P. Kon, Cardiorenal syndrome: review of our current understanding, *J. R. Soc. Med.* 109 (2016) 12–17. <https://doi.org/10.1177/0141076815616091>.
- [3] S.M. Bagshaw, E.A. Hoste, B. Braam, C. Briguori, J.A. Kellum, P.A. McCullough, C. Ronco, Cardiorenal syndrome type 3: Pathophysiologic and epidemiologic considerations, *Contrib. Nephrol.* 182 (2013) 137–157. <https://doi.org/10.1159/000349971>.
- [4] J.S. Bock, S.S. Gottlieb, Cardiorenal syndrome: New perspectives, *Circulation.* 121 (2010) 2592–2600. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.886473>.
- [5] C. Ronco, M. Haapio, A.A. House, N. Anavekar, R. Bellomo, Cardiorenal Syndrome, *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (2008) 1527–1539. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.07.051>.
- [6] A. Nishimura, C. Sunggip, S. Oda, T. Numaga-Tomita, M. Tsuda, M. Nishida, Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases, *Pharmacol. Ther.* 180 (2017) 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.010>.
- [7] H. Yu, T. Kalogeris, R.J. Korthuis, Reactive Species-Induced Microvascular

- Dysfunction in Ischemia/Reperfusion, *Physiol. Behav.* 135 (2019) 182–197. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.011>.
- [8] D. Erlinge, G. Burnstock, P2 receptors in cardiovascular regulation and disease, *Purinergic Signal.* 4 (2008) 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9078-7>.
- [9] M.J.L. Bours, E.L.R. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, P.C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 358–404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>.
- [10] G. Burnstock, Purinergic Signaling in the Cardiovascular System, *Circ. Res.* 120 (2017) 207–228. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>.
- [11] G. Burnstock, Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 659–797. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>.
- [12] M. Zerr, B. Hechler, M. Freund, S. Magnenat, I. Lanois, J.P. Cazenave, C. Léon, C. Gachet, Major contribution of the P2Y1 receptor in purinergic regulation of  $\text{tnf}\alpha$ -induced vascular inflammation, *Circulation.* 123 (2011) 2404–2413. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.002139>.
- [13] A.K. Riegel, M. Faigle, S. Zug, P. Rosenberger, B. Robaye, J.M. Boeynaems, M. Idzko, H.K. Eltzschig, Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation, *Blood.* 117 (2011) 2548–2555. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-313957>.
- [14] C.I. Seye, N. Yu, R. Jain, Q. Kong, T. Minor, J. Newton, L. Erb, F.A. González, G.A. Weisman, The P2Y2 Nucleotide Receptor Mediates UTP-induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Coronary Artery Endothelial Cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 24960–24965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301439200>.
- [15] M. Trentin-Sonoda, R.C. Da Silva, F.V. Kmit, M.V. Abrahão, G.M. Cahli, G.V. Brasil, H. Muzi-Filho, P.A. Silva, F.F. Tovar-Moll, A. Vieyra, E. Medei, M.S. Carneiro-Ramos, Knockout of toll-like receptors 2 and 4 prevents renal ischemia-reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice, *PLoS One.* 10 (2015) 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139350>.
- [16] R. Cirino-Silva, F. V Kmit, M. Trentin-Sonoda, K.K. Nakama, K. Panico, J.M. Alvim, T.R. Dreyer, H. Martinho-Silva, M.S. Carneiro-Ramos, Renal ischemia/reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice: Cardiac morphological and morphometric characterization, *JRSM Cardiovasc. Dis.* 6 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1177/2048004016689440>.
- [17] G. Kauffenstein, S. Tamareille, F. Prunier, C. Roy, A. Ayer, B. Toutain, M. Billaud, B.E. Isakson, L. Grimaud, L. Loufrani, P. Rousseau, P. Abraham, V. Procaccio, H. Monyer, C. De Wit, J.M. Boeynaems, B. Robaye, B.R. Kwak, D. Henrion, Central Role of P2Y 6 UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36 (2016) 1598–1606. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307739>.
- [18] F.R. Giachini, R. Leite, D.A. Osmond, V. V. Lima, E.W. Inscho, R.C. Webb, R.C. Tostes, Anti-platelet therapy with clopidogrel prevents endothelial dysfunction and vascular remodeling in aortas from hypertensive rats, *PLoS One.* 9 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091890>.
- [19] R. Liu, S. Ma, Z. Lu, H. Shen, L. Sun, M. Wei, The ADP Antagonist MRS2179 Regulates the Phenotype of Smooth Muscle Cells to Limit Intimal Hyperplasia, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 29 (2015) 23–29. <https://doi.org/10.1007/s10557-014-6561-6>.
- [20] D. Ferrari, A. la Sala, D. Milani, C. Celeghini, F. Casciano, Purinergic Signaling in Controlling Macrophage and T Cell Functions During Atherosclerosis Development, *Front. Immunol.* 11 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.617804>.
- [21] R. Kumari, G. Goh, L.L. Ng, M.R. Boarder, ATP and UTP responses of cultured rat

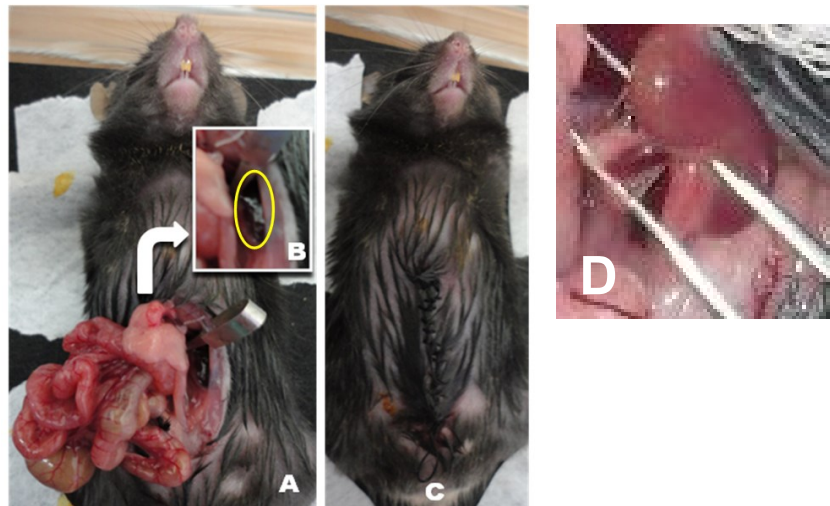
- aortic smooth muscle cells revisited: Dominance of P2Y 2 receptors, *Br. J. Pharmacol.* 140 (2003) 1169–1176. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705526>.
- [22] T.C. Cardoso, T.E. Pompeu, C.L.M. Silva, The P2Y1 receptor-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is inhibited by melatonin, *Purinergic Signal.* 13 (2017) 331–338. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9565-4>.
- [23] M.P. Abbracchio, G. Burnstock, Purinergic signalling: Pathophysiological roles, *Jpn. J. Pharmacol.* 78 (1998) 113–145. <https://doi.org/10.1254/jjp.78.113>.
- [24] G. Burnstock, A. Pelleg, Cardiac purinergic signalling in health and disease, *Purinergic Signal.* 11 (2015) 1–46. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9436-1>.
- [25] B. Hechler, M. Freund, C. Ravanat, S. Magnenat, J.P. Cazenave, C. Gachet, Reduced atherosclerotic lesions in P2Y1/Apolipoprotein E double-knockout mice: The contribution of non-hematopoietic-derived P2Y 1 receptors, *Circulation.* 118 (2008) 754–763. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.788927>.
- [26] C. Léon, M. Freund, C. Ravanat, A. Baurand, J.-P. Cazenave, C. Gachet, Key Role of the P2Y1 Receptor in Tissue Factor–Induced Thrombin-Dependent Acute Thromboembolism, (2001) 688–693. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.5.718>.
- [27] P.J. Simpson-Haidaris, M.A. Courtney, T.W. Wright, R. Goss, A. Harmsen, F. Gigliotti, Induction of fibrinogen expression in the lung epithelium during *Pneumocystis carinii* pneumonia, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4431–4439. <https://doi.org/10.1128/iai.66.9.4431-4439.1998>.
- [28] M. Pereira, P.J. Simpson-Haidaris, Fibrinogen modulates gene expression in wounded fibroblasts, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936 (2001) 438–443. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03527.x>.
- [29] K. Skovgaard, S. Mortensen, M. Boye, K.T. Poulsen, F.M. Campbell, P. David Eckersall, P.M.H. Heegaard, Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs, *Vet. Res.* 40 (2009). <https://doi.org/10.1051/vetres/2009006>.
- [30] I. Sørensen-Zender, S. Rong, N. Susnik, J. Lange, F. Gueler, J.L. Degen, A. Melk, H. Haller, R. Schmitt, Role of fibrinogen in acute ischemic kidney injury, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 305 (2013) 777–785. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00418.2012>.
- [31] D. Davalos, K. Akassoglou, Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease, *Semin. Immunopathol.* 34 (2012) 43–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8>.
- [32] M. Levi, T. Van Der Poll, Inflammation and coagulation, *Crit. Care Med.* 38 (2010). <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181c98d21>.
- [33] L. Rodriguez-Menocal, M. Hafeez Faridi, L. Martinez, L.A. Shehadeh, J.C. Duque, Y. Wei, A. Mesa, A. Pena, V. Gupta, S.M. Pham, R.I. Vazquez-Padron, Macrophage-derived IL-18 and increased fibrinogen deposition are age-related inflammatory signatures of vascular remodeling, *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* 306 (2014) 641–653. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00641.2013>.
- [34] F. Guo, J. Liu, C. Wang, N. Liu, P. Lu, Fibrinogen, fibrin, and FDP induce C-reactive protein generation in rat vascular smooth muscle cells: Pro-inflammatory effect on atherosclerosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (2009) 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.082>.
- [35] P.P. Lu, J.T. Liu, N. Liu, F. Guo, Y.Y. Ji, X. Pang, Pro-inflammatory effect of fibrinogen and FDP on vascular smooth muscle cells by IL-6, TNF- $\alpha$  and iNOS, *Life Sci.* 88 (2011) 839–845. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.03.003>.
- [36] S. WANG, J. LIU, D. WU, X. PANG, J. ZHAO, X. ZHANG, Pro-inflammatory effect of fibrinogen on vascular smooth muscle cells by regulating the expression of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and MMP-9, *Biomed. Reports.* 3 (2015) 513–518. <https://doi.org/10.3892/br.2015.459>.

- [37] B. Hechler, C. Gachet, Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 2307–2315. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.303395>.
- [38] A.P. Bye, J.M. Gibbins, M.P. Mahaut-Smith, Ca<sup>2+</sup> waves coordinate purinergic receptor-evoked integrin activation and polarization, *Sci. Signal.* 13 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav7354>.
- [39] F. Lombardi, C. De Chaumont, D.C. Shields, N. Moran, Platelet signalling networks: Pathway perturbation demonstrates differential sensitivity of ADP secretion and fibrinogen binding, *Platelets.* 23 (2012) 17–25. <https://doi.org/10.3109/09537104.2011.594190>.
- [40] J. Halper, M. Kjaer, Basic components of connective tissues and extracellular matrix: Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins, *Adv. Exp. Med. Biol.* 802 (2014) 31–47. [https://doi.org/10.1007/978-94-7-7893-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-7-7893-1_3).
- [41] X.Q. Wang, N. Sheibani, J.C. Watson, Modulation of tumor endothelial cell marker 7 expression during endothelial cell capillary morphogenesis, *Microvasc. Res.* 70 (2005) 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.08.004>.

## Supplementary Material

### *Surgeries for Induction of Cardiorenal Syndrome type 3 (CRS3)*

Mice used in the present study were subjected to CRS3 by induction of renal IR. The surgical procedures were performed at the bioterium of the University Federal of ABC (UFABC), Santo André, SP. Briefly, mice were anesthetized intraperitoneally with a mixture of ketamine and xylazine (Agribands do Brasil Ltda, São Paulo), at a dose of 0.004 mg/g of body weight, in a single dose. Using a microvascular clip (DL Micof, São Paulo), the left renal pedicle of each mouse was occluded for 60 minutes from an abdominal incision to access the organ. After this ischemic period, the clip was removed, and blood flow was re-established. During recovery from anesthesia, the animals were kept warm under indirect lighting. After the reperfusion times, 8 days or 15 days, the animals were euthanized. Each animal received intraperitoneally lethal doses of ketamine and xylazine (240 mg/kg and 30 mg/g) (Agribands do Brasil Ltda, São Paulo), in a single dose. Their abdominal cavities were opened, the intestinal loops were displaced so that the kidneys could be removed and weighed, and venous blood was punctured through the inferior vena cava. The thoracic cavity was then opened for collection and weighing of the heart and extraction of the thoracic aorta. The aortas were gently manipulated using microscissors to dissect the vessel and remove adjacent fat and connective tissue. The aortas were then stored at -80 °C for use in subsequent experiments. Figure S1 represents ischemia surgery followed by reperfusion for CRS3 induction.



**Figure S1 - Representative image of the surgical procedure for induction of cardiorenal syndrome type 3 (CRS3).** (A) abdominal incision to access the left renal pedicle. (B) occlusion of the left renal pedicle using a microvascular clip to induce renal ischemia. (C) Post-operative abdominal suture. (D) detail of the renal pedicle composed of the renal artery, renal vein and ureter. Source: Cellular and Molecular Biology Laboratory, CCNH, UFABC.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados apresentados confirmam o êxito da indução do modelo de IR renal unilateral, caracterizando o desenvolvimento da SCR3. De maneira geral, até o momento é possível atestar que a SCR3 impacta sobre a sinalização purinérgica vascular em um local distante do sítio isquêmico. Ainda, pode-se hipotetizar que, possivelmente, em tempos agudos de reperfusão renal, ocorra uma tentativa de manter a homeostasia do organismo, em parte, regulando os receptores purinérgicos na aorta, visto que houve inibição da expressão gênica do receptor P2Y<sub>1</sub>, o qual tem função reconhecidamente pró-inflamatória. Por outro lado, após 15 dias de reperfusão, também observamos uma super expressão da cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio, uma proteína plasmática com funções reconhecidas na cascata de coagulação, inflamação e remodelamento vascular. Apesar de a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e dos receptores purinérgicos P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> não ter sido significativamente alterada, o expressivo aumento do FGA nos dá indícios de um possível comprometimento vascular após 15 dias de reperfusão.

Em suma, a SCR3 parece impactar a sinalização purinérgica, a qual pode representar um mecanismo adicional a ser considerado na abordagem terapêutica de pacientes com lesão renal aguda. Apesar de experimentos adicionais serem necessários para a confirmação e complementação dos resultados obtidos, este trabalho representa um marco na consolidação de uma nova linha de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Vascular, trazendo dados iniciais sobre as implicações vasculares da SCR em sítios distantes da lesão renal. Naturalmente, outras perguntas e hipóteses surgiram ao longo do desenvolvimento desta pesquisa, corroborando a necessidade de experimentos futuros para melhor compreensão dos efeitos da SCR tipo 3 em leitos vasculares distantes da IR renal.

## PESPECTIVAS FUTURAS

1. Pesquisas futuras com o objetivo de compreender melhor os efeitos da SCR tipo 3 em leitos vasculares distantes da IR renal, são necessários. Os receptores purinérgicos em estudo P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub>, estão envolvidos nas respostas vasculares. Análises em nível proteico, ensaios funcionais em banho de órgãos e análises morfológicas do vaso poderão contribuir na elucidação das consequências da IR renal sobre os vasos sanguíneos.
2. Além disso, as ectonucleotidases e outros componentes (moléculas efetoras e receptores) da sinalização purinérgica atuam em conjunto para formar a via de sinalização purinérgica. Sabe-se que a ectonucleotidase ENTPDase-1 (CD39) pode modular a sinalização purinérgica, atenuando a ativação do receptor de fibrinogênio plaquetário, resultando em uma profunda resistência à formação de trombo oclusivo *in vivo* (HUTTINGER et al., 2012). Sabe-se, ainda, que os receptores do tipo P1 ativados, exercem efeitos protetivos após o dano cardiovascular. Dessa forma, é possível que outros componentes da sinalização purinérgica estejam atuando em conjunto nas respostas vasculares à SCR3. A determinação de ATP, ADP e adenosina, além das ectonucleotidases, ajudariam a explicar o envolvimento da sinalização purinérgica na SCR3.
3. Até o momento, nossos dados são inconclusivos quanto ao estabelecimento da inflamação vascular. De um lado, um receptor pró-inflamatório foi inibido em nível gênico e, por outro lado, verificou-se um provável dano vascular indicado pela super expressão de FGA. Além disso, não foi encontrado nenhuma alteração significativa nas citocinas pró-inflamatórias. Assim, sugerimos que a dosagem sérica das citocinas e do fibrinogênio, além da análise proteica por Western blotting, serão dados importantes para verificar a hipótese do estabelecimento da inflamação no vaso. Outros experimentos seriam igualmente importantes para complementar os dados deste estudo, como a determinação dos níveis das moléculas de adesão celular ICAM-1, VCAM-1 e P-selectinas.
4. O fibrinogênio está relacionado com a instalação de um quadro inflamatório, coagulação, aterogênese e remodelamento vascular. Outra direção futura interessante é investigar em nível proteico a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio e as outras cadeias ( $\beta$  e  $\gamma$ ) em níveis gênicos e proteicos. Em complemento, avaliar a hipótese de produção local, pelas células vasculares, de fibrinogênio após a IR renal.
5. Levando em consideração que o local da lesão é distante da aorta e que talvez os mecanismos compensatórios vasculares sejam mais robustos em tempos agudos, é possível que nos tempos de reperfusão avaliados o estímulo inflamatório não seja suficiente para consolidar a inflamação



no vaso. Desse modo, torna-se relevante compreender se o estabelecimento do comprometimento vascular se dá tempos mais agudos ou tempos mais crônicos. Sendo assim, sugere-se a realização do protocolo de reperfusão em outros tempos experimentais, como por exemplo 12, 20, 25 e 30 dias.

## REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. **Autonomic Neuroscience**, v. 58, n. 3, p. 281–341, 2006. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3.281>

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. **Purinergic signalling: Pathophysiological roles** **Japanese Journal of Pharmacology**, 1998. <https://doi.org/10.1254/jjp.78.113>

AGTERESCH, H. J. et al. Adenosine triphosphate. Established and potential clinical applications. **Drugs**, v. 58, n. 2, p. 211–232, 1999. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958020-00002>

BAGSHAW, S. M. et al. Central Role of P2Y 6 UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 172, 2010. <https://doi.org/10.1159/000349971>

BAGSHAW, S. M. et al. Cardiorenal syndrome type 3: Pathophysiologic and epidemiologic considerations. **Contributions to Nephrology**, v. 182, p. 137–157, 2013. <https://doi.org/10.1159/000349971>

BAR, I. et al. Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 777–784, 2008. <https://doi.org/10.1124/mol.108.046904>

BELO, V. A.; GUIMARÃES, D. A.; CASTRO, M. M. Matrix metalloproteinase 2 as a potential mediator of vascular smooth muscle cell migration and chronic vascular remodeling in hypertension. **Journal of Vascular Research**, v. 52, n. 4, p. 221–231, 2016. <https://doi.org/10.1159/000441621>

BOCK, J. S.; GOTTLIEB, S. S. Cardiorenal syndrome: New perspectives. **Circulation**, v. 121, n. 23, p. 2592–2600, 2010. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.886473>

BONGARTZ, L. G. et al. The severe cardiorenal syndrome: “Guyton revisited”. **European Heart Journal**, v. 26, n. 1, p. 11–17, 2005. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi020>

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>

BRAUNWALD, E. Biomarkers in heart failure. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 2, p. 205–206, 2019. <https://doi.org/10.5935/abc.20190167>

BURNSTOCK, G. Purinergic Nerves. **Pharmacol Rev**, v. 24, n. 3, p. 509–81, 1972.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 2, p. 659–797, 2007a. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007b. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0>

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 120, n. 1, p. 207–228, 2017. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, n. SPEC.ISS., p. 31–304, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)

BURNSTOCK, G.; PELLEG, A. Cardiac purinergic signalling in health and disease. **Purinergic Signalling**, v. 11, n. 1, p. 1–46, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9436-1>

BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 102–192, 2014. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008029>

BYE, A. P.; GIBBINS, J. M.; MAHAUT-SMITH, M. P. Ca<sup>2+</sup> waves coordinate purinergic receptor-evoked integrin activation and polarization. **Science Signaling**, v. 13, n. 615, p. 1–13, 2020. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav7354>

CARDOSO, T. C.; POMPEU, T. E.; SILVA, C. L. M. The P2Y1 receptor-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is inhibited by melatonin. **Purinergic Signalling**, v. 13, n. 3, p. 331–338, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9565-4>

CHUNG, A. W. Y. et al. Upregulation of matrix metalloproteinase-2 in the arterial vasculature contributes to stiffening and vasomotor dysfunction in patients with chronic kidney disease. **Circulation**, v. 120, n. 9, p. 792–801, 2009. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.862565>

CIRINO-SILVA, R. et al. Renal ischemia/reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice: Cardiac morphological and morphometric characterization. **JRSM Cardiovascular Disease**, v. 6, p. 1–10, 2017. <https://doi.org/10.1177/2048004016689440>

COLOMBO, P. C. et al. Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. **Bone**, v. 17, n. 2, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10741-011-9261-3>

CRACIUN, F. L. et al. **Pharmacological and genetic depletion of fibrinogen protects from kidney fibrosis** *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 2014. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00189.2014>

DAVALOS, D.; AKASSOGLU, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 1, p. 43–62, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8>

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **The Journal of Physiology**, v. 68, n. 3, p. 213–237, 1929. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>

ERLINGE, D.; BURNSTOCK, G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. **Purinergic Signalling**, v. 4, n. 1, p. 1–20, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9078-7>

ERNST, E. et al. Leukocytes and the Risk of Ischemic Diseases. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 257, n. 17, p. 2318–2324, 1987. <https://doi.org/10.1001/jama.1987.03390170074031>

FERRARI, D. et al. Purinergic Signaling in Controlling Macrophage and T Cell Functions During Atherosclerosis Development. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.617804>

GARCIA, R. A. et al. P2Y6 receptor potentiates pro-inflammatory responses in macrophages and exhibits differential roles in atherosclerotic lesion development. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111385>

GIACHINI, F. R. et al. Anti-platelet therapy with clopidogrel prevents endothelial dysfunction and vascular remodeling in aortas from hypertensive rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–8, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091890>

GRIENGLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in

cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 74, n. 6, p. 1141–1148, 1994. <https://doi.org/10.1161/01.RES.74.6.1141>

GSCHWEND, S. et al. Myogenic constriction is increased in mesenteric resistance arteries from rats with chronic heart failure: Instantaneous counteraction by acute AT 1 receptor blockade. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 7, p. 1317–1325, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705367>

GUO, F. et al. Fibrinogen, fibrin, and FDP induce C-reactive protein generation in rat vascular smooth muscle cells: Pro-inflammatory effect on atherosclerosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 3, p. 942–946, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.082>

GUO, J. et al. Vasculopathy in the setting of cardiorenal syndrome: Roles of protein-bound uremic toxins. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 1, p. H1–H13, 2017. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00787.2016>

HADJIPHILIPPOU, S.; KON, S. P. Cardiorenal syndrome: review of our current understanding. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 12–17, 2016. <https://doi.org/10.1177/0141076815616091>

HALPER, J.; KJAER, M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 802, p. 31–47, 2014. [https://doi.org/10.1007/978-94-7-7893-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-7-7893-1_3)

HASDAI, D. et al. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. **Circulation**, v. 95, n. 2, p. 357–362, 1997. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.2.357>

HECHLER, B. et al. Reduced atherosclerotic lesions in P2Y1/Apolipoprotein E double-knockout mice: The contribution of non-hematopoietic-derived P2Y 1 receptors. **Circulation**, v. 118, n. 7, p. 754–763, 2008. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.788927>

HECHLER, B.; CATTANEO, M.; GACHET, C. The P2 receptors in platelet function. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 31, n. 2, p. 150–161, 2005. <https://doi.org/10.1055/s-2005-869520>

HECHLER, B.; GACHET, C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 11, p. 2307–2315, 2015. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.303395>

HUTTINGER, Z. M. et al. Ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39) mediates resistance to occlusive arterial thrombus formation after vascular injury in mice. **American Journal of Pathology**, v. 181, n. 1, p. 322–333, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.024>

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 247–264, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrd1983>

JANKOWSKI, V. et al. Uridine adenosine tetraphosphate: A novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 223–227, 2005. <https://doi.org/10.1038/nm1188>

KAUFFENSTEIN, G. et al. Central Role of P2Y 6 UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 8, p. 1598–1606, 2016. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307739>

KAUR, J.; DHAUNSI, G. S.; TURNER, R. B. Interleukin-1 and nitric oxide increase NADPH oxidase activity in human coronary artery smooth muscle cells. **Medical Principles and Practice**, v. 13, n. 1, p. 26–29, 2004. <https://doi.org/10.1159/000074047>

KAWAI, M. et al. Mechanical stress-dependent secretion of interleukin 6 by endothelial cells after portal vein embolization: Clinical and experimental studies. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 2, p. 240–246, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00171-X)

KELLY, K. J. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 6, p. 1549–1558, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000064946.94590.46>

KINGMA, J. G. et al. Influence of acute renal failure on coronary vasoregulation in dogs. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 5, p. 1316–1324, 2006. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005101084>

KRIEGER, E. M.; FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, J. E. Patogenia da hipertensão arterial. **Revista médica de Pernambuco**, v. 15, p. 252, 1996.

KUMARI, R. et al. ATP and UTP responses of cultured rat aortic smooth muscle cells revisited: Dominance of P2Y 2 receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 7, p. 1169–1176, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705526>

LE, T. T. T. et al. Purinergic signaling in pulmonary inflammation. **Frontiers in Immunology**,

v. 10, n. JULY, p. 1–14, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01633>

LÉON, C. et al. Key Role of the P2Y1 Receptor in Tissue Factor–Induced Thrombin-Dependent Acute Thromboembolism. *n. Mi*, p. 688–693, 2001. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.5.718>

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Inflammation and coagulation. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. SUPPL. 2, 2010. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181c98d21>

LIU, R. et al. The ADP Antagonist MRS2179 Regulates the Phenotype of Smooth Muscle Cells to Limit Intimal Hyperplasia. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 29, n. 1, p. 23–29, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10557-014-6561-6>

LIU, S. et al. Cardiorenal syndrome: Pathophysiology, preclinical models, management and potential role of uraemic toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 8, p. 692–700, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05632.x>

LOMBARDI, F. et al. Platelet signalling networks: Pathway perturbation demonstrates differential sensitivity of ADP secretion and fibrinogen binding. **Platelets**, v. 23, n. 1, p. 17–25, 2012. <https://doi.org/10.3109/09537104.2011.594190>

LU, P. P. et al. Pro-inflammatory effect of fibrinogen and FDP on vascular smooth muscle cells by IL-6, TNF- $\alpha$  and iNOS. **Life Sciences**, v. 88, n. 19–20, p. 839–845, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.03.003>

MA, X. L. et al. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. **Circulation**, v. 86, n. 3, p. 937–946, 1992. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.86.3.937>

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 3, n. 8, p. 1894–1904, 2005. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2005.01365.X>

NEVES, P. D. M. DE M. et al. Inquérito brasileiro de diálise 2019. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 43, n. 2, p. 217–227, 2021.

NICHOLS, C. M. et al. Vascular smooth muscle cells from small human omental arteries express P2X1 and P2X4 receptor subunits. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 565–572, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9415-6>

NISHIMURA, A. et al. Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 180, p. 113–128, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.010>

PAVAN, M. Incidence of acute cardiorenal syndrome type 3 in India. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 8, n. 1, p. 42–45, 2014.

PEREIRA, M.; SIMPSON-HAIDARIS, P. J. Fibrinogen modulates gene expression in wounded fibroblasts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 438–443, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03527.x>

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 413–92, 1998.

RIEGEL, A. K. et al. Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation. **Blood**, v. 117, n. 8, p. 2548–2555, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-313957>

RODRIGUEZ-MENOCAL, L. et al. Macrophage-derived IL-18 and increased fibrinogen deposition are age-related inflammatory signatures of vascular remodeling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, p. 641–653, 2014. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00641.2013>

ROMAN, R. M.; FITZ, J. G. Emerging Roles of Purinergic Signaling in Gastrointestinal. **Gastroenterology**, v. 116, n. 4, p. 964–979, 1999.

RONCO, C. et al. Cardiorenal Syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 19, p. 1527–1539, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.07.051>

RONCO, C. et al. Cardio-renal syndromes: Report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. **European Heart Journal**, v. 31, n. 6, p. 703–711, 2010. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp507>

SABATIER, F. et al. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Key players towards the definition of vascular competence. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 454–471, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00639.x>

SAVIRA, F. et al. Molecular mechanisms of protein-bound uremic toxin-mediated cardiac, renal and vascular effects: underpinning intracellular targets for cardiorenal syndrome therapy. **Toxicology Letters**, v. 308, p. 34–49, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.002>



SEYE, C. I. et al. The P2Y<sub>2</sub> Nucleotide Receptor Mediates UTP-induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Coronary Artery Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24960–24965, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301439200>

SIMPSON-HAIDARIS, P. J. et al. Induction of fibrinogen expression in the lung epithelium during *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4431–4439, 1998. <https://doi.org/10.1128/iai.66.9.4431-4439.1998>

SKOVGAARD, K. et al. Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. **Veterinary Research**, v. 40, n. 3, 2009. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009006>

SÖRENSEN-ZENDER, I. et al. Role of fibrinogen in acute ischemic kidney injury. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 305, n. 5, p. 777–785, 2013. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00418.2012>

SRIRAMULA, S.; FRANCIS, J. Tumor necrosis factor - Alpha is essential for angiotensin II-induced ventricular remodeling: Role for oxidative stress. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138372>

TABUCANON, T.; TANG, W. H. W. Right Heart Failure and Cardiorenal Syndrome. **Cardiology Clinics**, v. 38, n. 2, p. 185–202, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2020.01.004>

TRENTIN-SONODA, M. et al. Knockout of toll-like receptors 2 and 4 prevents renal ischemia-reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–21, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139350>

VASSORT, G. Adenosine 5'-triphosphate: A p<sub>2</sub>-purinergic agonist in the myocardium. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 767–806, 2001. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.767>

WANG, B. W. et al. Induction of matrix metalloproteinases-14 and -2 by cyclical mechanical stretch is mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$  in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 59, n. 2, p. 460–469, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00428-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00428-0)

WANG, S. et al. Pro-inflammatory effect of fibrinogen on vascular smooth muscle cells by regulating the expression of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and MMP-9. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 4, p. 513–518, 2015. <https://doi.org/10.3892/br.2015.459>

WANG, X. Q.; SHEIBANI, N.; WATSON, J. C. Modulation of tumor endothelial cell marker 7 expression during endothelial cell capillary morphogenesis. **Microvascular Research**, v. 70, n. 3, p. 189–197, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.08.004>

WATSON, J. D. et al. **Biologia Molecular do Gene James D. Watson (7<sup>a</sup> ed).pdf**. [s.l: s.n.].

WHO. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 14 nov. 2021.

YAP, S. C.; LEE, H. T. Acute Kidney Injury and Extrarenal Organ Dysfunction: New Concepts and Experimental Evidence. **Anesthesiology**, n. 5, 2012.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008a. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>

YU, H.; KALOGERIS, T.; KORTHUIS, R. J. Reactive Species-Induced Microvascular Dysfunction in Ischemia/Reperfusion. **Physiology & behavior**, v. 135, n. 1, p. 182–197, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.011>

ZERR, M. et al. Major contribution of the P2Y1 receptor in purinergic regulation of  $\text{tnf}\alpha$ -induced vascular inflammation. **Circulation**, v. 123, n. 21, p. 2404–2413, 2011. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.002139>

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002100000309>

## ANEXOS – NORMAS DA REVISTA

### GUIDE FOR AUTHORS

#### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

#### **INTRODUCTION**

*Life Sciences* is an international journal publishing articles that emphasize the molecular, cellular, and functional basis of therapy. All articles are rigorously reviewed. The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain molecular, cellular and physiological mechanisms. Articles that merely report observations are rarely accepted. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research.

The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the life sciences. We particularly encourage submission of focused reviews containing high-quality artwork and mechanistic diagrams.

#### **IMPORTANT INFORMATION**

- Submission of a paper will be held to imply that the manuscript contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere.
- Manuscripts should present novel findings addressing significant biological questions. Studies that fail to do so may be rejected without review.
- Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods.
- *Life Sciences* does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration.
- The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment.

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

**Please include word count and figure/table count on the cover page of your manuscript.**

**Authors are encouraged to submit video material or animation sequences** to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

#### *Types of article*

- Original research articles
- Reviews

#### *Submission Checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for

review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- Institutional E-mail address
- Full postal address

Every author offers the institutional E-mail address.

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)

- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print  
*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
  - All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
  - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
  - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
  - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
  - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- For further information, visit our [Support Center](#).

## **PREPARATION**

### **Queries**

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

### **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by

family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

### **Language**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Organization of the manuscript**

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case. Avoid abbreviations.
- 2a. Names of all authors.
- 2b. Affiliations of all authors. If necessary, use superscripted lowercase letters after the author's name to distinguish affiliations.
3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
4. A structured abstract has to be submitted for research papers (not for reviews) of no more than 250 words. The following headings must be used:

Aims:

Main methods:

Key findings:

Significance:

5. Key words for indexing purposes (a maximum of six can be entered). In addition to key words from the title, please suggest other terms that help define the study. We encourage authors to test the relevance of their key words by using them for a database search and comparing the results with the topic of their own paper.

**Word limits:** In **full papers**, individual sections should be no longer than Abstract 250 words, Introduction 500 words, Discussion 1500 words, Conclusion 150 words. Materials and Methods and Results sections should be concise but there is no formal word limit.

**Headings:** Papers must include the major headings Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments, and References. Include subheadings as appropriate. Review articles must contain Abstract and Introduction, with subsequent headings and subheadings as appropriate.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

Present the conclusions of the study in a short Conclusions section.

## Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

The Graphical Abstract is optional for research articles, but mandatory for reviews. GAs should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Refer to the following website for more information

<https://www.elsevier.com/graphicalabstracts>.

## Abbreviations

Abbreviations must be explained the first time they are used, both in the Abstract and again in the main text.

Abbreviations used as names of cell lines do not need to be explained, but the species and tissue of origin should be made clear in text the first time the cell line is mentioned. Examples: "the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2" or "the porcine renal endothelial cell line LLC-PK1".

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Please note that funding information must appear under the Acknowledgments heading.

## Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

## Artwork

### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

**information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Sep 2021 [www.elsevier.com/locate/lifescie](http://www.elsevier.com/locate/lifescie) 12

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### Supplementary Material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file.

Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version. *Life Sciences* requires submission of the whole uncropped images of the original western blots in triplicate that contributed to the quantitative analysis, from which figures have been derived. Please submit as Supplementary Figure(s). **Please note that this is mandatory when western blots are shown.** Please see [Example of original western blot for three repeats](#)

### Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data



refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.