



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Bruna Barcelos de Simas dos Santos

Efeito da ativação de receptores CB2 nas alterações pulmonares induzidas por modelo murino de doença renal crônica

Florianópolis

2022

Bruna Barcelos de Simas dos Santos

Efeito da ativação de receptores CB2 nas alterações pulmonares induzidas por modelo murino de doença renal crônica

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação da
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção
do título de Mestre em Farmacologia
Orientador: Profa. Dra. Regina de Sordi

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Bruna Barcelos de Simas dos

Efeito da ativação de receptores CB2 nas alterações pulmonares induzidas por modelo murino de doença renal crônica / Bruna Barcelos de Simas dos Santos ; orientadora, Regina de Sordi, 2022.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Doença renal crônica. 3. lesão pulmonar. 4. Receptores CB2. 5. beta-cariofileno. I. Sordi, Regina de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Bruna Barcelos de Simas dos Santos

Efeito da ativação de receptores CB2 nas alterações pulmonares induzidas por modelo murino de doença renal crônica

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen
Universidade Federal do Paraná

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Regina de Sordi
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, professora Regina, pela oportunidade que me deu quando bati na sua porta pedindo orientação. Por sempre me orientar o caminho a seguir. Obrigada por toda atenção, compreensão, paciência, por compartilhar comigo toda sua experiência. Obrigada por acreditar em mim, mesmo com todas minhas inseguranças e me incentivar a seguir na carreira acadêmica.

Aos professores: Daniel e Jamil, que cederam espaço e materiais para a realização dos experimentos. Obrigada por todos os momentos discutindo ciência nos seminários, por compartilhar seus conhecimentos e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas de laboratório: Gustavo, que me ensinou o modelo utilizado nesse trabalho, sem a sua ajuda esse trabalho não seria possível. Filipe obrigada por compartilhar comigo toda sua experiência e me ajudar com minhas dúvidas e na bancada, obrigada também por compartilhar seus saberes populares, eles foram essenciais para deixar o ambiente mais leve e divertido. Camila Fernandes, obrigada por ser minha parceira tanto nos experimentos como nos desabafos e conversas. Adriane Madeira, obrigada por toda ajuda e sempre atender todos meus pedidos de socorro. Thiele obrigada por sempre estar disposta a ajudar e tirar dúvidas, e pelos momentos de descontração. Daiane obrigada por me ensinar a fazer o Blot e toda sua ajuda com os experimentos. Aos alunos de iniciação científica Luana, Maria Eduarda e Valdomiro, que se dedicaram para ajudar apesar da vida corrida na graduação.

Ao meu marido, Gustavo, que teve participação direta nos experimentos, nos momentos de alegria ou de crise. Obrigada pelas conversas de ciência em casa. Obrigada por acreditar, me incentivar e ser um apoio sempre que precisei. Sem a tua ajuda esse sonho não seria realidade. Obrigada por tornar tudo mais confortável e leve.

A minha família, a base de tudo que eu sou hoje. A minha mãe que sempre esteve presente e nunca negou ajuda, obrigada por todo apoio e nunca duvidar ou questionar minhas decisões. Ao meu irmão que, desde pequena, me incentivou a estudar e correr atrás dos meus sonhos. Ao meu pai por acreditar na minha capacidade e sempre me incentivar a seguir meus estudos.

Aos professores do programa de pós-graduação obrigada pela dedicação, por serem inspiração, e por todos os ensinamentos. A professora Beth que emprestou seu espaço para eu começar meus experimentos. Ao professor Alfeu por ceder o β -cariofileno. Aos professores Spiller e José Eduardo por deixarem as portas abertas dos seus laboratórios quando precisei. Todos vocês ajudaram a tornar esse trabalho possível. Agradeço também a veterinária, Luciana Honorato, que ajudou muito na padronização do protocolo de analgesia e anestesia.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao programa de pós-graduação em Farmacologia. Agradeço a ajuda dos servidores da UFSC, Hospital Universitário, LAMEB e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.

(Guimarães Rosa)

RESUMO

As doenças renais têm como característica a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), aumento da concentração plasmática de creatinina e ureia, bem como aumento da albuminúria e alterações do débito urinário. A doença renal pode ser classificada com aguda (IRA), quando a função renal declina em período curto (horas a dias), ou crônica (DRC), quando os sintomas se instalam de maneira lenta e progressiva (mais de 3 meses). Os rins desempenham funções vitais aos organismos, como eliminação de toxinas e mediadores inflamatórios, portanto, sua falência pode levar à disfunção de órgãos distantes, como os pulmões. Apesar de se conhecer que a IRA leva, no tecido pulmonar, a um desbalanço na expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias levando a uma disfunção pulmonar, ainda pouco se sabe sobre as alterações pulmonares induzidas pela DRC. Neste cenário, estudar as consequências da DRC nos pulmões e indicar novos alvos terapêuticos para essas alterações é extremamente importante. O sistema endocanabinoide (eCB) é conhecido principalmente pelas suas ações no sistema nervoso central, mas também exerce efeitos anti-inflamatórios. A ativação dos receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) está associada a uma melhora da disfunção renal associada a comorbidades, e pode estar envolvida em mecanismos antifibróticos na fibrose pulmonar idiopática. Apesar de algumas evidências, faltam estudos que avaliem o papel deste sistema nas alterações pulmonares associadas à DRC. Assim, nosso objetivo foi avaliar o papel da ativação dos receptores CB2 pelo agonista β -cariofileno nas alterações pulmonares induzidas pela DRC. Nossos dados mostraram que o modelo de nefrectomia parcial 5/6 (NPx) foi capaz de produzir um dano renal, pois aumentou a densidade urinária, os níveis de ureia e creatinina plasmáticas, e aumentou a massa relativa do rim. Além disso, a indução da DRC aumentou a migração de células, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e a expressão da molécula de adesão 1 (ICAM-1) nos pulmões. O tratamento dos animais com o agonista CB2 β -cariofileno reduziu todas essas alterações. Os animais NPx exibiram um aumento do escore de lesão pulmonar através da análise histológica nos pulmões e a densidade dos receptores CB2 foi confirmada neste tecido através da técnica de Western blotting, entretanto o tratamento não alterou estes parâmetros. Esses achados sugerem que a DRC causa alterações no tecido pulmonar e que a ativação dos receptores CB2 atenua em partes os danos na função renal e na lesão pulmonar.

Palavras-chave: doença renal crônica, lesão pulmonar, receptores CB2, β -cariofileno.

ABSTRACT

Kidney diseases are characterized by decreased glomerular filtration rate (GFR), increased plasma concentration of creatinine and urea, as well as increased albuminuria and changes in urinary output. Kidney disease can be classified as acute (AKI), when kidney function declines in a short period of time (hours to days), or chronic (CKD), when the symptoms are slowly and progressively (more than 3 months) developed. The kidneys perform vital functions for the organisms, such as the toxins and inflammatory mediators elimination and, therefore, their failure can impair the well function of distant organs, such as the lungs. Although it is known that AKI promotes an imbalance in the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in the lung, leading to pulmonary dysfunction, there are a few knowledge about the pulmonary changes induced by CKD. In this scenario, studying the consequences of CKD on the lungs and pointing out new therapeutic targets for these changes is extremely important. The endocannabinoid system (eCB) is primarily known for its actions on the central nervous system, but it also exerts anti-inflammatory effects. Activation of type 2 cannabinoid receptors (CB2) is associated with an improvement in renal dysfunction related to comorbidities, and may be involved in antifibrotic mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis. Despite some evidence, a few studies evaluate the role of this system in the CKD-induced pulmonary alterations. Thus, our aim was to evaluate the role of CB2 receptor activation by the β -caryophyllene agonist in CKD-induced pulmonary disease. Our data showed that the 5/6 partial nephrectomy model was able to produce renal damage, as it increased urinary density, plasma urea and creatinine levels, and increased relative kidney mass. In addition, CKD increased myeloperoxidase (MP) enzyme and adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in the lungs. The treatment of animals with the CB2-caryophyllene reduced all these changes. The NPx animals presented and increase in the lung injury score and in the density of CB2, but these parameters were not changed by the CB2-caryophyllene treatment. These findings suggest that CKD alters the lung tissue and that the CB2 receptor activation reduced, at least in part, the kidney-induced damage to lung function.

Keywords: chronic kidney disease, lung injury, CB2 receptors, β -caryophyllene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crosstalk entre insuficiência renal aguda e lesão pulmonar aguda.	45
Figura 2 - Via de sinalização dos receptores canabinoides.	47
Figura 3 - Delineamento experimental.	51
Figura 4 - Local de inserção das ligaduras nos rins no modelo de nefrectomia parcial 5/6.	53
Figura 5 - Massa corporal diária.	58
Figura 6 – Débito urinário.	59
Figura 7 - Densidade e pH da urina.	59
Figura 8 - Marcadores bioquímicos creatinina (A) e ureia (B) no plasma.	60
Figura 9 - Clearance de creatinina (A) e proteínas totais (B) na urina.	60
Figura 10 - Massa relativa do rim e do coração.	61
Figura 11 - Contagem de células no BAL.	63
Figura 12 - Quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar.	64
Figura 13 - Atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão e no rim.	65
Figura 14 - Imagem histológica do tecido pulmonar.	65
Figura 15 - Escore de lesão pulmonar.	66
Figura 16 - Análise por Western blotting dos receptores CB2 e da ICAM-1 no tecido pulmonar.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios para classificar pacientes com doença renal crônica.	41
Tabela 2 - Estágios da DRC de acordo com os valores da TFG.....	42
Tabela 3 - Parâmetros hematológicos.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG - aracdonilglicerol

AEA – Aracdoniletanolamida

BAL – Lavado broncoalveolar

BSA - do inglês *Bovine serum albumin*

CB1 – Receptor canabinoide 1

CB2 – Receptor canabinoide 2

DRC – Doença renal crônica

DRET – Doença renal em estágio terminal

eCB - Endocanabinoide

FAAH - do inglês *Fatty Acid Amide Hydrolase*

ICAM-1 - do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IRA – Insuficiência renal aguda

MAGL - Monoacilglicerol lipase

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MPO – Mieloperoxidase

PBS - do inglês Phosphate buffered saline

TGF – Taxa de filtração glomerular

VCM – Volume corpuscular médio

VPM – Volume plaquetário médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	41
1.1 Doença renal	41
1.2 Doença renal crônica e manifestações extra-renais.....	43
1.2.1 Doença renal crônica e manifestações pulmonares.....	44
1.3 Modelos experimentais de DRC.....	45
1.4 Sistema endocanabinoide como alvo terapêutico.....	46
2 HIPÓTESE.....	49
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivos gerais	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Animais.....	49
4.2 Delineamento experimental.....	50
4.3 Procedimento cirúrgico.....	51
4.3.1 Primeira etapa: Ligadura dos polos do rim esquerdo.....	51
4.3.2 Segunda etapa: Remoção do rim direito	52
4.3.3 Pontos finais humanitários	53
4.4 Avaliação dos marcadores bioquímicos na urina	53
4.5 Avaliação dos marcadores bioquímicos no plasma.....	54
4.6 Obtenção de tecidos e lavado broncoalveolar (BAL).....	54
4.7 Contagem total e diferencial de células no BAL.....	55
4.8 Extravasamento de proteínas para o pulmão	55
4.9 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão e rins.....	55
4.10 Histologia do pulmão	56
4.11 Avaliação do conteúdo proteico por <i>Western blotting</i>	56
4.12 Análise estatística	57

5 RESULTADOS	58
5.1 Massa corporal.....	58
5.2 Débito urinário, pH e densidade	58
5.3 Marcadores bioquímicos no plasma e na urina	59
5.4 Massa relativa do rim e do coração	60
5.5 Parâmetros hematológicos	61
5.6 Contagem total e diferencial de células no BAL.....	62
5.7 Quantificação de proteínas no BAL	63
5.8 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão e rim	64
5.9 Histologia do pulmão	65
5.10 Avaliação da expressão de proteínas por <i>Western blotting</i>	66
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal

As doenças renais são caracterizadas pela incapacidade dos rins de realizar suas funções, e tem como fator de risco para o seu desenvolvimento várias condições diferentes, sendo as principais a hipertensão e diabetes (BIKBOV *et al.*, 2020; COUSER *et al.*, 2011), além de histórico familiar, uso crônico de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), infecções sistêmicas, obesidade e idade avançada (INKER *et al.*, 2014). Essas condições podem resultar em doença renal crônica (DRC) e/ou insuficiência renal aguda (IRA), que são caracterizadas pela diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), que é definida como a quantidade total de fluido filtrado por todos os néfrons funcionais por unidade de tempo, aumento dos níveis séricos de creatinina e ureia, elevados valores de albumina secretada na urina (albuminúria) e alterações do débito urinário (FARRAR, 2018).

A IRA é definida por um rápido declínio da função renal que acontece em horas ou dias, e pode ser causada por diversos quadros clínicos como obstrução renal, sepse, toxinas renais, entre outras causas. A resolução do quadro clínico ao longo de dias a semanas confirma o diagnóstico de IRA (RONCO; BELLOMO; KELLUM, 2019). Entretanto, se o quadro permanece ao longo do tempo é confirmado a DRC, onde observa-se por mais de 3 meses uma diminuição lenta e progressiva da função renal, observado pelos principais marcadores de dano renal representados na tabela 1 (WEBSTER *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Critérios para classificar pacientes com doença renal crônica.

APRESENTAR UM OU MAIS MARCADORES DE DANO RENAL POR MAIS DE 3 MESES	Albuminúria
	Anormalidades do sedimento urinário
	Anormalidades histológicas
	Anormalidades estruturais detectadas por imagem
	História de transplante renal
	Redução na TFG (<60 ml/min/1.73 m ²)

Na tabela estão representados os critérios para classificar o paciente como portador de DRC de acordo com: Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group.

Na prática clínica a TFG é utilizada como marcador do dano renal e como parâmetro para classificar a DRC em 5 estágios de severidade, independente da patologia subjacente,

como mostra a Tabela 2. Os valores da TFG juntamente com albuminúria devem ser acompanhados para avaliação de riscos e encaminhamento para terapias.

Tabela 2 - Estágios da DRC de acordo com os valores da TFG.

Estágio	Descrição	TFG (ml/min/1.73 m²)
1	Dano renal com TFG normal	≥90
2	Ligeiramente diminuída	89-60
3a	Moderadamente diminuída	59-45
3b	Moderadamente a severamente diminuída	44-30
4	Severamente diminuída	29-15
5	Insuficiência renal	<15

Na tabela está representado os valores de estimativa de TFG (eTFG), a unidade de medida usada para eTFG é mL/min/1,73m², derivada de uma área de superfície corporal média. [Valores de acordo com *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group*].

Muitos pacientes com DRC evoluem para doença renal em estágio terminal (DRET), que é o ponto inicial para diálise crônica ou transplante renal (HEMMELGARN *et al.*, 2010; O'HARE *et al.*, 2012), entretanto existem aqueles pacientes que apresentam uma DRC com progressão muito lenta da doença e nunca desenvolvem DRET. Também já foi relatado que há pacientes que evoluem para DRET como resultado de um episódio irreversível de IRA (HSU *et al.*, 2009; O'HARE *et al.*, 2012). Todas essas condições estão associadas à baixa qualidade de vida, comorbidades, altos custos da saúde e alta mortalidade.

A DRC é um grande problema de saúde global que contribui para o aumento da morbidade e mortalidade, e um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças (ZOCCALI *et al.*, 2017). Em 2017, houve no mundo 697,5 milhões de casos de DRC, a prevalência foi estimada em 9,1% na população mundial e resultou em 1,2 milhões de mortes, classificando-se como a 12^a principal causa de morte (BIKBOV *et al.*, 2020). Muitos pacientes são assintomáticos e o diagnóstico é feito através de exames de rotina ou até que apresentem complicações geradas pela DRC (WEBSTER *et al.*, 2017). Uma das consequências da queda da função renal é o acúmulo de substâncias tóxicas que seriam normalmente excretadas pelos rins, as chamadas toxinas urêmicas, que contribuem para o dano e alteração da função de outros sistemas e órgãos, podendo causar disfunção do sistema imune, disfunção plaquetária, disbiose intestinal entre outras alterações (WEBSTER *et al.*, 2017).

A manifestação fisiopatológica comum na DRC é a fibrose renal, que representa a cicatrização malsucedida do tecido renal após uma lesão e é caracterizada por glomeruloesclerose, atrofia tubular e fibrose intersticial (WEBSTER *et al.*, 2017). Existem vários mecanismos de formação de lesão glomerular, variando de lesão formada por acúmulo de proteínas anormais, lesão hemodinâmica, lesão mediada por anticorpos ou lesão citotóxica (MA; FOGO, 2007). A fibrose intersticial está intimamente associada à TFG e à filtração anormal de proteínas. A medida que a fibrose evolui, o epitélio tubular lesado perde a capacidade regenerativa e sofre apoptose, levando à atrofia tubular e criando glomérulos não funcionais, prejudicando progressivamente a função renal (WEBSTER *et al.*, 2017).

A IRA e a DRC têm fatores de risco comuns e uma relação bidirecional. Normalmente após uma lesão aguda, existe um processo adaptativo e o rim pode se recuperar totalmente, no entanto, lesões graves ou frequentes diminuem a capacidade de reparo dos rins, e pode ocorrer progressão com perda de néfrons, inflamação crônica e fibrose tecidual. Desta forma, a IRA evolui para uma DRC. Inversamente, pacientes com DRC podem desenvolver episódios de IRA, onde ocorre uma queda acentuada na TFG por dias podendo levar à morte ou uma piora no quadro da DRC quando o episódio de IRA termina (CHOU; CHU; LIN, 2018; FIORENTINO *et al.*, 2018; PANNU, 2013; SINGH; RIFKIN; BLANTZ, 2010).

1.2 Doença renal crônica e manifestações extra-renais

Os rins são fundamentais para o funcionamento do organismo como um todo, e as alterações que ocorrem na DRC podem trazer prejuízo para outros órgãos, causando manifestações extra-renais. Pacientes que sofrem de doenças renais podem acumular substâncias orgânicas ou inorgânicas que são denominadas toxinas urêmicas. Essas toxinas são geradas a partir do metabolismo de proteínas e geralmente são eliminadas do organismo pelos rins por filtração glomerular, ou por secreção tubular quando ligadas a proteínas. Entretanto, em pacientes com DRC pode ocorrer o acúmulo destas toxinas que podem exercer efeitos urêmicos em vários sistemas, promovendo um estado pró-inflamatório (WEBSTER *et al.*, 2017).

Essa perda da função renal pode causar um desequilíbrio do metabolismo energético, disfunções imunológicas, desordem mineral óssea, apneia do sono devido à hiperatividade simpática, prejuízo da sinalização neuroendócrina, alterações na coagulação, entre outras manifestações (SCHEEL; LIU; RABB, 2008; ZOCCALI *et al.*, 2017). Os rins também possuem papel endócrino sendo responsáveis por hidrolisar a molécula precursora da vitamina D na sua

forma ativa. Juntamente com a insuficiência renal, os níveis diminuídos da vitamina D levam à hipocalcemia e hiperparatireoidismo que são os principais fatores causadores de osteoporose secundária à DRC (JEAN; SOUBERBIELLE; CHAZOT, 2017). Outra complicação frequente é a anemia, sendo que múltiplos fatores contribuem para o seu desenvolvimento na DRC, mas o principal é a deficiência de eritropoietina acompanhado de uma deficiência de ferro (BATCHELOR *et al.*, 2020; MIKHAIL *et al.*, 2017). Seja por uma lesão direta, pela perda de suas funções ou pela incapacidade de eliminar substâncias tóxicas, as alterações renais podem levar à disfunção de órgãos distantes, como os pulmões, o que aumenta o risco de morte do paciente.

1.2.1 Doença renal crônica e manifestações pulmonares

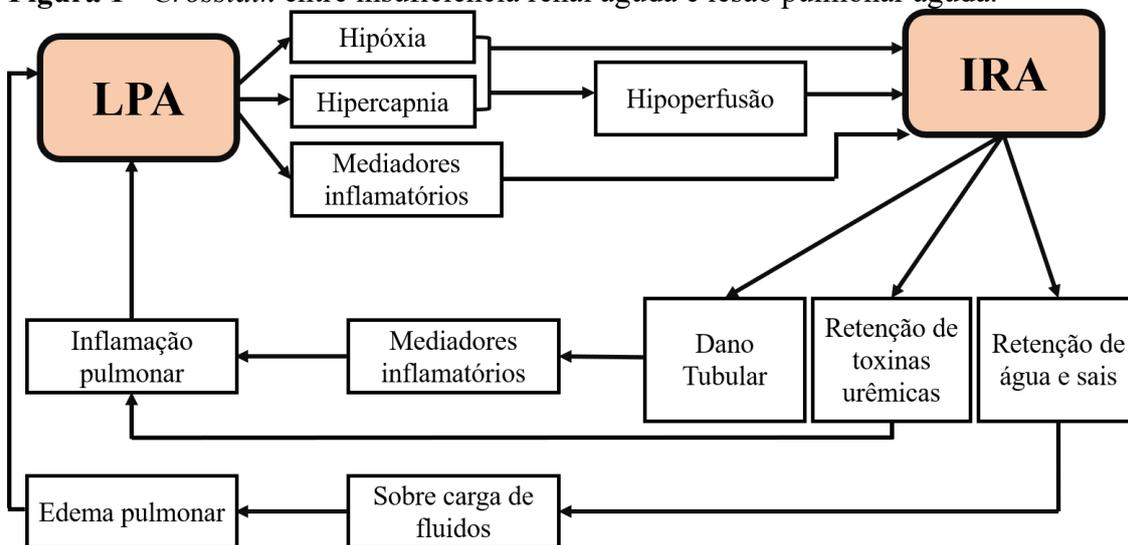
A disfunção renal também parece ser um fator de risco para algumas alterações pulmonares. Estudos demonstram que a DRC é frequente em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (FEDELI *et al.*, 2017; ZOCCALI *et al.*, 2017) e é um fator de risco para o desenvolvimento de sepse e pneumonia (SU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que roedores com IRA isquêmica e DRC induzido por dieta rica em adenina apresentam lesão pulmonar caracterizada por edema pulmonar, infiltração de neutrófilos, aumento da atividade da enzima mieloperoxidase e infiltração intersticial de leucócitos (KLEIN *et al.*, 2008; NEMMAR *et al.*, 2017).

Os rins desempenham um papel importante na produção e eliminação de mediadores inflamatórios e a exposição prolongada a esses mediadores na DRC parece contribuir para a lesão pulmonar (HOKE *et al.*, 2007). Pacientes com DRC geralmente apresentam processo inflamatório e níveis elevados de várias citocinas pró-inflamatórias (FEDELI *et al.*, 2017; SCHEEL; LIU; RABB, 2008; STENVINKEL *et al.*, 2002), sendo que os altos níveis de IL-6 e proteína C reativa (PCR) são preditores de risco de morte na DRC (TRIPEPI; MALLAMACI; ZOCCALI, 2005).

Foi demonstrado que altos níveis de IL-6 tem efeitos pró-fibróticos no pulmão (LE *et al.*, 2014). Ademais, a análise genômica no tecido pulmonar mostrou que genes pró-inflamatórios são altamente regulados durante a doença renal, onde se observa um aumento da expressão gênica de IL-6 acompanhado de um aumento de IL-10 circulante, levando a uma disfunção pulmonar induzida por IRA (HASSOUN *et al.*, 2007).

Essas evidências mostram que os danos associados à IRA podem induzir prejuízos para o pulmão, e o contrário também é verdadeiro (Figura 1) (revisado em DOMENECH et al., 2017).

Figura 1 - Crosstalk entre insuficiência renal aguda e lesão pulmonar aguda.



Legenda: Insuficiência renal aguda (IRA); lesão pulmonar aguda (LPA). Adaptado de DOMENECH et al., 2017.

Apesar da ampla evidência de que o pulmão pode ser um órgão distante afetado na doença renal, são poucos estudos, em animais, que mostram o efeito da DRC nas alterações pulmonares induzidas por esta condição. Assim, estudar as consequências da DRC no pulmão é extremamente importante e poderá traçar novos alvos terapêuticos para essas patologias.

1.3 Modelos experimentais de DRC

A fim de uma melhor compreensão desse quadro clínico, a caracterização de modelos de estudos em roedores é necessária para entender a fisiopatologia das alterações pulmonares na DRC. A maioria dos protocolos em roedores para estudar doenças renais são feitos de forma aguda, e são poucos estudos em roedores que tentam esclarecer como o pulmão pode ser afetado na DRC.

Dentre os modelos disponíveis para estudar a DRC, a nefrectomia 5/6 é um modelo bem estabelecido e é frequentemente utilizado por mimetizar a DRC em humanos, pois induz diminuição na TFG e na depuração de creatinina, e aumento na creatinina e ureia plasmáticas, bem como elevação da pressão arterial (ASKARI; SEIFI; KADKHODAEI, 2016; GHOSH *et al.*, 2009). Nesse modelo, os animais passam por uma nefrectomia total de um dos rins e remove-se 2/3 do outro rim com um bisturi, representando alterações de características

estruturais, como atrofia tubular, glomeruloesclerose e fibrose intersticial (BECKER; HEWITSON, 2013; YANG; ZUO; FOGO, 2010). Mesmo com todas as vantagens de mimetizar o quadro clínico observado na DRC em humanos, esse modelo de nefrectomia 5/6 tradicional tem a desvantagem de apresentar um alto índice de mortalidade por hemorragia inerente ao procedimento cirúrgico (BAO *et al.*, 2018).

Um modelo não cirúrgico que é utilizado para o desenvolvimento da DRC é com a administração de adenina na dieta por um determinado tempo. A adenina é uma base nitrogenada com importante papel no organismo, mas em excesso pode ser tóxica (ENGLE *et al.*, 1996). A adenina, administrada na dieta de camundongos, é metabolizada em 2,8-dihidroxiadenina que precipita e forma cristais tubulares que vão causar danos no tecido renal, levando a um quadro que mimetiza a DRC (NEMMAR *et al.*, 2017; STOCKELMAN *et al.*, 1998; YOKOZAWA *et al.*, 1986).

Recentemente foi proposto uma modificação do procedimento de nefrectomia 5/6, que é chamado de nefrectomia parcial 5/6, onde é feita uma ligadura com linha cirúrgica nos dois polos de um dos rins, e uma semana depois é feita a nefrectomia total do outro rim. Este modelo se mostrou eficiente para prejudicar a função renal, causou anemia e hipertrofia cardíaca (WANG *et al.*, 2017). Esse modelo é uma proposta interessante por apresentar menor risco de morte em relação ao modelo tradicional, pois apresenta menor risco de hemorragia.

A melhor compreensão da fisiopatologia das alterações pulmonares nas doenças renais e a descoberta de novos agentes terapêuticos são extremamente necessários para reduzir a morbidade e mortalidade associada a essas condições, e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O sistema endocanabinoide (eCB) ganhou importância nos últimos anos, pois alguns estudos têm apontado esse sistema como alvo terapêutico promissor em várias doenças.

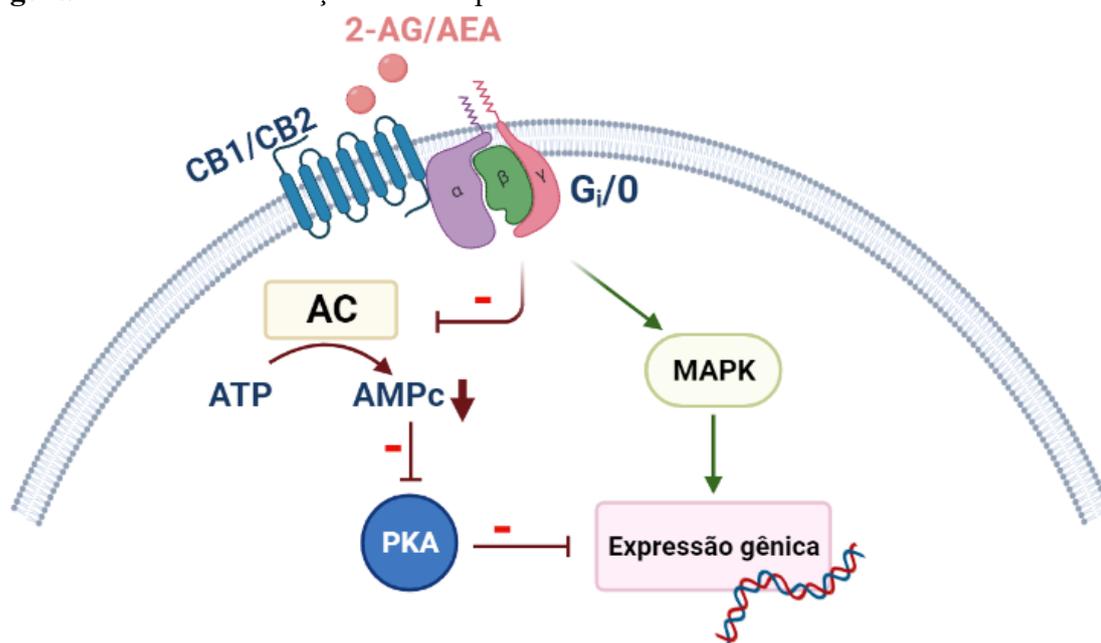
1.4 Sistema endocanabinoide como alvo terapêutico

O sistema eCB compreende os produtos do ácido araquidônico [anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG)], que são produzidos “sob demanda” (isto é, quando necessário sob estímulos patológicos ou fisiológicos), receptores CB1 e CB2, e as enzimas monoacilglicerol lipase (MAGL) e hidrolase amida de ácidos graxos (FAAH) que degradam 2-AG e AEA, respectivamente (PERTWEE, 2005).

Os receptores CB1 e CB2 são receptores acoplados à proteína G (Gi/o) e podem inibir a atividade da adenilil ciclase e ativar a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), resultando em uma modulação da expressão gênica (DHOPESHWARKAR; MACKIE, 2014).

Embora exista uma subunidade de proteína G comum para os receptores CB1 e CB2, em alguns casos, sua sinalização leva a efeitos biológicos opostos (PARK *et al.*, 2017). Este fato pode ser explicado por diferentes fatores, incluindo localização diferencial de tipos celulares (PARK, 2015), diferente expressão na saúde e na doença (PARK *et al.*, 2017), ativação de outra subunidade da proteína G (LAUCKNER; HILLE; MACKIE, 2005) e sinalização tendenciosa (SOETHOUDT *et al.*, 2017) (Figura 2).

Figura 2 - Via de sinalização dos receptores canabinoides.



Legenda: 2-aracondonilglicerol (2-AG); anandamida (AEA); receptores canabinoides (CB1 e CB2) acoplados à proteína G inibitória (Gi/0); adenilato ciclase (AC); trifosfato de adenosina (ATP); monofosfato cíclico de adenosina (AMPc); proteína quinase A (PKA); proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Fonte: a autora.

A localização dos receptores parece ser um dos fatores mais importantes para diferenciar os efeitos biológicos gerados com a sinalização dos receptores CB1 e CB2. Enquanto os receptores CB1 são expressos principalmente em células do sistema nervoso central, os receptores CB2 são expressos, na sua maioria, em células do sistema imune (HOWLETT; ABOOD, 2017).

A expressão de CB1 e CB2 foi relatada em rins de camundongos, ratos e humanos sob condições fisiológicas (PARK *et al.*, 2017). Mais precisamente foi demonstrado a expressão de receptores CB2 em podócitos, células do túbulo proximal e células mesangiais (BARUTTA *et al.*, 2011; TAM, 2016). O sistema eCB desempenha um papel crítico na homeostase renal, controlando a hemodinâmica e a reabsorção tubular de sódio através da ativação dos receptores

CB1 (DEUTSCH *et al.*, 1997; KOURA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2017). AEA diminui a TFG e aumenta o fluxo sanguíneo renal em ratos através de vasodilatação da artéria aferente e eferente pela ativação do receptor CB1 (KOURA *et al.*, 2004). Além disso, a superexpressão de receptores CB1 nos rins de camundongos e o tratamento de ratos saudáveis com um agonista seletivo de CB1 foram associados ao aumento da proteinúria (HSU *et al.*, 2015).

Por outro lado, a ativação dos receptores CB2 tem sido apontada como benéfica na disfunção renal associada à obesidade (JENKIN *et al.*, 2016), lesão por isquemia e reperfusão (NETTEKOVEN *et al.*, 2016), nefropatia diabética (BARUTTA *et al.*, 2011; ZOJA *et al.*, 2016) e nefrotoxicidade induzida por cisplatina (HORVÁTH *et al.*, 2012; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2010, 2016) onde nesses estudos atenuou a albuminúria, a proteinúria, a infiltração de neutrófilos, os marcadores de fibrose, a morte celular e a excreção urinária de sódio.

Além disso, a expressão de receptores CB2 foi demonstrada em células endoteliais pulmonares (ZORATTI *et al.*, 2003) e dados do nosso grupo (não publicados) mostram uma redução da expressão de receptores CB2 em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de sepse induzido por pneumonia, sugerindo a participação deste sistema no dano pulmonar associado ao modelo. Também foi relatado que o aumento na expressão de receptores CB2 pode estar envolvido em mecanismos antifibróticos na fibrose pulmonar idiopática (LIU; SHI, 2019).

Entre os agonistas CB2 utilizados hoje na pesquisa, o β -cariofileno tem se mostrado interessante por ser encontrado naturalmente em óleos essenciais de diversas plantas como a pimenta preta, orégano e a canela, e é um componente importante, que pode representar até 35% do óleo essencial de *Cannabis sativa*. Sabe-se que além de apresentar alta afinidade por receptores CB2 e baixa, ou nenhuma, afinidade por receptores CB1 (GERTSCH *et al.*, 2008), o β -cariofileno pode atuar em outros receptores, como o PPAR γ (YOUSSEF; EL-FAYOUMI; MAHMOUD, 2019). O papel do β -cariofileno tem sido estudado em diversos modelos como um regulador e atenuador da inflamação e do estresse oxidativo protegendo órgãos do dano causado por essas condições, inclusive pode ser útil na profilaxia e no tratamento da COVID-19 (revisado em JHA *et al.*, 2021). Os efeitos do β -cariofileno já foram testados em um modelo murino de nefropatia induzida por cisplatina, e teve como resultado uma melhora na disfunção renal, no dano morfológico, na resposta inflamatória e redução do estresse oxidativo e morte celular. Este trabalho também mostrou que esse efeito estava ausente em camundongos *knockout* para CB2 (HORVÁTH *et al.*, 2012).

Embora tenhamos algumas evidências da participação do sistema eCB na doença renal, faltam estudos que avaliem o papel deste sistema nas alterações pulmonares associadas a esta condição. Com o modelo experimental bem estabelecido, podemos investigar a participação do sistema eCB nessa patologia, desvendando assim possíveis agentes terapêuticos.

2 HIPÓTESE

A hipótese desse estudo é que a DRC induzida pelo modelo de nefrectomia parcial 5/6 causa algum grau de lesão pulmonar. Ainda, que a ativação dos receptores CB2 atenua estas alterações pulmonares tornando estes receptores possíveis alvos terapêuticos para o tratamento desta condição.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi estudar as alterações pulmonares associadas à DRC induzida pelo modelo de nefrectomia parcial 5/6 em camundongos e avaliar o efeito da ativação de receptores CB2 nas alterações encontradas.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar o modelo de DRC através da avaliação da massa corporal, hemograma e da função renal pela determinação do clearance de creatinina, ureia plasmática e proteinúria;
- 2) Avaliar a expressão de receptores CB2 nos pulmões;
- 3) Avaliar as alterações no tecido pulmonar através da análise histológica e determinação da atividade da enzima mieloperoxidase;
- 4) Realizar a contagem celular e quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar;
- 5) Avaliar o efeito da ativação dos receptores CB2 e os mecanismos envolvidos nas alterações observadas em todos os parâmetros descritos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos, com idade entre 60 e 80 dias, de 40 a 60 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais permaneceram no biotério setorial do Laboratório de Doenças Cardiovasculares e

Renais (LabCaRe) onde foram tratados com anti-helmíntico Albendazol 10% (2 mL / 300mL água de beber) por 3 dias e suplemento nutricional (VitaGold®; Vitamina A, D3, E, B1, B2, B6, B12) (300 µL / 300 mL) por 4 dias. Após este tratamento, os animais foram mantidos em repouso por pelo menos 7 dias antes da realização dos experimentos. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro (12 h / 12 h) e com livre acesso à comida e água.

4.2 Delineamento experimental

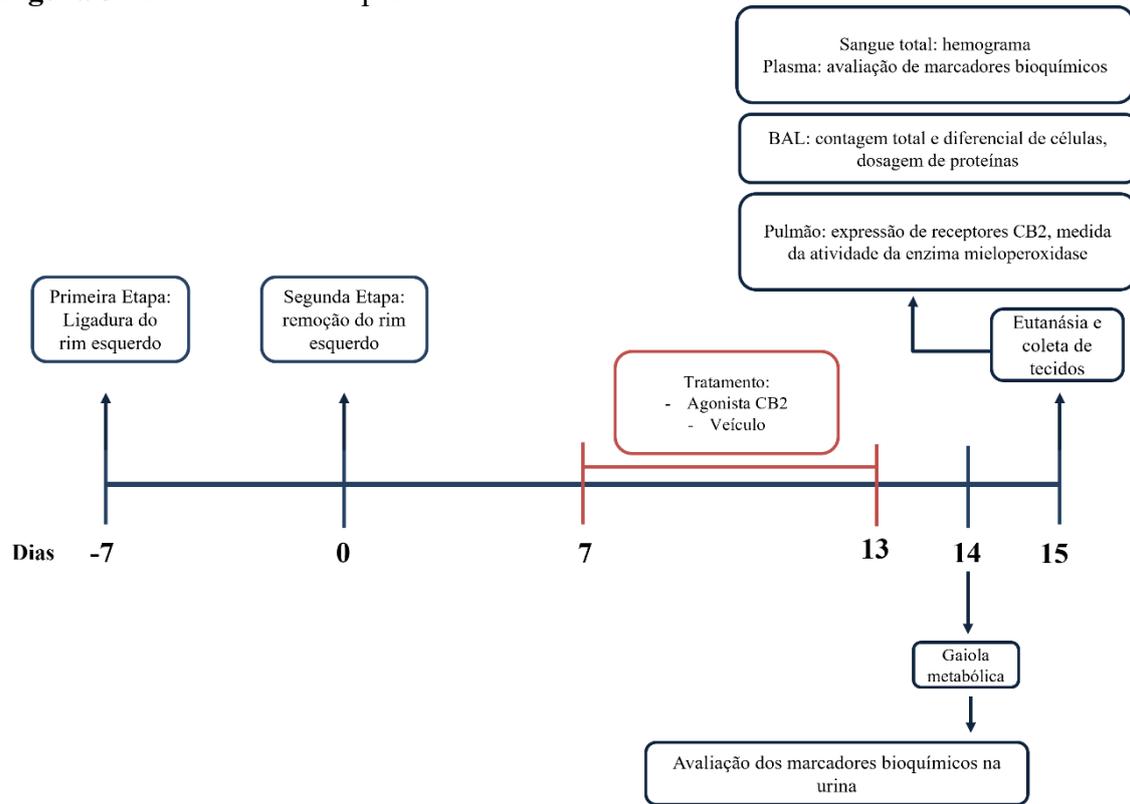
Os animais foram submetidos ao procedimento de nefrectomia parcial 5/6 e, receberam tratamento com o agonista CB2 β -cariofileno (10 mg/kg; i.p.) ou veículo (óleo de soja) administrado uma vez por dia durante 7 dias. A dose e a via de administração foram escolhidas de acordo com os dados da literatura (HORVÁTH *et al.*, 2012). Todos os animais tiveram seus parâmetros avaliados por até 15 dias após a segunda etapa do procedimento cirúrgico, descrito no item 3.3, sendo divididos em três grupos experimentais.

Sham: falso-operados.

NPx: animais que passaram pelo procedimento de nefrectomia parcial 5/6.

NPx- β : animais que passaram pelo procedimento de nefrectomia parcial 5/6 e receberam tratamento com agonista CB2 β -cariofileno.

Um resumo do delineamento experimental está representado na Figura 3. Animais falso-operados foram utilizados como controle. Buscando reduzir o número de animais, metade dos animais do grupo Sham recebeu veículo, e a outra metade recebeu β -cariofileno, e como não apresentaram diferença significativa (dados não mostrados), os animais foram agrupados.

Figura 3 - Delineamento experimental.

Resumo do delineamento experimental em linha do tempo.

4.3 Procedimento cirúrgico

Como modelo experimental de DRC, foi utilizado o procedimento de NPx modificado de Wang e colaboradores (2017). Os procedimentos cirúrgicos deste modelo experimental foram realizados em duas etapas, com intervalo de uma semana entre elas.

Todo procedimento foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº 4290051019).

4.3.1 Primeira etapa: Ligadura dos polos do rim esquerdo

Para evitar dor, os animais receberam morfina (5 mg/kg), por via subcutânea (s.c.), cinco minutos antes do início do procedimento cirúrgico. Após a administração do analgésico, foi administrado o antibiótico Enrofloxacin (10 mg/kg, s.c.) para prevenir infecções. Em seguida, os animais foram anestesiados com isoflurano (5%), seguido pela manutenção anestésica via máscara facial (isoflurano 3%). A eficácia da anestesia foi determinada pela ausência de reflexos palpebrais e ao pinçar as patas. Após estas condições, foi realizada tricotomia no flanco esquerdo e os animais foram dispostos sobre uma mesa cirúrgica aquecida (37 °C) para evitar hipotermia. A assepsia do local foi realizada utilizando álcool iodado (iodo 0,1% e álcool etílico 50% v/v), em seguida, com auxílio de lâminas de bisturi descartáveis (nº 10) foi realizada uma

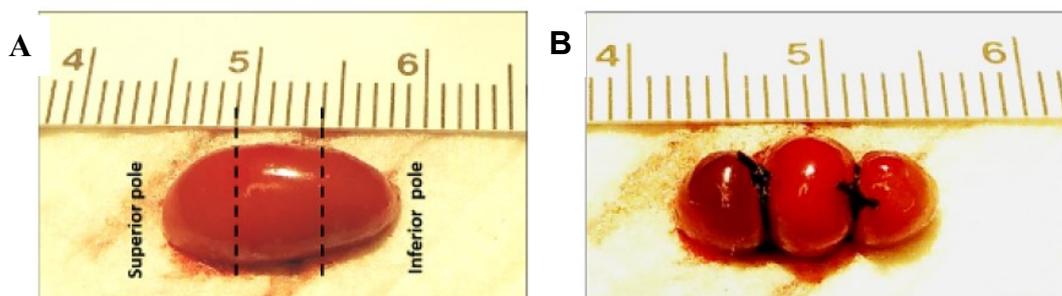
lombotomia com incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm. Após ter acesso a cavidade peritoneal, o rim esquerdo foi cuidadosamente separado e isolado da glândula adrenal e tecidos adjacentes e então, com auxílio de pinça serrilhada, o rim foi gentilmente externalizado. Em seguida, de forma que o ureter e os vasos sanguíneos renais não fossem obstruídos, os polos do rim receberam duas ligaduras (fio de sutura de seda 3-0) uma sobre 1/3 da porção superior e a outra sobre 1/3 da porção inferior (Figura 4). Após a feitura das ligaduras, o rim foi recolocado na cavidade peritoneal e o músculo e pele foram suturados com fio de seda 3-0 (Lamedid, Osasco, SP, Brasil). A temperatura corporal do animal foi monitorada durante o procedimento cirúrgico. Ao término dos procedimentos, os animais foram dispostos sobre manta de aquecimento (37 °C) para recuperação pós-operatória, e foram monitorados constantemente até recuperação total da consciência. Todos receberam reforço analgésico com morfina (5 mg/kg; s.c.) 4 horas após o procedimento. Foi feita a administração de antibiótico Enrofloxacina (10 mg/kg; s.c.) a cada 12 horas durante três dias, e como analgesia pós-operatória foi fornecida na água uma solução de paracetamol (300 mg/kg; v.o.) e tramadol (10 mg/kg; i.p.) durante três dias. Os animais tiveram acesso facilitado a água e ração.

4.3.2 Segunda etapa: Remoção do rim direito

Sete dias após a primeira etapa, os animais passaram pela nefrectomia total do rim direito. Neste procedimento, os camundongos receberam exatamente os mesmos cuidados pré-operatórios e operatórios descritos no item 3.3.1. No entanto, como os procedimentos cirúrgicos desta etapa foram realizados sobre o rim direito, uma lombotomia foi realizada no flanco direito do animal e então, o rim foi cuidadosamente isolado da glândula adrenal e tecidos adjacentes com subsequente externalização do mesmo. Em seguida, o ureter e os vasos renais foram identificados e, em torno deles, foram inseridas duas ligaduras (fio de sutura de seda 3-0), uma em direção a aorta abdominal e a outra em direção ao rim. Entre as ligaduras, os vasos e o ureter foram cortados para remoção do rim. A incisão do músculo e pele foram suturadas também com fio de seda 3-0.

Para o grupo Sham (falso-operado), os animais passaram pelos mesmos procedimentos descritos, mas não foram feitas as ligaduras sobre os polos do rim esquerdo e nem a remoção do rim direito.

Figura 4 - Local das ligaduras nos rins no modelo de nefrectomia parcial 5/6.



Em A, a imagem representa o local aproximado das ligaduras nos polos superiores e inferiores renais. Em B, a imagem representa o rim após feitas as ligaduras. Fonte: Wang et al., 2017.

4.3.3 Pontos finais humanitários

Após o procedimento cirúrgico e durante todo o procedimento experimental até a data da eutanásia foram feitas observações e aferições do peso corporal, temperatura, desidratação, comportamentos, corrimento ocular e/ou nasal, dados que foram anotados em fichas individuais. Os animais que apresentaram um ou mais sinais clínicos descritos abaixo foram imediatamente eutanasiados por sobredosagem anestésica [cetamina e xilazina (200/50 mg/kg)]:

- 1) redução de peso igual ou superior a 20% em relação ao peso inicial
- 2) hipotermia: diferença de temperatura de 4 °C abaixo do normal
- 3) desidratação severa: pinçamento de pele sem retorno indica perda hídrica de até 10%, sem os demais sinais, foi administrado fluído para reidratação
- 4) letargia ou decúbito, inabilidade em se mover na gaiola e/ou irresponsividade quando tocado
- 5) incapacidade de alcançar comida / água / deambular normalmente
- 6) sempre que o experimentador julgou que o sofrimento do animal estava acima do esperado para o procedimento em questão.

4.4 Avaliação dos marcadores bioquímicos na urina

Para coleta de urina, os animais foram alocados nas gaiolas metabólicas por 8 ou 10 horas, durante o período claro, com água e ração fornecida *ad libitum*. A urina foi coletada a cada 1 hora e armazenada na geladeira até o final do período na gaiola. Após isso foi medido a quantidade de urina excretada por cada animal. Quando a amostra de urina teve quantidade suficiente avaliamos através da determinação semiquantitativa rápida, em tira reativa para urina, a densidade e o pH (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). As amostras foram centrifugadas e armazenadas no freezer -20 °C até posterior análise. Foi realizada a quantificação de creatinina e de proteínas totais por meio de kits comerciais conforme as

instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Os valores foram obtidos de acordo com a absorvância no comprimento de onda de 540 nm e a quantificação de proteínas totais foi expressa em mg/dL. A creatinina urinária foi utilizada para cálculo da depuração. A fórmula utilizada foi: $[\text{creatinina urinária (mg/dL)} / \text{creatinina plasmática (mg/dL)} \times \text{volume urinário (\mu\text{L}/\text{min})}] / \text{massa corporal do animal (g)}$.

4.5 Avaliação dos marcadores bioquímicos no plasma

Após avaliação dos parâmetros hematológicos, as mesmas amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos para obtenção do plasma. Os níveis séricos de ureia (dosagem do nitrogênio na forma de ureia) e creatinina foram determinados utilizando kits comerciais da Siemens, de acordo com as instruções do fabricante no equipamento Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, BY, Alemanha). Os valores foram expressos em mg/dL.

4.6 Obtenção de tecidos e lavado broncoalveolar (BAL)

No dia seguinte da coleta de urina, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (115 e 15 mg/kg, respectivamente, i.p.) e o sangue foi obtido através de punção cardíaca. As amostras foram homogeneizadas em microtubos contendo 5 UI de heparina sódica para cada 1 mL de sangue. Foram determinados em contador hematológico automatizado (modelo Horiba, ABX®, Micros 60; Montpellier, França) os seguintes parâmetros: hemoglobina, leucócitos totais e diferenciais (linfócitos, monócitos e granulócitos), volume plaquetário médio (VPM) e volume corpuscular médio (VCM).

Para a coleta do BAL, os animais tiveram suas traqueias expostas e um cateter (21G) acoplado a uma seringa foi introduzido na traqueia para que se possa injetar vagarosamente 1 mL de PBS estéril nos pulmões, sendo em seguida o BAL aspirado de volta à seringa, sendo este processo repetido 3 vezes. Apenas amostras nas quais o volume recuperado foi de pelo menos 80% do volume injetado foram analisadas, conforme o item 4.7.

Após a obtenção do BAL, os animais foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%; 4 °C) e em seguida os tecidos de interesse (pulmões, rim esquerdo e coração) foram coletados. O rim e o coração foram pesados para análise da massa relativa e o pulmão e o rim foram armazenados em freezer -80 °C até o momento das análises descritas abaixo.

4.7 Contagem total e diferencial de células no BAL

O BAL coletado foi dividido em três alíquotas. A primeira foi diluída em líquido de Türk (2%) e em seguida foi realizada a contagem total de células em câmara de Neubauer. A segunda alíquota foi concentrada em lâmina através da técnica de citocentrifugação e foi realizada a contagem diferencial de células após coloração utilizando um conjunto de corantes Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). O número de leucócitos nas amostras foi expresso como células x 10⁶/mL de BAL. A terceira foi centrifugada (3.000 g por 10 minutos) e armazenada em freezer -80 °C, onde posteriormente foi realizada a quantificação de proteínas.

4.8 Extravasamento de proteínas para o pulmão

Como índice de extravasamento de proteínas para o pulmão, em uma alíquota do BAL foi realizada a quantificação de proteínas pelo método de Bradford. A concentração das proteínas presentes na amostra foi calculada através da interpolação dos valores de absorbância em uma curva padrão nas concentrações 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 µg/mL de soroalbumina bovina (BSA). As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 595 nm (SpectraMax® Paradigm®, Molecular Devices, EUA).

4.9 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão e rins

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (20 mM; pH 7,4) e centrifugados (13.000 g, 10 min, 4 °C). O precipitado foi suspenso em tampão fosfato (50 mM; pH 6,0), contendo 0,5% (p/v) de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Nesta etapa, apenas para o tecido renal, as amostras foram incubadas (2 h; 60 °C) com o objetivo de eliminar possíveis peroxidases interferentes. As amostras foram vortexadas e centrifugadas novamente (13.000 g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas e para o ensaio de determinação da atividade da enzima MPO como indicador da presença de neutrófilos no tecido. Para o ensaio enzimático foram utilizados 30 µL do sobrenadante, e a reação foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM) e solução de peróxido (H₂O₂; 0,3 mM; em tampão fosfato de sódio 80 mM; pH 5,4). Para o ensaio enzimático, foi utilizado uma alíquota de 30 µL do sobrenadante em placas de 96 poços, que foi incubada por 6 minutos a 37 °C em leitor de placas e a absorbância foi medida a 650 nm (Multileitora Infinite M200, Tecan, Suíça). A determinação de proteínas na amostra foi determinada pelo método ácido bicinonínico (BCA) e os valores apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O.) / mg de proteína.

4.10 Histologia do pulmão

Após serem retirados, os pulmões foram preenchidos com solução de paraformaldeído (PFA 4% em PBS) e deixados nessa solução por 24 horas para fixação, seguido por lavagem com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e Na₂HPO₄ 10,8 mM; pH 7,4) 3 vezes, por 30 minutos cada, então o PBS foi substituído por soluções de etanol a 30%, 50% e 70% em que o tecido foi mantido até análise histológica. Posteriormente, as amostras foram processadas (Leica TP1020), emblocadas em parafina (Leica EG1150H), seccionados na espessura de 5 µm no Micrótomo Rotativo (Leica RM2255) e os cortes foram dispostos em lâminas.

As lâminas histológicas de pulmão foram coradas (Leica AutoStainer XL) com hematoxilina e eosina. Para a análise dos tecidos foi utilizado um microscópio óptico na objetiva de menor aumento (4x) para delimitação da área a ser analisada. As objetivas de maior aumento (40x) foram utilizadas para identificar estruturas. A análise foi realizada por três pessoas diferentes, sem conhecimento dos grupos experimentais, que classificaram semiquantitativamente a extensão da inflamação de acordo com o espessamento da parede alveolar e a infiltração de neutrófilos (PENG *et al.*, 2017), no final foi feita a média do escore observado. A pontuação foi determinada como: 0, sem inflamação; 1, inflamação leve (0-25% do pulmão); 2, inflamação moderada (25-50% do pulmão); 3, inflamação grave (50-75% do pulmão); 4, quase todo o tecido pulmonar contém infiltrado inflamatório.

4.11 Avaliação da imunoreatividade de proteínas de interesse por *Western blotting*

Para a técnica de *Western blotting* o pulmão foi congelado em nitrogênio líquido, pulverizado e lisado em tampão anti-protease [(Na₂VO₄ 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1% (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA; P8340) em T-Per (Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA)], que promove a ruptura das células do tecido para a extração das proteínas. Em seguida as amostras foram homogeneizadas por sonicação (60 Watts, 10 segundos). Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, os homogenatos foram centrifugados a 9000 g por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi reservado. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para quantificação das proteínas das amostras realizada através do ensaio de Bradford, conforme já descrito no item 4.8.

Foi feita a desnaturação das proteínas no restante do sobrenadante através da adição do tampão Laemili[®] (glicerol 25%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris / HCl

0,2 M e SDS 10%) e do aquecimento das amostras a 95 °C por 5 minutos. Após isso as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida de 10%. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose por aplicação de uma corrente elétrica. As membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 0,2% (v/v) em ácido tricloroacético 3% (v/v) para visualização e controle da transferência das proteínas, e lavadas três vezes (10 minutos), sob agitação, com TBS-T (Tris- HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 (0,05%; v/v), pH 7,5) para retirada do corante. Após o bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó Molico desnatado 5% em TBS-T por 1 hora, as membranas foram expostas ao anticorpo primário anti-CB2 (1:1000; Cayman, 101550), anti-ICAM-1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, 1511) ou anti-beta-actina (1:45000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) *overnight* à 4 °C. Depois, foram realizadas três lavagens (10 minutos), sob agitação, com TBS-T, em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase, o que permitiu a revelação das proteínas através da técnica de quimioluminescência (Chemidoc MP, Bio-Rad). As análises quantitativas foram determinadas através da densitometria das bandas através do programa ImageJ® (versão 1.53e; NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.12 Análise estatística

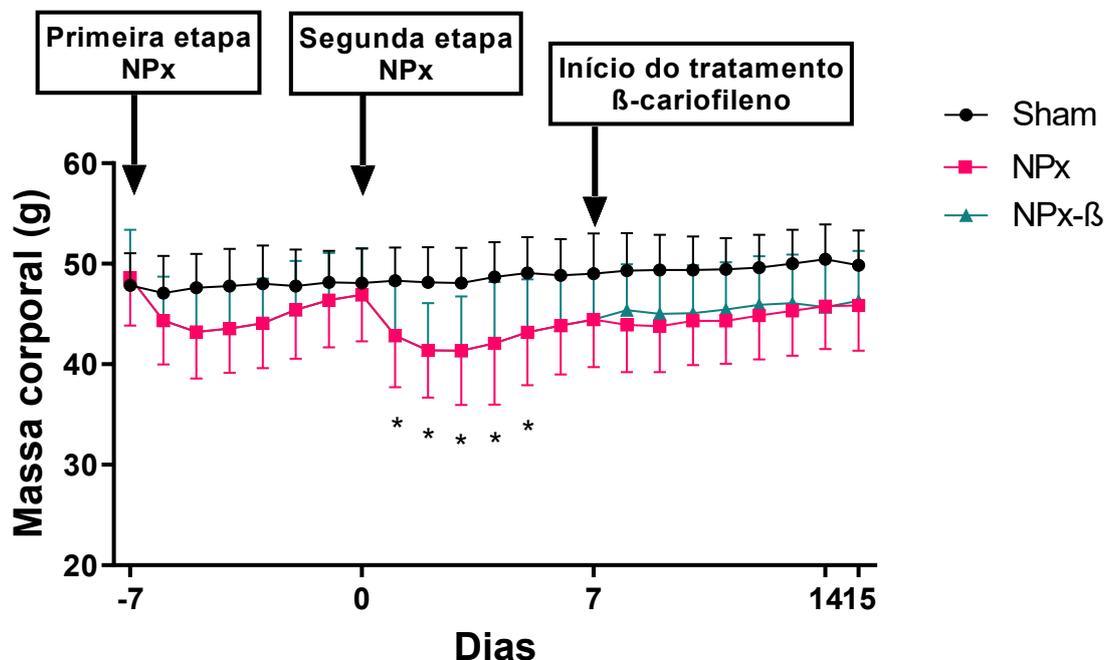
Como a natureza dos dados foi considerada quantitativa, para garantir normalidade e homogeneidade de variância, foi realizado os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. A análise estatística da massa corporal foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. A análise dos dados de densidade e pH da urina e de histologia foram realizadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Para os demais testes, a análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. Todos os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média de n determinações. Para todos os parâmetros foi realizada a análise de *outliers*, e quando um *outlier* foi identificado esse foi removido do n amostral. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism® 9.0.1 (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Massa corporal

A massa corporal foi avaliada diariamente a partir da primeira etapa do procedimento de nefrectomia (Figura 5). Os grupos NPx e NPx- β foram considerados o mesmo grupo até o início do tratamento. Observamos que, em comparação com os animais Sham, os animais que passaram pelo procedimento de nefrectomia apresentaram uma perda significativa de massa corporal após a segunda etapa do procedimento cirúrgico. Essa perda foi proeminente dos dias 1 ao 5. A partir do dia 5 os animais recuperaram o peso, não existindo mais diferença significativa em relação ao grupo Sham.

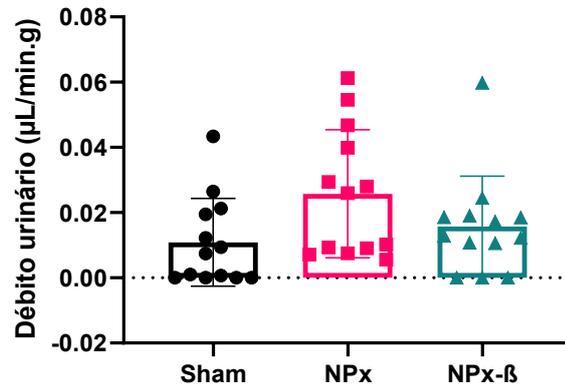
Figura 5 - Massa corporal diária.



Média da massa corporal diária. Sham: animais falso-operados (n=13); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx- β : animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=13). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. *p < 0,05 em relação ao grupo Sham (ANOVA de duas vias, com medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni).

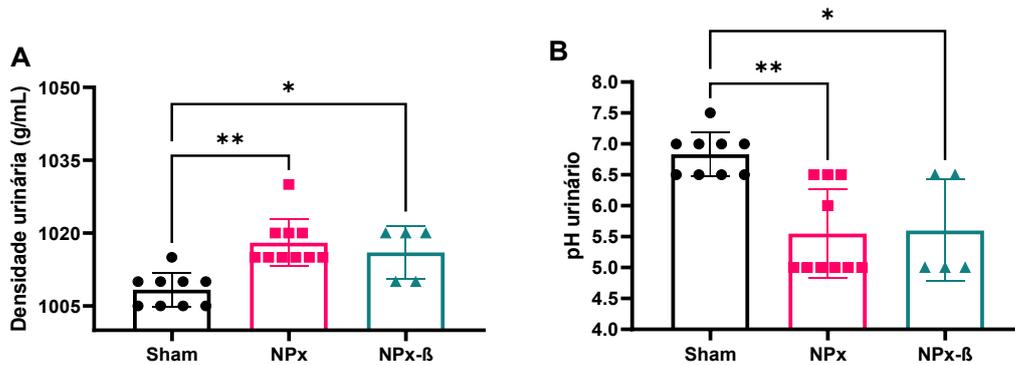
5.2 Débito urinário, pH e densidade

Com o volume de urina excretado foi feito o cálculo do débito urinário (volume de urina / tempo x peso), representado na Figura 6. O grupo NPx apresentou um leve aumento do débito urinário em relação ao grupo Sham, porém, sem diferença estatística entre os grupos.

Figura 6 – Débito urinário.

Avaliação do débito urinário (volume de urina (μL) / tempo (minutos) x peso (g)). Sham: animais falso-operados ($n=13$); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 ($n=13$); NPx- β : animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno ($n=13$). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via.

Ao analisar os dados de densidade e do pH na urina, representados na Figura 7, observamos um aumento na densidade urinária nos grupos NPx em relação ao grupo sham. Por outro lado, houve redução do pH urinário dos grupos que passaram pelo procedimento de nefrectomia parcial em relação ao grupo sham.

Figura 7 - Densidade e pH da urina.

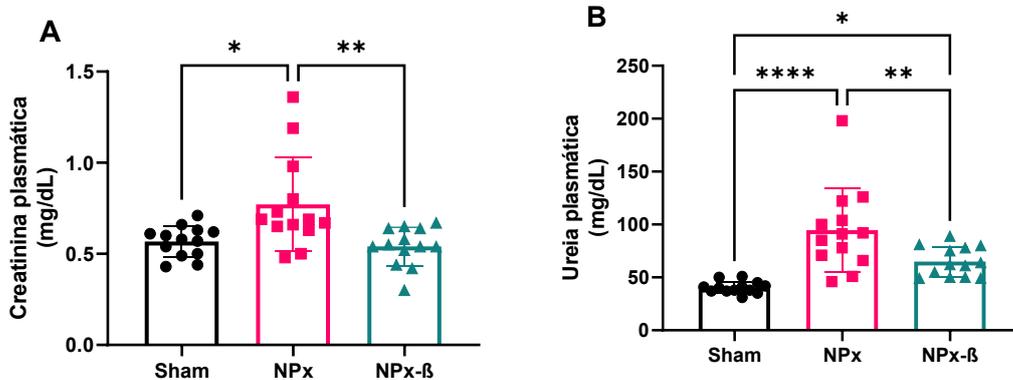
Avaliação da densidade (A) e do pH (B) das amostras de urina. Sham: animais falso-operados ($n=9$); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 ($n=10$); NPx- β : animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno ($n=5$). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ (Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn).

5.3 Marcadores bioquímicos no plasma e na urina

Ao analisar os marcadores de dano renal no plasma, observamos aumento na creatinina (Figura 8A) e na ureia (Figura 8B) no grupo NPx em relação ao grupo sham. O tratamento dos animais NPx com β -cariofileno reduziu os dois marcadores quando comparado ao grupo

veículo. Ao analisar os dados de ureia plasmática, a redução foi parcial já que não diminuiu a ponto de se igualar ao grupo sham.

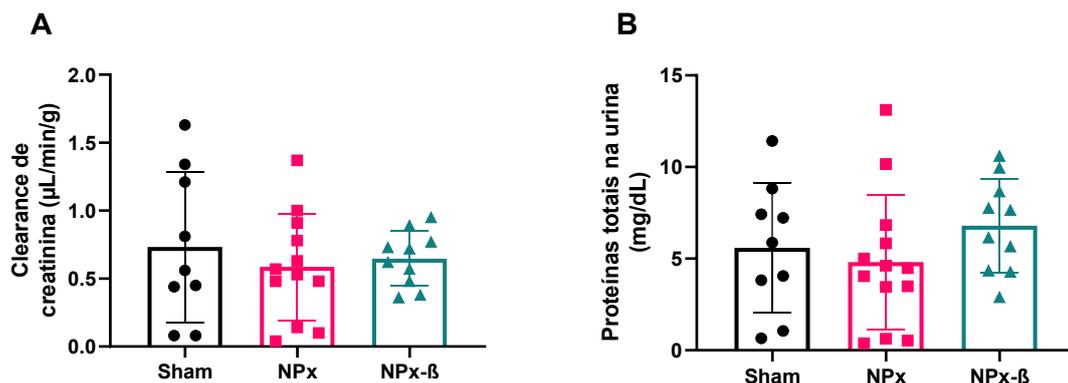
Figura 8 - Marcadores bioquímicos creatinina (A) e ureia (B) no plasma.



Marcadores bioquímicos creatinina (A) e ureia (B) no plasma. Sham: animais falso-operados (n=13); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=13). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. *p < 0,05, **p < 0,005 e ****p < 0,0001 (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

Quando avaliamos os marcadores de dano renal, clearance de creatinina e proteínas totais na urina não encontramos diferença nesses dois parâmetros (Figura 9).

Figura 9 - Clearance de creatinina (A) e proteínas totais (B) na urina.



Clearance de creatinina (A) e proteínas totais (B) na urina. Sham: animais falso-operados (n=9); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=10). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. ANOVA de uma via.

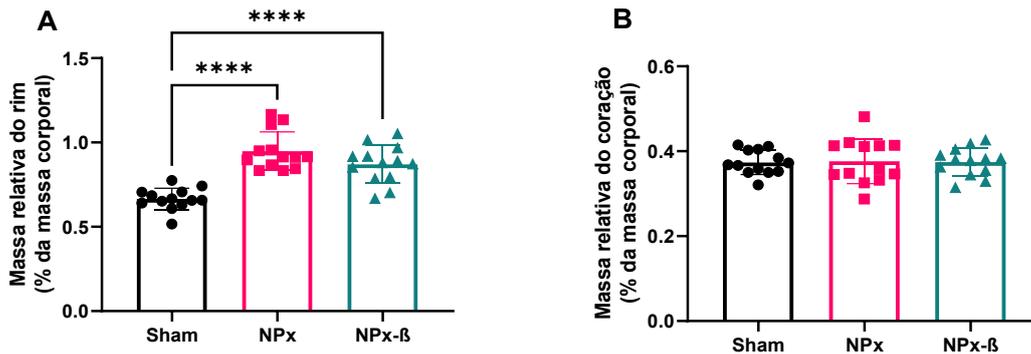
5.4 Massa relativa do rim e do coração

A análise da massa relativa do rim esquerdo (massa do rim / massa corporal x 100), representada na Figura 10A mostrou que os animais dos grupos NPx e NPx-β tiveram um

aumento significativo da massa relativa dos rins quando comparados aos animais do grupo Sham, entretanto não houve diferença entre estes dois grupos.

Foi avaliada a massa relativa do coração (massa do coração / massa corporal x 100), como demonstrado na Figura 10B, e não foi encontrada diferença entre os grupos.

Figura 10 - Massa relativa do rim e do coração.



Massa do tecido corrigida de acordo com a massa corporal (mc) do animal em gramas (massa do tecido / massa corporal). (A) massa relativa do rim esquerdo (g/g mc), (B) peso relativo do coração (g/g mc). Sham: animais falso-operados (n=13); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=13). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. ****p < 0,0001 (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.5 Parâmetros hematológicos

Foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos: leucócitos totais, linfócitos, monócitos, granulócitos, hemoglobina (Hb), volume plaquetário médio (VPM) e volume corpuscular médio (VCM), conforme apresentados na Tabela 3.

Podemos observar valores menores de Hb nos animais submetidos à cirurgia de NPx quando comparado ao grupo sham. O tratamento não alterou este parâmetro. Por outro lado, não houve diferença nos valores do VPM, VCM e granulócitos entre os grupos sham e NPx veículo, mas o grupo NPx-β apresentou aumento quando comparado a ambos os grupos.

Não encontramos diferença entre os grupos nos valores de leucócitos, linfócitos e monócitos.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos.

	Sham	NPx	NPx-β
Leucócitos / μl de sangue (x10³)	6,6 ± 1,2	6,7 ± 2,3	8,2 ± 1,8
Linfócito / μl de sangue (x10³)	4,5 ± 1,3	4,5 ± 1,7	4,8 ± 1,7
Monócito / μl de sangue (x10³)	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,4	1,2 ± 0,6
Granulócito / μl de sangue (x10³)	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,9 ± 1,0* [#]
Hemoglobina (g/dL)	11,6 ± 0,8	9,8 ± 0,9*	9,2 ± 1,1*
VPM (μm³)	5,0 ± 0,9	6,6 ± 2,4	9,6 ± 1,6* [#]
VCM (fL)	17,4 ± 0,9	17,4 ± 0,7	21,3 ± 1,3* [#]

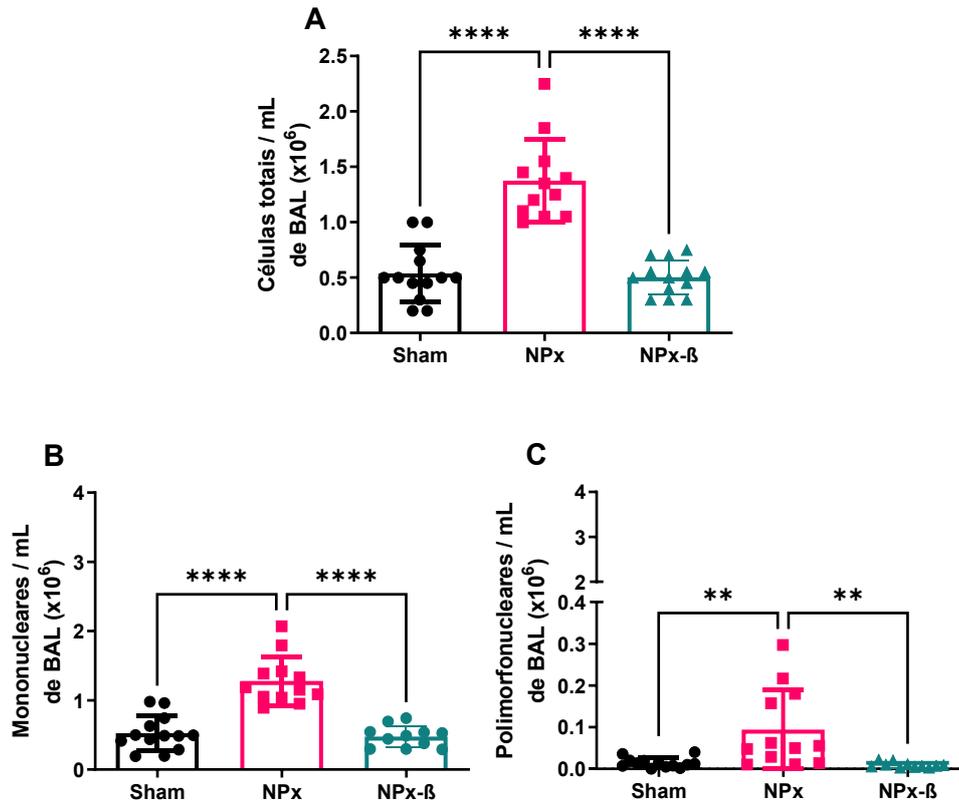
Avaliação dos parâmetros hematológicos: leucócitos totais, linfócitos, monócitos, granulócitos, hemoglobina e volume plaquetário médio. Sham: animais falso-operados (n=13); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=13). Os valores foram expressos como média ± desvio. *p < 0,05 em relação ao grupo Sham e # p < 0,05 em relação ao grupo NPx (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.6 Contagem total e diferencial de células no BAL

Ao realizar a contagem total de células no BAL, observamos um aumento significativo no grupo NPx em relação ao grupo Sham, mostrando um efeito do procedimento de indução da DRC. O tratamento dos animais NPx com o agonista CB2 reduziu o número total de células no BAL quando comparado ao grupo veículo, se igualando aos valores dos animais falso-operados (Figura 11A).

Refletindo esse aumento no número total de células no grupo NPx em relação ao grupo Sham, observamos um aumento tanto nas células mononucleares (Figura 11B) quanto polimorfonucleares (Figura 11C), sugestivo de um processo inflamatório sistêmico. O tratamento dos animais NPx com agonista CB2 também reduziu o número dos dois tipos celulares no BAL quando comparado ao grupo veículo, mostrando uma possível redução do processo inflamatório.

Figura 11 - Contagem de células no BAL.

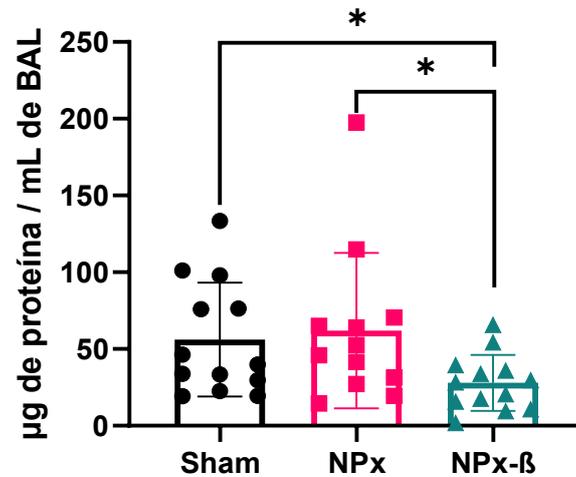


Células totais (A), células mononucleares (B) e células polimorfonucleares (C) no lavado broncoalveolar (BAL) de animais falso operados (sham) ou submetidos ao modelo de nefrectomia parcial (NPx). Sham: animais falso-operados (n=13); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx- β : animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=13). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. **p < 0,005, ****p < 0,0001 (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.7 Quantificação de proteínas no BAL

Realizamos a quantificação de proteínas no BAL (Figura 12) e conseguimos observar que os valores de proteína se mostraram diminuídos no grupo NPx- β em relação ao grupo NPx e ao grupo sham. Não houve diferença no grupo NPx em relação ao grupo sham.

Figura 12 - Quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar.



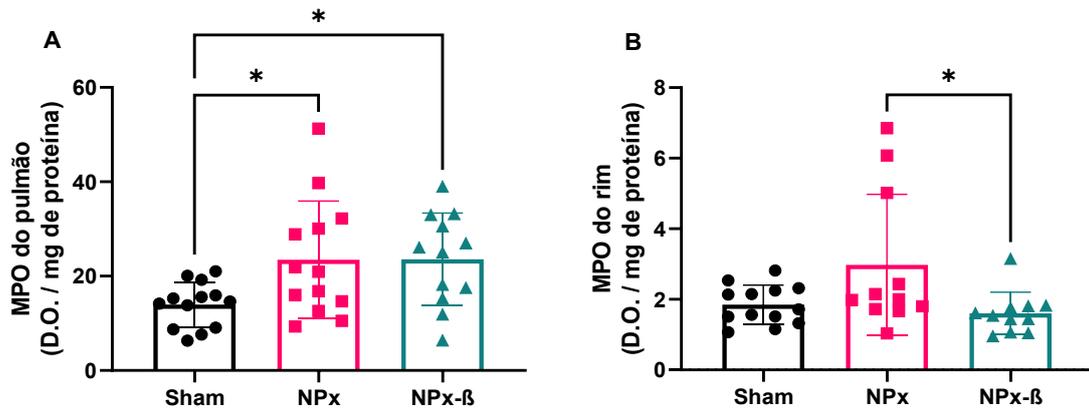
Dosagem de proteína na amostra de lavado broncoalveolar (BAL) através do método de Bradford. Sham: animais falso-operados (n=13); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=13). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.8 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão e rim

Foi realizada a determinação da atividade da enzima MPO nos pulmões e rins, com objetivo de avaliar a migração e ativação de neutrófilos. Com isso, conseguimos observar um aumento da enzima MPO no pulmão dos grupos que passaram pela cirurgia de nefrectomia em relação ao grupo Sham (Figura 13A). O tratamento dos animais NPx como o agonista CB2 não alterou a atividade da enzima MPO.

Já nos rins não houve diferença entre o grupo Sham e NPx, porém foi observada uma diferença significativa entre os grupos que passaram pelo procedimento de nefrectomia, em que a enzima se mostrou diminuída nos animais que receberam tratamento com o agonista CB2 (Figura 13B).

Figura 13 - Atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão e no rim.



Atividade da enzima MPO no pulmão (A) e no rim (B) (D.O. / mg de proteína). Sham: animais falso-operados (n=13); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=13); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=13). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. *p < 0,05 (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.9 Histologia do pulmão

A análise histológica do pulmão foi realizada com objetivo de avaliar o dano ao tecido pulmonar, aferindo a infiltração de neutrófilos e o espessamento da parede alveolar (Figura 14). Com isso, conseguimos observar (Figura 15) dano tecidual no pulmão dos grupos que passaram pela cirurgia de nefrectomia em relação ao grupo Sham. O tratamento dos animais NPx como o agonista CB2 não alterou esse parâmetro.

Figura 14 - Imagem histológica do tecido pulmonar.

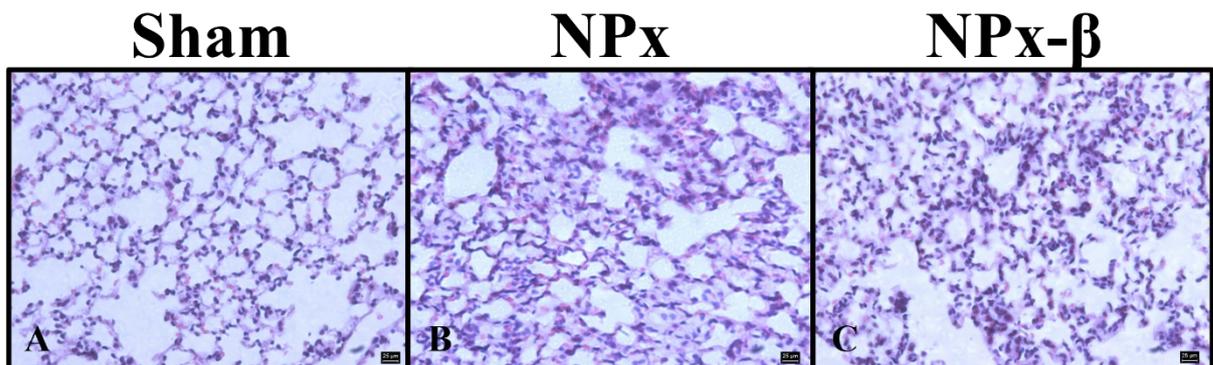
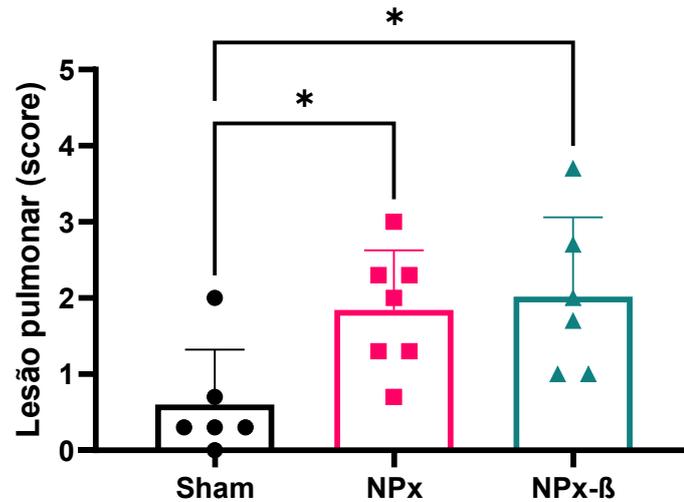


Imagem representativa do tecido pulmonar corado com hematoxilina e eosina (400x). (A) Sham: animais falso-operados; (B) NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6; (C) NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno.

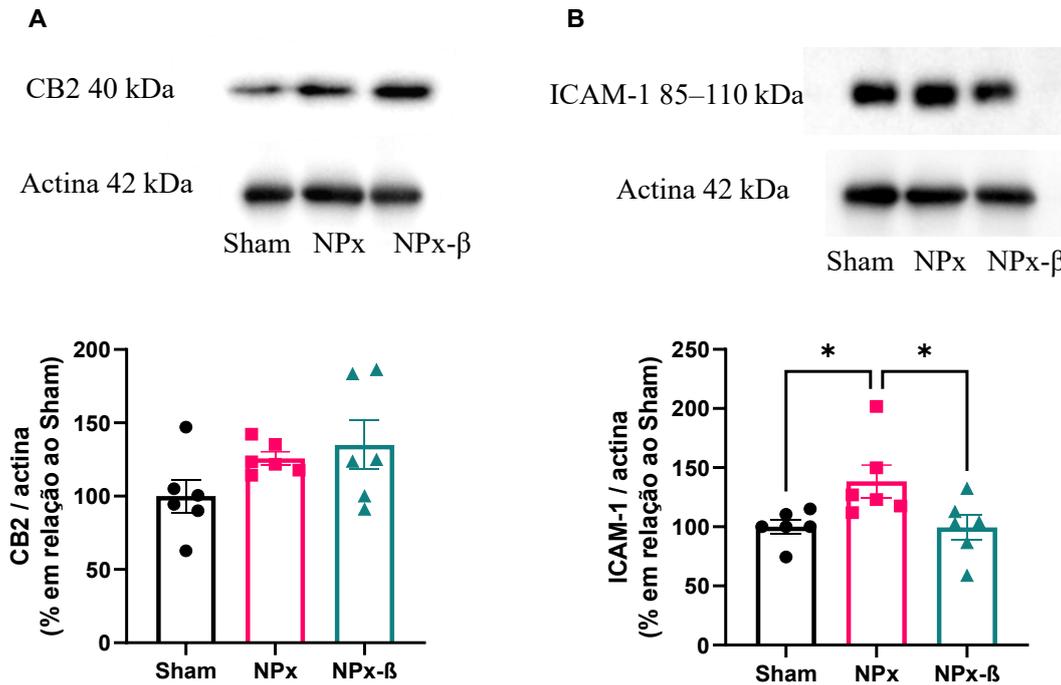
Figura 15 - Escore de lesão pulmonar

Escore de dano ao tecido pulmonar. Escore: 0, sem inflamação; 1, inflamação leve (0-25% do pulmão); 2, inflamação moderada (25-50% do pulmão); 3, inflamação grave (50-75% do pulmão); 4, inflamação muito grave (75-100% do pulmão). Sham: animais falso-operados (n=6); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=7); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=6). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. *p < 0,05 (Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn).

5.10 Avaliação da imunoreatividade de proteínas de interesse por *Western blotting*

Não houve diferença no conteúdo proteico de receptores CB2 entre os grupos nos pulmões (Figura 16A). Entretanto, observamos que a DRC induzida pela nefrectomia parcial 5/6 (NPx) promoveu o aumento na densidade da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em relação ao grupo Sham, e o tratamento dos animais NPx com β-cariofileno (NPx-β) reduziu a expressão desta proteína (Figura 16B).

Figura 16 - Análise por *Western blotting* dos receptores CB2 e da ICAM-1 no tecido pulmonar.



(A) análise da expressão de receptores CB2 no pulmão e (B) análise da expressão da molécula de adesão ICAM-1, seguidos pela imagem representativa de cada proteína. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ e foi expressa de acordo com a % do grupo sham. Sham: animais falso-operados (n=6); NPx: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 (n=6); NPx-β: animais submetidos à nefrectomia parcial 5/6 tratados com beta-cariofileno (n=6). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

A DRC é um problema de saúde pública e acomete milhões de pessoas ao redor do mundo. Devido ao seu papel vital no funcionamento do organismo, tanto a falência renal crônica como a aguda apresentam diversos efeitos sistêmicos nocivos, sendo os pulmões um dos principais órgãos acometidos. Por exemplo, é bem estabelecido que a DRC é um fator de risco para o desenvolvimento de sepse, pneumonia e COVID-19 severa (ORTIZ *et al.*, 2021; SU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2011). Assim, além de preservar a função renal, estudar possíveis alvos terapêuticos para a DRC é importante para diminuir as complicações sistêmicas. Neste cenário, nos propusemos a estudar os efeitos do tratamento com β -cariofileno na preservação da função pulmonar em animais com DRC.

Para atingir nossos objetivos, primeiramente buscamos reproduzir um modelo experimental de DRC onde a falha da função pulmonar fosse evidente e o modelo de escolha nesse projeto foi a nefrectomia parcial 5/6 modificada conforme desenvolvido por Wang e

colaboradores (WANG *et al.*, 2017). Embora existam outros modelos experimentais de DRC, este modelo apresenta algumas vantagens, como boa reprodutibilidade, menor taxa de mortalidade quando comparado ao modelo clássico de nefrectomia 5/6, baixo custo para sua execução, e alterações renais em pouco tempo de análise (WANG *et al.*, 2017).

Em comparação ao grupo falso-operado os animais nefrectomizados apresentaram uma redução passageira (nos cinco primeiros dias após o segundo procedimento cirúrgico) na massa corporal, recuperando a massa com o passar do tempo. Esta perda de massa não parece ser consequência apenas do procedimento cirúrgico, pois os animais falso-operados também foram submetidos a uma falsa cirurgia. Portanto, existe uma perda de massa corporal decorrente da DRC já que os animais NPx apresentaram menor massa corporal do que os animais sham, embora tenha sido estatisticamente diferente apenas do primeiro ao quinto dia após a segunda cirurgia. Estes dados corroboram com resultados já publicados em estudos com modelos animais de DRC (ALI *et al.*, 2013; GAVA *et al.*, 2012; HAMZAOUI *et al.*, 2020) além de ser observado em pacientes com DRC que apresentam diminuição da massa muscular (FOUQUE *et al.*, 2008; KOPPE; FOUQUE; KALANTAR-ZADEH, 2019). O tratamento dos animais com o agonista CB2, β -cariofileno, não modificou este parâmetro.

Em comparação ao grupo Sham, os animais NPx apresentaram uma tendência de aumento no volume de urina excretado. Devido ao nosso número amostral não podemos concluir que o débito urinário está aumentado no grupo NPx, entretanto dados da literatura mostram que animais submetidos a nefrectomia 5/6 tradicional apresentam um aumento no débito urinário (GAVA *et al.*, 2012; HAMZAOUI *et al.*, 2020).

Ao analisar os dados de densidade urinária observamos um aumento nesse parâmetro nos animais NPx quando comparado ao grupo controle, independente do tratamento. De acordo com o teste utilizado, a densidade da urina é medida através da concentração de íons e se baseia no fato de que com o aumento da concentração iônica ocorre aumento da densidade. Como os animais NPx apresentaram maior densidade e, conseqüentemente maior concentração iônica, inferimos que o possível aumento do débito urinário não ocorre devido ao aumento na ingestão de água, pois assim a urina seria mais diluída e, conseqüentemente apresentaria uma menor densidade. A densidade aumentada junto com um maior volume urinário nos indica que o rim não está sendo capaz de reabsorver água e eletrólitos

Quando observamos os dados do pH urinário, notamos uma diferença nos grupos NPx, independente do tratamento, onde a urina se mostrou mais ácida quando comparada com o grupo Sham. Isto sugere que há aumento da excreção de ácidos na urina, possivelmente devido

ao início de uma acidose metabólica, que é uma das complicações em pacientes com DRC, onde o tamponamento urinário é insuficiente, o que leva a uma maior excreção de íons H^+ (LEAL; LEITE JR.; MAFRA, 2008). A faixa normal de pH urinário de camundongos encontrada na literatura é em torno de 5,0 (SUCKOW; DANNEMAN; BRAYTON, 2001). Porém, os valores encontrados nas nossas condições de normalidade foi 6,8 (média do pH do grupo controle), e quando comparamos com os grupos NPx independente do tratamento encontramos uma média de 5,6 (média do pH do grupo NPx e NPx- β). Desta forma, esses resultados mostram uma redução do pH urinário o que pode sugerir um aumento da excreção de H^+ devido a acidose metabólica que pode ocorrer na DRC.

Contrariando nossas expectativas, ao analisar os dados de proteínas totais na urina, não observamos diferença entre os grupos, mostrando que no período analisado ainda não existe proteinúria, ou que nosso método não foi capaz de detectar. Entretanto, ao analisar os marcadores creatinina e ureia no plasma, conseguimos observar a presença de disfunção renal, pois houve aumento em ambos os marcadores, corroborando com o estudo utilizado como referência para reproduzir o modelo (WANG *et al.*, 2017). Assim, o aumento das concentrações de creatina e ureia no plasma, somado com um maior volume urinário e maior densidade validam nosso modelo de DRC.

Surpreendentemente, o tratamento com β -cariofileno preveniu parcialmente a falha renal, pois os animais expostos a esse agonista CB2 apresentaram, em comparação com os animais NPx veículo, uma redução nas concentrações plasmáticas de creatinina e ureia. Esses resultados não eram esperados pois o modelo que utilizamos é uma lesão renal direta e não reversível. Os níveis de creatinina plasmática após o tratamento se tornaram comparáveis aos valores do grupo Sham. Esses dados corroboram com o encontrado em outros modelos como o de nefropatia diabética (JENKIN *et al.*, 2016) e nefrotoxicidade por cisplatina (HORVÁTH *et al.*, 2012), onde a ativação desse receptor também foi capaz de reduzir estes parâmetros. A nossa surpresa foi devido ao fato de que nestes modelos a nefropatia/nefrotoxicidade são reversíveis, diferente do modelo utilizado neste estudo. Para entender melhor esse achado seria necessário a realização de mais experimentos, como por exemplo a histologia renal, com a finalidade de identificar alguma melhora no dano tecidual em consequência do tratamento com β -cariofileno. Vale ressaltar que o efeito protetor da lesão renal no modelo de nefrotoxicidade por cisplatina, por diminuição desses marcadores bioquímicos, estavam ausentes em camundongos *knockout* para os receptores CB2 (HORVÁTH *et al.*, 2012).

Ao calcularmos a massa relativa do rim esquerdo e do coração de todos os animais, tivemos outra surpresa. A massa relativa foi calculada com objetivo de normalizar a massa desses tecidos de acordo com a massa corporal de cada animal. Ao calcular a massa relativa do rim, todos animais que passaram pelo procedimento de nefrectomia parcial 5/6, mesmo com 2/3 do rim disfuncional devido a presença da ligadura, mostrou-se significativamente aumentada quando comparado ao grupo falso-operado. É possível observar na análise macroscópica do rim que os polos estão atrofiados, entretanto, o terço do rim remanescente nos animais NPx parece estar edemaciado (Anexo 1). Além disso, observando alguns cortes histológicos do rim (Anexo 2), encontramos um aumento do tecido fibrótico na região dos polos, o que ajudaria a explicar o aumento da massa relativa deste órgão. O aumento na massa do rim na DRC já foi mostrado no modelo induzido por adenina na dieta (ALI *et al.*, 2013) e também no modelo de nefrectomia 5/6 tradicional (GRIFFIN *et al.*, 2000).

Por outro lado, ao calcular a massa relativa do coração, não conseguimos observar nenhuma diferença entre os grupos, mostrando que até o período analisado não houve aumento do tecido cardíaco. Dados na literatura mostraram que dependendo da linhagem de camundongos as alterações cardíacas no modelo de nefrectomia 5/6 tradicional, podem ser mais leves ou mais severas. Hamzaoui e colaboradores mostraram que animais C57BL/6JRj não tiveram aumento do tecido cardíaco, já animais 129/Sv apresentaram um aumento na massa do coração (HAMZAOUI *et al.*, 2020).

O rim é o principal órgão responsável pela produção de eritropoietina, uma glicoproteína responsável por estimular a proliferação das células progenitoras eritroides e, conseqüentemente, produzir eritrócitos (JELKMANN, 2011). Na insuficiência renal, esse hormônio deixa de ser produzido e ocorre redução do número de células vermelhas e conseqüentemente diminuição dos valores de hemoglobina (JELKMANN, 2011). Ao analisarmos este parâmetro, observamos uma diminuição da hemoglobina nos animais que passaram pelo procedimento de nefrectomia comparado ao grupo sham, sendo que o tratamento com agonista CB2 não foi capaz de alterar estes valores. Quando analisamos os dados obtidos através da análise do sangue total, observamos que nos animais NPx tratados com β -cariofileno houve aumento do número de granulócitos, do volume corpuscular médio e do volume plaquetário médio ao comparar com o grupo NPx veículo e animais falso-operados. Estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento destas alterações causadas pelo tratamento com o β -cariofileno.

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa mostraram que existe a expressão de receptores CB2 nos pulmões, sendo um possível alvo para atenuar a inflamação neste tecido (SOUZA, 2021). Embora tenhamos confirmado esses dados, ou seja, detectamos a expressão proteica desses receptores nos pulmões dos animais, nem a indução da DRC nem o tratamento causou alterações na sua expressão. Entretanto, a ativação destes receptores através do β -cariofileno se mostrou como um potencial alvo promissor para reduzir pulmonares danos relacionados com a DRC.

Como nosso foco foi estudar as alterações pulmonares decorrentes da DRC, avaliamos a migração de células para o pulmão, fazendo a contagem total e diferencial de células no BAL. Observamos um aumento no número de células totais, derivado tanto do aumento de células polimorfonucleares quanto de mononucleares. Em um processo inflamatório inicialmente, com o intuito de proteger o tecido inflamado, observa-se um aumento da migração de neutrófilos, e com o acúmulo de neutrófilos pode-se observar um extravasamento de líquidos e proteínas para o líquido extracelular, levando a um dano tecidual. Já na inflamação crônica tem-se principalmente o aumento de células mononucleares, uma vez que estas células fagocitam neutrófilos apoptóticos e outras células (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). De maneira muito interessante, o tratamento com o antagonista CB2 reduziu o processo inflamatório pulmonar induzido pela DRC, diminuindo os dois tipos celulares encontrados.

Dados recentes do nosso grupo (não publicados) mostraram que um outro agonista CB2, o AM1241, promoveu redução da migração de células para os pulmões em um modelo murino de sepse induzida por pneumonia (SOUZA, 2021). Nossos resultados reforçam estes achados de que a ativação dos receptores CB2 regulam a atividade inflamatória pulmonar. O efeito anti-inflamatório da ativação de receptores CB2 já foi anteriormente reportado em estudos com modelos de nefropatia diabética (BARUTTA *et al.*, 2011), sepse (LEHMANN *et al.*, 2012) e edema de pata (GERTSCH *et al.*, 2008), entre outros.

Quantificamos também a atividade da enzima mieloperoxidase, que está presente nos grânulos azurófilos dos leucócitos, uma forma indireta de avaliar a migração de leucócitos para o tecido (BRADLEY *et al.*, 1982). Nos pulmões, conseguimos observar um aumento da atividade da enzima nos animais que passaram pelo procedimento de indução da doença renal quando comparado ao grupo sham, sendo que o tratamento não alterou este parâmetro. Já nos rins, não observamos diferenças na medida da atividade da enzima MPO quando comparamos o grupo NPx com o grupo Sham. Por outro lado, ao compararmos o grupo NPx tratado com β -

cariofileno com o grupo controle, o tratamento reduziu a atividade da enzima MPO, o que sugere uma redução do processo inflamatório no tecido renal.

Corroborando com os resultados encontrados na atividade da enzima MPO, a análise histológica dos pulmões dos animais mostrou dano no tecido observado através da infiltração de células e pelo espessamento da parede alveolar, sendo que o tratamento não alterou esse parâmetro. Nossos dados corroboram com a literatura em que já foi demonstrado uma lesão pulmonar como consequência da DRC (NEMMAR *et al.*, 2017), porém nesse caso o tratamento não foi capaz de reverter esse dano, isso pode ser pelo tempo de tratamento ou por uma lesão irreversível.

A quantificação de proteínas no BAL foi feita com objetivo de avaliar a permeabilidade vascular pulmonar, que pode estar relacionado com o grau de lesão do tecido pulmonar. Contrariamente às nossas expectativas, não foi possível observar alteração neste parâmetro entre os animais Sham e NPx, porém, os animais que receberam tratamento com agonista CB2 apresentaram diminuição na permeabilidade pulmonar, quando comparados a ambos os grupos, mostrando um efeito protetor do β -cariofileno.

Como o tratamento dos animais NPx com β -cariofileno reduziu a migração de células para o tecido pulmonar, resolvemos investigar o papel da ICAM-1 neste processo, já que ela participa da adesão de leucócitos às células e é necessária no processo de migração de células para o foco inflamatório. A migração de células para os tecidos ocorre quando um dano tecidual presente no tecido causa liberação de fatores quimiotáticos de neutrófilo (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Essa migração ocorre por um processo complexo onde os neutrófilos são ativados, e as células endoteliais passam a expressar moléculas de adesão as quais se ligam a carboidratos presentes na membrana de leucócitos, e estes, quando aderidos, são capazes de transmigrarem para o foco da inflamação. Nossos resultados mostraram que a expressão proteica da ICAM-1 nos pulmões aumentou em decorrência da DRC, sendo que o tratamento reduziu esta proteína. Nossos dados corroboram com dados na literatura que mostraram uma redução da expressão ICAM-1 nos rins de camundongos tratados com β -cariofileno no modelo de nefrotoxicidade por cisplatina (HORVÁTH *et al.*, 2012).

Com nosso trabalho obtivemos resultados importantes para entender a fisiopatologia das alterações pulmonares induzidas pela doença renal, bem como mostramos que a ativação dos receptores CB2, através do β -cariofileno, é um possível alvo terapêutico para resolução de alguma dessas alterações. Entretanto, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão da fisiopatologia, como o peso seco/molhado dos rins e do pulmão e experimentos

para entender melhor os mecanismos pelos quais o cariofileno atua, como adicionar um grupo tratado com antagonista CB2.

7 CONCLUSÕES

Com os nossos resultados podemos concluir que o modelo de nefrectomia parcial 5/6 foi eficaz para induzir danos renais e causar alterações inflamatórias no tecido pulmonar, aumentando o número de células polimorfonucleares e mononucleares no BAL, aumento da atividade da MPO, espessamento da parede alveolar e aumento da expressão da molécula de adesão ICAM. O tratamento com o agonista CB2 β -cariofileno reduziu, pelo menos em parte, as alterações pulmonares secundárias à DRC, podendo ser uma possível estratégia terapêutica para ser utilizada nestes casos.

REFERÊNCIAS

ALI, Badreldin H. *et al.* New model for adenine-induced chronic renal failure in mice, and the effect of gum acacia treatment thereon: Comparison with rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 384–393, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.05.001>

ASKARI, Hassan; SEIFI, Behjat; KADKHODAEI, Mehri. Evaluation of renal-hepatic functional indices and blood pressure based on the progress of time in a rat model of chronic kidney disease. **Nephro-Urology Monthly**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 4–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5812/numonthly.37840>

BAO, Yin Wu *et al.* Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. **Zoological research**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 72–86, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.055>

BARUTTA, Federica *et al.* Protective Role of Cannabinoid Receptor Type 2 in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy. **Diabetes journals**, [S. l.], v. 60, p. 2386–2396, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db10-1809>

BATCHELOR, Elizabeth Katherine *et al.* Iron deficiency in chronic kidney disease: Updates on pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 456–468, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1681/ASN.2019020213>

BECKER, Gavin J.; HEWITSON, Tim D. Animal models of chronic kidney disease: Useful but not perfect. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [S. l.], v. 28, n. 10, p. 2432–2438, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ndt/gft071>

BIKBOV, Boris *et al.* Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10225, p. 709–733, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3)

BRADLEY, P. P. *et al.* **Metodo Bradley Para Verificar Mpo.Pdf**. [S. l.: s. n.]

CHOU, Yu Hsiang; CHU, Tzong Shinn; LIN, Shuei Liong. **Role of renin-angiotensin system in acute kidney injury-chronic kidney disease transition**. [S. l.]: Blackwell Publishing, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nep.13467>

COUSER, William G. *et al.* The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. **Kidney International**, [S. l.], v. 80, n. 12, p. 1258–1270, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ki.2011.368>

DEUTSCH, Dale G. *et al.* Production and Physiological Actions of Anandamide in the Vasculature of the Rat Kidney. **The American Society for Clinical Investigation**, [S. l.], v. 100, p. 1538–1546, 1997.

DHOPESHWARKAR, Amey; MACKIE, Ken. CB2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target—What.pdf. [S. l.], n. October, p. 430–437, 2014.

DOMENECH, Pilar *et al.* Kidney–lung pathophysiological crosstalk: its characteristics and importance. **International Urology and Nephrology**, [S. l.], v. 49, n. 7, p. 1211–1215, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1585-z>

ENGLE, Sandra J. *et al.* Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. **Genetics**, [S. l.], v. 93, n. May, p. 5307–5312, 1996.

FARRAR, Ashley. Acute Kidney Injury. **Nursing Clinics of NA**, [S. l.], p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2018.07.001>

FEDELI, Ugo *et al.* Lung and kidney: A dangerous liaison? A population-based cohort study in COPD patients in Italy. **International Journal of COPD**, [S. l.], v. 12, p. 443–450, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/COPD.S119390>

FIorentino, Marco *et al.* Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. **Contributions to Nephrology**, [S. l.], v. 193, p. 45–54, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000484962>

FOUQUE, D. *et al.* A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. **Kidney International**, [S. l.], v. 73, n. 4, p. 391–398, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002585>

GAVA, Agata L. *et al.* Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 167–173, 2012.

GERTSCH, Jürg *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>

GHOSH, S. S. *et al.* Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: Role of inflammation. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, [S. l.], v. 296, n. 5, p. 1146–1157, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90732.2008>

GRIFFIN, Karen A. *et al.* Functional and structural correlates of glomerulosclerosis after renal mass reduction in the rat. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 497–506, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1681/asn.v1113497>

HAMZAOUI, Mouad *et al.* 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58393-w>

HASSOUN, Heitham T. *et al.* Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, [S. l.], v. 293, n. 1, p. 30–40, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00023.2007>

HEMMELGARN, Brenda R. *et al.* Relation Between Kidney Function, Proteinuria, and Adverse Outcomes. **JAMA**, [S. l.], v. 303, n. 5, p. 423–429, 2010.

HOKE, Thomas S. *et al.* Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 155–164, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1681/ASN.2006050494>

HORVÁTH, Béla *et al.* B-Caryophyllene Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in a Cannabinoid 2 Receptor-Dependent Manner. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 52, n. 8, p. 1325–1333, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.014>

HOWLETT, Allyn C.; ABOOD, Mary E. CB1 & CB2 Receptor Pharmacology. **Adv Pharmacol.**, [S. l.], v. 80, p. 1–31, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.007.CB>

HSU, Chi-yuan *et al.* Nonrecovery of Kidney Function and Death after Acute on Chronic Renal Failure. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 4, p. 891–898, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2215/CJN.05571008>

HSU, Yung-chien *et al.* Induction of Proteinuria by Cannabinoid Receptors 1. **The American Journal of the Medical Sciences**, [S. l.], v. 349, n. 2, p. 162–168, 2015.

INKER, Lesley A. *et al.* KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 713–735, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.01.416>

JEAN, Guillaume; SOUBERBIELLE, Jean Claude; CHAZOT, Charles. Vitamin D in chronic kidney disease and dialysis patients. **Nutrients**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu9040328>

JELKMANN, Wolfgang. Regulation of erythropoietin production. **Journal of Physiology**, [S. l.], v. 589, n. 6, p. 1251–1258, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195057>

JENKIN, K. A. *et al.* Renal effects of chronic pharmacological manipulation of CB2 receptors in rats with diet-induced obesity. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 173, n. 7, p. 1128–1142, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13056>

JHA, Niraj Kumar *et al.* β -Caryophyllene, A Natural Dietary CB2 Receptor Selective Cannabinoid can be a Candidate to Target the Trinity of Infection, Immunity, and Inflammation in COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 12, n. May, p. 1–24, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.590201>

KLEIN, Christina L. *et al.* Interleukin-6 mediates lung injury following ischemic acute kidney injury or bilateral nephrectomy. **Kidney International**, [S. l.], v. 74, n. 7, p. 901–909, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ki.2008.314>

KOLACZKOWSKA, Elzbieta; KUBES, Paul. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3399>

KOPPE, Laetitia; FOUQUE, Denis; KALANTAR-ZADEH, Kamyar. Kidney cachexia or protein-energy wasting in chronic kidney disease: facts and numbers. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 479–484, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12421>

KOURA, Yukako *et al.* Anandamide Decreases Glomerular Filtration Rate through Predominant Vasodilation of Efferent Arterioles in Rat Kidneys. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 15, p. 1488–1494, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000130561.82631.BC>

LAUCKNER, Jane E.; HILLE, Bertil; MACKIE, Ken. The cannabinoid agonist WIN55

, 212-2 increases intracellular calcium via CB 1 receptor coupling to G q / 11 G proteins. **PNAS**, [S. l.], v. 102, p. 19144–19149, 2005.

LE, Thanh-Thuy T. *et al.* Blockade of IL-6 Trans Signaling Attenuates Pulmonary Fibrosis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 193, n. 7, p. 3755–3768, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302470>

LEAL, V. D. O.; LEITE JR., M.; MAFRA, D. Metabolic acidosis in chronic kidney disease: The nutritional approach | Acidose metabólica na doença renal crônica: Abordagem nutricional. **Revista de Nutricao**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 93–103, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732008000100010>

LEHMANN, Christian *et al.* Cannabinoid receptor 2 activation reduces intestinal leukocyte recruitment and systemic inflammatory mediator release in acute experimental sepsis. **Critical Care**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. R47, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/cc11248>

LIU, Jinhong; SHI, Guiling. Pirfenidone activates cannabinoid receptor 2 in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], p. 4241–4248, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8045>

MA, Li Jun; FOGO, Agnes B. Modulation of glomerulosclerosis. **Seminars in Immunopathology**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 385–395, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0087-y>

MIKHAIL, Ashraf *et al.* Renal association clinical practice guideline on Anaemia of Chronic Kidney Disease. **BMC Nephrology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–29, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0688-1>

MUKHOPADHYAY, Partha *et al.* Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress and cell death in nephropathy. **Free Radic Biol Med.**, [S. l.], v. 48(3), p. 457–467, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

MUKHOPADHYAY, Partha *et al.* The novel , orally available and peripherally restricted selective cannabinoid CB 2 receptor agonist LEI-101 prevents cisplatin-induced nephrotoxicity. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 173, p. 446–458, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13338>

NEMMAR, Abderrahim *et al.* Lung oxidative stress, DNA damage, apoptosis, and fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease in mice. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v.

8, n. NOV, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00896>

NETTEKOVEN, Matthias *et al.* Novel Triazolopyrimidine-Derived Cannabinoid Receptor 2 Agonists as Potential Treatment for Inflammatory Kidney Diseases. **ChemMedChem**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 179–189, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500218>

O'HARE, Ann M. *et al.* Trajectories of kidney function decline in the 2 years before initiation of long-term dialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 513–522, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.11.044>

ORTIZ, Alberto *et al.* Chronic kidney disease is a key risk factor for severe COVID-19: A call to action by the ERA-edta. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 87–94, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NDT/GFAA314>

PANNU, Neesh. Bidirectional relationships between acute kidney injury and chronic kidney disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 351–356, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32835fe5c5>

PARK, Frank. Activators of G protein signaling in the kidney. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 353, n. 2, p. 235–245, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.115.222695>

PARK, Frank *et al.* **Cannabinoids and the kidney: Effects in health and disease**. [S. l.]: American Physiological Society, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00290.2017>

PENG, Chung Kan *et al.* Experimental chronic kidney disease attenuates ischemia-reperfusion injury in an ex vivo rat lung model. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171736>

PERTWEE, R. G. **Pharmacological Actions of Cannabinoids** HEP. [S. l.]: Springer-Verlag, 2005.

RONCO, Claudio; BELLOMO, Rinaldo; KELLUM, John A. Acute kidney injury. **The Lancet**, [S. l.], v. 394, n. 10212, p. 1949–1964, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32563-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32563-2)

SCHEEL, Paul J.; LIU, Manchang; RABB, Hamid. **Uremic lung: New insights into a forgotten condition**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/ki.2008.390>

SINGH, Prabhleen; RIFKIN, Dena E.; BLANTZ, Roland C. Chronic kidney disease: An inherent risk factor for acute kidney injury? **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 1690–1695, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2215/CJN.00830110>

SOETHOUDT, Marjolein *et al.* Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms13958>

SOUZA, Camila Fernandes de. Envolvimento dos receptores canabinoides do tipo 2 (CB2) no processo inflamatório pulmonar associado à pneumosepse. **Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Orientadora: Regina de Sordi.**, [S. l.], v. 2, p. 2013–2015, 2021.

STENVINKEL, Peter *et al.* Inflammation and outcome in end-stage renal failure: Does female gender constitute a survival advantage? **Kidney International**. [S. l.: s. n.].

STOCKELMAN, Michael G. *et al.* Chronic renal failure in a mouse model of human adenine phosphoribosyltransferase deficiency. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, [S. l.], v. 275, n. 1 44-1, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.1.f154>

SU, Guobin *et al.* Short- and long-term outcomes after incident pneumonia in adults with chronic kidney disease: a time-dependent analysis from the Stockholm CREATinine Measurement project. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [S. l.], p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz119>

SUCKOW, Mark A.; DANNEMAN, Peggy; BRAYTON, Cory. **The Laboratory mouse (Laboratory animal pocket reference series)**. [S. l.: s. n.]. *E-book*.

TAM, Joseph. The emerging role of the endocannabinoid system in the pathogenesis and treatment of kidney diseases. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 267–276, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0055>

TRIPEPI, Giovanni; MALLAMACI, Francesca; ZOCCALI, Carmine. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: Searching for the best risk marker by multivariate modeling. *In*: 2005, **Journal of the**

American Society of Nephrology. [S. l.: s. n.] p. S83–S88. Disponível em: <https://doi.org/10.1681/ASN.2004110972>

WANG, Henry E. *et al.* Chronic kidney disease and risk of death from infection. **American Journal of Nephrology**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 330–336, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000330673>

WANG, Xiaoliang *et al.* A mouse 5/6th nephrectomy model that induces experimental uremic cardiomyopathy. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], v. 2017, n. 129, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/55825>

WEBSTER, Angela C. *et al.* Chronic Kidney Disease. **The Lancet**, [S. l.], v. 389, n. 10075, p. 1238–1252, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)

YANG, Hai Chun; ZUO, Yiqin; FOGO, Agnes B. Models of chronic kidney disease. **Drug Discovery Today: Disease Models**, [S. l.], v. 7, n. 1–2, p. 13–19, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2010.08.002>

YOKOZAWA, Takako *et al.* Animal Model of Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. **Nephron**, [S. l.], v. 44, p. 68–70, 1986.

YOUSSEF, Dareen A.; EL-FAYOUMI, Hassan M.; MAHMOUD, Mona F. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 110, n. October 2018, p. 145–154, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.039>

ZOCCALI, Carmine *et al.* **The systemic nature of CKD**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.52>

ZOJA, Carlamaria *et al.* Therapy with a selective cannabinoid receptor type 2 agonist limits albuminuria and renal injury in mice with type 2 diabetic nephropathy. **Nephron**, [S. l.], v. 132, n. 1, p. 59–69, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000442679>

ZORATTI, Cristina *et al.* Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 140, n. 8, p. 1351–1362, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705529>

ANEXOS

ANEXO 1 - Foto macroscópica do rim realizada pelo nosso grupo de pesquisa.

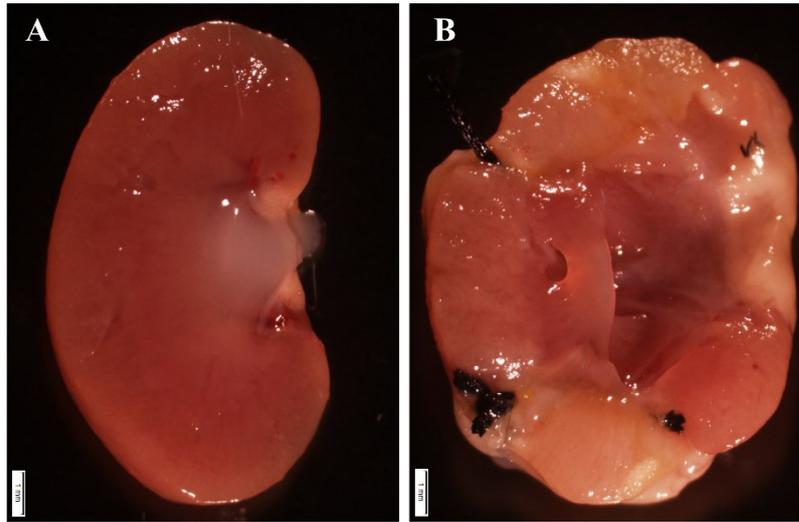
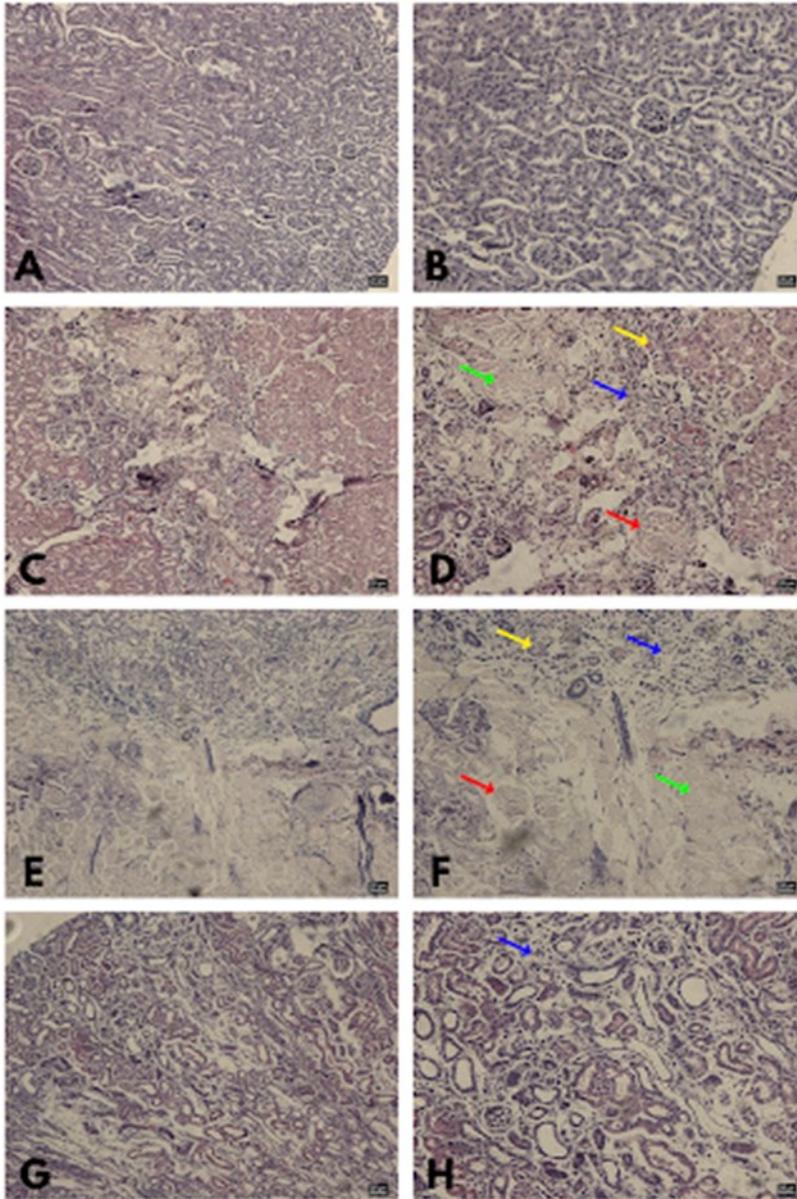


Foto macroscópica do rim coletado 30 dias após a segunda etapa do procedimento de nefrectomia parcial 5/6. (A) rim esquerdo de um animal sham, (B) rim esquerdo de um animal NPx. Autor: Gustavo Ferreira Alves.

ANEXO 2 – Imagem histológica do tecido renal.



Fotografias representativas do tecido renal por microscopia corada com hematoxilina e eosina (HE). (A) Sham (100x); (B) Sham (200x); (C, E e G) PNx (100x) e (D, F e H) PNx (200x). As setas representam: azul: infiltrado leucocitário; amarela: hipertrofia e dilatação tubular; vermelha: glomérulos hialinizados com ausência de capilares sanguíneos, presença de fibras colágenas e praticamente acelulares e verde: tecido fibroso com ausência de túbulos renais.

ANEXO 3 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC)



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Dano pulmonar associado à doença renal crônica: possível participação de receptores CB2", protocolada sob o CEUA nº 4290051019 (ID 001552), sob a responsabilidade de **Regina de Sordi e equipe; Bruna Barcelos de Simas; Camila Fernandes de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 11/03/2020.

We certify that the proposal "Lung injury associated with chronic kidney disease: possible participation of CB2 receptors", utilizing 184 Heterogenics mice (184 males), protocol number CEUA 4290051019 (ID 001552), under the responsibility of **Regina de Sordi and team; Bruna Barcelos de Simas; Camila Fernandes de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 03/11/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2020** a **12/2021**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Blotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **70 a 90 dias**

N: **184**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **40 a 60 g**

Local do experimento: Departamento de Farmacologia, CCB, Bloco D, sala 206 e salas 112 e 113

Florianópolis, 13 de março de 2020

Maurício Laterça Martins
Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina