

NELSON AFONSO LUTAIF

**CONTRIBUIÇÃO RENAL PARA A HOMEOSTASE
CORPORAL EM RATOS:
função da inervação renal**

CAMPINAS

2006

NELSON AFONSO LUTAIF

**CONTRIBUIÇÃO RENAL PARA A HOMEOSTASE
CORPORAL EM RATOS:
função da inervação renal**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas
para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica,
área de concentração em Medicina Experimental.*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTONIO DA ROCHA GONTIJO

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L976c

Lutaif, Nelson Afonso

Contribuição renal para a homeostase corporal em ratos: função da inervação renal / Nelson Afonso Lutaif. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : José Antonio da Rocha Gontijo

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Termogênese. 2. Proteínas desacopladoras. 3. Homeostase. 4. Insuficiência Renal. I. Gontijo, José Antonio da Rocha. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Renal contributions to corporal homeostasis in rats: role of renal innervation

Keywords: • Thermogenesis
• Uncoupling proteins
• Energy transfer
• Renal insufficiency

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora: Prof Dr José Antonio da Rocha Gontijo

Prof Dr Rui Toledo de Barros

Prof Dr Emanuel de Almeida Burdman

Prof Dr Eduardo Melani Rocha

Prof Dr Eduardo Homs

Data da defesa: 22 - 01 - 2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Antonio Rocha Gontijo

Membros:

Professor Doutor Rui Toledo de Barros

Professor Doutor Emanuel de Almeida Burdmann

Professor Doutor Eduardo Melani Rocha

Professor Doutor Eduardo Homs

Professor Doutor José Antonio da Rocha Gontijo

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/01/2007

200747421

DEDICATÓRIA

*A minha esposa Anna Cristina
e minhas filhas Gabriela e Patrícia.*

Ao Dr. Luis Dias de Andrade “in memoriam”

Ao **Prof. Dr. Jose Antonio da Rocha Gontijo** que graças a sua extraordinária capacidade intelectual, pôde assumir os desafios de orientar uma tese, cujos conceitos ainda não haviam sido testados experimentalmente.

Ao Prof. José Francisco Figueredo, Professor Titular da Nefrologia da Unicamp e responsável pela criação do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, onde parte dos experimentos foi realizada.

Ao Prof. Lício Velloso, pelas orientações e pela utilização de seu laboratório para os experimentos associados às técnicas sinalização molecular.

Ao Prof. Anibal Vercesi, Titular da cadeira de Bioquímica da Unicamp, em cujo laboratório de Bioenergética foram realizadas as técnicas de controle respiratório mitocondrial.

A aluna de doutorado Leda Maria Bento, cuja colaboração foi fundamental para a conclusão dos experimentos no Laboratório de Bioenergética.

A Profa. Sumara Zuanazi Pinto Rigato que, pacientemente, ensinou-me as técnicas cirúrgicas para a produção de lesões renais crônicas em animais.

A bióloga Elizatbeth Cristina Cambiucci por sua incansável ajuda nos experimentos com as curvas térmicas

A aluna de mestrado Jenifer Silmara S´Antana por sua valiosa colaboração nas técnicas de Western Blot.

Finalmente, gostaria de agradecer ao laboratorista Luiz Janeri que me ensinou as técnicas de preparação dos géis de poliacrilamida.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxxv</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxix</i>
1- INTRODUÇÃO.....	43
1.1- Termogênese.....	46
1.1.1- Definições.....	46
1.2- Contribuintes para atividade termogênica.....	47
1.3- Controle da atividade mitocondrial.....	51
1.4- Mecanismos envolvidos na termorregulação.....	53
1.4.1- Controle da termogênese.....	53
1.4.2- Agentes da termogênese.....	53
1.4.3- Quantificação do calor transferido.....	54
1.5- Função renal e atividade metabólica.....	56
1.5.1- Modelos de lesão renal.....	56
1.6- Controle neural do rim.....	57
1.6.1- Atividade eferente renal.....	57
1.6.2- Atividade aferente renal.....	58
1.7- Controle térmico e função renal.....	58
1.8- Termogênese renal.....	60
1.8.1- Consumo de oxigênio renal.....	60
1.8.2- Calorimetria indireta renal.....	61
2- OBJETIVOS.....	63
2.1- Objetivo geral.....	65
2.2- Objetivos específicos.....	65

3- METODOLOGIA.....	67
3.1- Animais utilizados.....	69
3.1.1- Grupo nefrectomizado a 5/6 ou Nx5/6 (n = 7).....	69
3.1.2- Grupo denervado ou Dx (n = 5).....	70
3.1.3- Grupo obstruído ou Ox (n = 5).....	70
3.1.4- Grupo simulado ou Sham (n = 5).....	70
3.1.5- Grupo íntegro ou <i>Non operative</i> (n = 5).....	71
3.2- Bloqueio β adrenérgico com propranolol ou Grupo (+).....	71
3.3- Modelo de bloqueio externo de transferência térmica pela imersão em água termoneutra (<i>Water Immersion</i>).....	71
3.4- Desenho experimental.....	72
3.4.1- Curvas térmicas.....	72
3.4.2- Estimativa da taxa de filtração glomerular através da dosagem de creatinina.....	73
3.4.3- Termogênese metabólica.....	74
3.5- Técnica de <i>Westernblot</i>.....	75
3.6- Cálculos estatísticos.....	77
3.6.1- Curvas térmicas.....	77
3.6.2- Equações utilizadas para as predições teóricas.....	77
3.6.3- Equações utilizadas para os cálculos experimentais.....	77
3.6.4- Dosagem de creatinina e variação ponderal.....	78
3.7- Controle respiratório e razão ADP/O.....	78
3.8- Técnica de <i>Westernblot</i>.....	78
4- RESULTADOS.....	79
4.1- Variação ponderal dos grupos experimentais.....	81
4.2- Níveis séricos de creatinina.....	81

4.3- Perfil das curvas térmicas.....	82
4.3.1- Imersão dos animais em meio termoneutro.....	82
4.4- Gráficos dos perfis das curvas térmicas.....	83
4.5- Gráficos dos perfis térmicos analisados estatisticamente.....	87
4.6- Apresentação e análise comparativa entre os valores teóricos calculados e valores experimentais referentes à área sobre a curva, ganho térmico e contribuição térmica na composição da temperatura corporal dos diferentes grupos.....	91
4.7- Consumo de oxigênio pela cadeia respiratória em mitocôndrias do fígado.....	92
4.7.1- Controle respiratório.....	92
4.7.2- Relação ADP/O – Eficiência da cadeia respiratória.....	93
4.8- Gráficos representativos do traçado do polígrafo durante o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias hepáticas.....	94
4.9- Estudo da expressão e atividade de UCP e das proteínas envolvidas na via insulínica pós-receptora em gordura marrom.....	99
4.9.1- Atividade das vias insulínicas.....	99
4.9.2- Atividade da proteína desacopladora Tipo 1 na gordura marrom..	104
5- DISCUSSÃO.....	105
6- CONCLUSÃO.....	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8- APÊNDICES.....	127

ADP/O	Relação que traduz o número de moléculas de ATP formadas a partir de um mol de átomos de oxigênio
AKT	<i>Protein kinaseB</i>
ASR	Atividade simpática renal
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
Dx	Denominação do grupo de animais que foram submetidos à denervação renal bilateral
Dx +	Denominação do grupo de animais que foram submetidos a denervação bilateral e posteriormente tratados com propanolol
ERK1,2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
IRS1	<i>Insuline receptor substrate</i>
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Non-operative ou Íntegros	Denominação do grupo de animais de controle que não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico
Non +	Denominação do grupo de animais que foram apenas tratados com propanolol
Nx	Denominação do grupo de animais que foram submetidos à nefrectomia subtotal ou 5/6
Ox	Denominação do grupo de animais que foram submetidos à obstrução total das vias urinárias

PI3K	<i>Phosphoinositide kinase-3</i>
Sham	Denominação do grupo de animais de controle cirúrgico
Sham +	Denominação do grupo simulado cirurgicamente que foram submetidos a tratamento prévio com propranolol
SMR	<i>Standard metabolic rate</i>
SNC	<i>Sistema nervoso central</i>
TMB	<i>Taxa de metabolismo basal</i>
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
VCI	<i>Volume circulante intravascular</i>

	PÁG.
Tabela 1- Valores representam as médias $\pm$ DP obtido para os diferentes grupos experimentais, durante a imersão dos animais em meio termoneutro.....	82
Tabela 2- Valores das médias $\pm$ DP, obtidas durante a imersão dos animais em meio isotérmico em animais tratados previamente com propanolol.....	83
Tabela 3- Comparação entre os valores calculados e os valores encontrados, tendo como referência para os valores teóricos os animais com características do grupo Íntegro	91

	PÁG.
Figura 1- Representação das principais reações ligadas à manutenção do gradiente quimio-osmótico mitocondrial: oxidação do NADH (a partir das reações ligadas ao ciclo de Krebs), transferência dos prótons H ⁺ para o espaço intermembrana (contra o gradiente eletroquímico), fosforilação oxidativa, <i>proton-leak</i> e a atividade da proteína desacopladora.....	50
Figura 2- Esquema simplificado da regulação da energia através da sinalização de agentes hormonais. Este tipo de controle via hormônios é designado como mecanismos efetores de alça longa	51
Figura 3- Expressão da atividade de IRS1 em gordura marrom de ratos submetidos a diferentes procedimentos.....	100
Figura 4- Expressão da atividade de PI3K em gordura marrom de ratos submetidos a diferentes procedimentos.....	101
Figura 5- Expressão da atividade de AKT1 em gordura marrom de ratos submetidos a diferentes procedimentos.....	102
Figura 6- Expressão da atividade de ERK1 e 2, em gordura marrom de ratos submetidos a diferentes procedimentos.....	103
Figura 7- Expressão da atividade de UCP1 em gordura marrom de ratos submetidos a diferentes procedimentos.....	104

	PÁG.
Gráfico 1- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Nx e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (<i>slope</i>).....	83
Gráfico 2- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Dx e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (<i>slope</i>).....	84
Gráfico 3- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Ox e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (<i>slope</i>).....	84
Gráfico 4- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Íntegro (Non) e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (<i>slope</i>).....	85
Gráfico 5- Representa a curva térmica comparativa entre os grupos Nx + e Simulado +, que foram tratados previamente com propanolol. Também estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (<i>slope</i>).....	85
Gráfico 6- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Dx + e Simulado + , que foram tratados previamente com propanolol. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (<i>slope</i>).....	86
Gráfico 7- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Íntegro (Non) + e Simulado+, que foram tratados previamente com propanolol. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (<i>slope</i>).....	86

Gráfico 8-	Apresenta os resultados como médias + desvio padrão das temperaturas iniciais obtidas nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido.....	87
Gráfico 9-	Representa os resultados como médias + desvio padrão das temperaturas finais obtidas nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido.....	87
Gráfico 10-	Apresenta os resultados como médias + desvio padrão das áreas obtidas nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido.....	88
Gráfico 11-	Representa os resultados como médias + desvio padrão das declividades (<i>slope</i>) obtidas nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido.....	88
Gráfico 12-	Resultados como médias + desvio padrão das temperaturas iniciais obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido.....	89
Gráfico 13-	Resultados como médias + desvio padrão das temperaturas finais obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido. ANOVA: $p < 0,05$ (<i>post hoc</i> : não significativo).....	89

Gráfico 14-	Resultados como médias + desvio padrão das áreas obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido.....	90
Gráfico 15-	Resultados como médias + desvio padrão das declividades obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste <i>pos hoc</i> Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido ANOVA: $p < 0,0001$	90
Gráfico 16-	Resultados do controle respiratório para os diferentes grupos, em estudos realizados com mitocôndrias hepáticas. A análise estatística utilizou ANOVA e $p < 0,05$ foi considerado para estabelecer o nível de significância. ANOVA: $p > 0,05$	93
Gráfico 17-	Resultados do controle respiratório para os diferentes grupos, em estudos realizados com mitocôndrias hepáticas. A análise estatística utilizou ANOVA e $p < 0,05$ foi considerado para estabelecer o nível de significância. ANOVA: $p > 0,05$	94
Gráfico 18-	Representação gráfica da curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Nx.....	95
Gráfico 19-	Representação da curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Dx.....	96
Gráfico 20-	Representação gráfica da curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Ox.....	97
Gráfico 21-	Curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Sham.....	98
Gráfico 22-	Curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Íntegro (Non).....	99

Gráfico 23-	Valores obtidos pela densitometria mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste <i>pos hoc</i> de Bonferroni. ANOVA: $p < 0,05$	100
Gráfico 24-	Valores obtidos pela densitometria não mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA). ANOVA: $p > 0,05$	101
Gráfico 25-	Os valores obtidos pela densitometria mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste <i>pos hoc</i> de Bonferroni. ANOVA: $p < 0,005$	102
Gráfico 26-	Valores obtidos pela densitometria mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste <i>pos hoc</i> de Bonferroni. ANOVA: $p > 0,05$	103
Gráfico 27-	Valores obtidos pela densitometria exibem diferenças significativas entre os grupos, quando estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste <i>pos hoc</i> de Bonferroni.....	104

RESUMO

Lutaif NA. *Contribuição renal para a homeostase térmica corporal em ratos: função da inervação renal* [tese]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP; 2006. 94p.

Introdução: Os rins, em humanos, são responsáveis por 10% de todo o oxigênio consumido, pelo corpo, em 24 horas. Este consumo pode ser representativo de uma grande contribuição da parte renal para a termogênese global dos indivíduos. A termogênese global é constituída pela termogênese facultativa, a qual está associada à ativação da UCP e captação celular de glicose, e a termogênese obrigatória, a qual está relacionada ao consumo de oxigênio mitocondrial. Assim nós assumimos que lesões renais podem levar a alterações na termogênese global e consequentemente distúrbios nas termogênese facultativa e obrigatória. Para investigar a contribuição renal na manutenção da temperatura interna, nós estudamos ratos *Sprague Dowley* com: redução da massa renal (Nx), denervação (Dx) e obstrução urinária (Ox), além de dois grupos controles: SHAM e non-operative (Non). Métodos: O estudo foi realizado colocando os grupos em estudo imersos em água isotérmica (próxima a temperatura interna) para bloquear a dissipação de calor enquanto a temperatura colônica era registrada durante 30 minutos. A termogênese obrigatória foi analisada através do controle respiratório e a relação ADP/O em mitocôndrias hepáticas. As atividades da UCP1 e os sinalizadores relacionados a captação de glicose celular : IRS1, PI3K, AKT1 e ERK1,2, foram analisados pelo método de *Westernblot*. Resultados: O grupo Nx apresentou temperatura inicial significativamente inferior ao grupo Dx: $36,14 \pm 0,8083^{\circ}\text{C}$ x $37,51 \pm 0,9601^{\circ}\text{C}$, ($P < 0,05$). Depois de 30 minutos, o grupo Dx ($40,38 \pm 1,04^{\circ}\text{C}$) apresentou temperaturas finais significativamente mais elevadas em comparação aos grupos: Sham ($39,09 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$), Nx ($36,14 \pm 0,8083^{\circ}\text{C}$) e Ox ($37,22 \pm 0,4338^{\circ}\text{C}$) com $p < 0,05$. O grupo Dx apresentou curvas térmicas com uma maior inclinação (slope) ($0,05836 \pm 0,07683$) em relação aos grupos: Sham ($0,04238 \pm 0,006312$), Non ($0,05182 \pm 0,005546$) e Ox ($0,04516 \pm 0,005107$) com $p < 0,05$. Também, a área sobre a curva em relação ao grupo Nx ($57,05 \pm 17,82$) foi superior aos valores obtidos nos grupos Ox ($35,61 \pm 7,792$), Sham ($41,03 \pm 3,06$) e Non ($39,82 \pm 5,848$) com $p < 0,001$. Nenhuma diferença foi observada entre todos os grupos com relação ao controle respiratório e a relação ADP/O. Os grupos Dx e NX apresentaram aumento das atividades da UCP1 e AKT quando comparados com os demais grupos. Conclusão: Estes resultados sugerem que os

rins podem ter influência na termorregulação, contribuindo com parte do calor necessário para a manutenção da temperatura corporal. Também concluiu-se que as fibras nervosas renais estão implicadas no controle homeostático do calor, trabalhando em associação com os tecidos da gordura marrom.

Descritores: 1.Termogênese 2.Aquecimento passivo 3.Lesão renal 4.Proteínas desacopladoras

ABSTRACT

Lutaif NA. *Renal contribution for thermic corporeal homeostasis in rats: renal innervation function* [thesis]. “Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP; 2006”. 94p.

Introduction: Human kidneys are responsible for 10% of whole oxygen consumed in 24 hours as a result may have a great contribution in human global thermogenesis. Global thermogenesis which is related with mitochondrial oxygen consumption. We assumed that renal injuries necessarily promotes disturbances on global thermogenesis and consequently promote a re-adaptation on facultative and obligatory thermogenesis. To investigate the renal contribution on maintenance of internal temperature, we studied *Sprague Dawley* rats with: (Nx) mass reduction, (Dx) denervation and (Ox) urinary tract obstruction and two controls group: sham and (Non) no-operative. **Methods:** The study was performed after animals' immersions in warm water to avoid temperature dissipation and rectal temperature was recorded. Obligatory thermogenesis was evaluated through mitochondria respiratory chain and ADP/0 ratio in hepatocytes. The UCP1 and pathways associated with glucose captation (IRS1, PI3K, AKT1 and ERK1,2) protein expression in brown adipose tissue was studied by western blot method. **Results:** The Nx group presented significant initial lower temperature than Dx group: $36.14 \pm 0.8083^{\circ}\text{C}$ x $37.15 \pm 0.9601^{\circ}\text{C}$, with $p < 0.05$. After thirty minutes, Dx group presented significant higher temperature (40.38°C) than Sham ($39.09 \pm 0.21^{\circ}\text{C}$), Nx ($36.14 \pm 0.8083^{\circ}\text{C}$) and Ox ($37.22 \pm 0.4338^{\circ}\text{C}$), groups with $p < 0.05$. The Dx group showed significant higher thermal slope curve values (0.05836 ± 0.07683) than Sham (0.04238 ± 0.006312), Non (0.05182 ± 0.05546) and Ox (0.04516 ± 0.005107) with $p < 0.05$. Also, the area under curve presented Nx group with significant higher values (57.05 ± 17.82) than Ox (35.61 ± 7.792), Sham (41.03 ± 3.06) and Non (39.82 ± 5.848) with $p < 0.001$. No statistical difference was observed between all groups when the mitochondrial oxygen consumption and ADP/0 ratio were studied. The Dx and Nx groups showed increase in UCP1 and AKT1 activities. **Conclusions:** These results suggest that kidneys may play important function on body thermoregulation, contributing to thermal generation with own metabolic activities. We also concluded that renal nerves activity plays a role in thermic homeostase control, working associated with central nervous system and brown adipose tissue.

Descriptors: 1.Thermogenesis 2.Passive heating 3.Renal injury 4.Uncoupling proteins

1- INTRODUÇÃO

A possível associação entre a atividade termogênica e a função renal, evidenciada em alguns modelos experimentais, estabeleceu evidências vinculando esta homeostase térmica à atividade neural do rim e ao controle térmico em áreas do sistema nervoso central (SNC). Embora as evidências desta associação estejam descritas de forma esparsa e pouco consistente, é possível identificar na literatura trabalhos estabelecendo uma relação entre a repercussão de lesões renais e a termorregulação. Kluger *et al.* (1987) descreveram que após 48 horas de nefrectomia em coelhos, estes apresentam uma maior termolabilidade, comparativamente aos grupos controles, apresentando níveis mais baixos de temperatura, quando expostos a ambientes frios e mais elevadas ao serem submetidos a ambientes aquecidos.

Mais recentemente, Bigazzi *et al.* (1994a) e Bigazzi *et al.* (1994b) demonstraram que a ablação renal parcial promove um aumento da atividade adrenérgica em gordura marrom e elevação da atividade neural em regiões paraventriculares do hipotálamo, sugerindo uma possível explicação da causa para estados anorexigênicos com redução do peso como decorrentes do aumento da termogênese facultativa e conseqüente diminuição dos estoques corporais de tecido adiposo. Assim, esta ativação do SNC, como conseqüência de uma menor atividade inibitória aferente neural do rim poderia causar uma efetiva ação lipolítica sobre o tecido adiposo marrom.

Na prática clínica, também é comum a observação de que portadores de insuficiência renal crônica em estádios avançados são hipotérmicos em relação aos indivíduos normais (Kluger *et al.*, 1987).

Excetuando as situações patológicas, estudos de neurofisiologia renal revelam grande quantidade de fibras especializadas em condução de estímulos térmicos, cujos estímulos externos são capazes de afetar a filtração glomerular de maneira intensa e significativa. Por outro lado, a estimulação térmica de contato no núcleo supra óptico do hipotálamo, uma área claramente vinculada à termogênese, promove uma redução da filtração glomerular, tanto maior quanto mais intenso for o estímulo (Kenney *et al.*, 2000; Masset *et al.*, 2000; Kenney *et al.*, 2001; Sadowski *et al.*, 1997). Esta vinculação recíproca entre áreas do sistema nervoso central e o rim permite evidenciar que mecanismos renais

apresentam uma participação em conjunto com todo organismo, que participam da modulação da temperatura interna corporal.

No presente estudo, para comprovar a participação dos rins sobre esta termorregulação, foi idealizado um modelo de aquecimento passivo combinado ao registro da temperatura retal e foram empregadas técnicas de estudo molecular com o propósito de detectar variações na taxa de produção de calor e na velocidade da resposta térmica em animais portadores de lesão renal aguda e crônica, avaliando a participação da inervação renal sobre esta resposta.

Nas seções a seguir, serão descritos alguns aspectos sobre o controle térmico corporal e os mecanismos pelos quais podem ocorrer interações entre o rim e o SNC.

1.1- Termogênese

1.1.1- Definições

O termo termogênese refere-se a uma concepção genérica para os seres vivos e em particular para os mamíferos, em que os processos físico-químicos geram compostos ricos em energia química que em parte são utilizados no desempenho de atividades celulares diárias e, como parte do processo de geração e consumo desta energia ocorre a produção de calor passível de ser transferida para o meio ambiente. Ricquier e Bouillaud (2000) definem a termogênese como ...

“todos os processos patofisiológicos que possam provocar variações na temperatura dos organismos ... também é uma característica própria das células endotérmicas que explica sua manutenção espontânea a uma determinada temperatura”.

Na década de noventa, a literatura médica consagrou duas subdivisões para o termo termogênese, sendo uma obrigatória e outra facultativa (Erlanson-Albertsson, 2003; Cannon e Nedegaard, 2004).

A definição de termogênese obrigatória, aqui utilizada, refere-se àquela associada a taxa de metabolismo basal ou “*standard metabolic rate*” (TMB) (Erlanson-Albertsson, 2003).

Em determinado contexto, pode-se interpretar como tendo também o mesmo significado as definições de *termogênese metabólica* ou *termogênese celular*. A termogênese facultativa é subdividida naquela gerada pelo aumento da atividade muscular esquelética (“*shivering*”) e aquela não relacionada a esta atividade (“*non-shivering*”).

A termogênese conhecida como “*shivering*” ou induzida pelo frio, é originada nos músculos esqueléticos sem que estes estejam associados a nenhum trabalho específico que não o de gerar calor, embora ainda não tenha sido identificado o mecanismo exato de como ocorre este fenômeno mas, possivelmente, este esteja relacionado à hidrólise de ATP utilizado na regulação do conteúdo de cálcio no retículo sarcoplasmático e o influxo deste íon para o sarcoplasma culminando com o processo de contração das miofibrilas (Cannon e Nedegaard, 2004; Meis, 2000).

“*Non-shivering*” ou termogênese induzida pela ingestão dietética está associada à produção de calor gerada pela síntese e atividades de proteínas chamadas desacopladoras da cadeia aspiratória, notadamente a proteína desacopladora tipo 1 (UCP1), localizada na gordura marrom ou B.A.T (Cannon e Nedegaard, 2004).

1.2- Contribuintes para atividade termogênica

A TMB inclui todas as reações químicas necessárias à manutenção da vida (Havenit, 2001). O valor desta taxa é expresso em calorias/hora e obedece a uma relação alométrica com a massa do organismo e pouco varia exceto em situações patológicas (Singer, 2001; Even *et al.*, 2001). Cerca de 90% dessas reações envolvem o consumo do átomo de oxigênio e, deste consumo, aproximadamente 67% ocorrem no interior das mitocôndrias.

Contribuindo para a termogênese obrigatória, 75%-90% do calor gerado pelas reações envolvidas na TMB acontecem durante a manutenção do gradiente eletroquímico entre a membrana interna da mitocôndria e a matriz mitocondrial (Hagen, 1976; Brown, 1994; Brown e Rolfe, 1997; Hulbert e Else, 2000).

Este gradiente é gerado principalmente por meio de reações oriundas da cadeia respiratória.

Na cadeia respiratória, a fosforilação oxidativa é o estágio final do metabolismo aeróbico, responsável por 45% do total de calor produzido na célula (Brand, 1990). A geração de ATP da fosforilação oxidativa inicia-se após a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos ocorrendo a redução em cadeia das coenzimas FADH e NADH pela ação da NAD e FAD desidrogenase e em seguida a transferência de elétrons na membrana interna da mitocôndria através dos citocromos (complexos I e II respectivamente) e, originando uma série de reações de oxidação e redução conhecida como cadeia transportadora de elétrons, durante a qual ocorre a transferência de elétrons retirados do NADH e FADH em direção à reação final com o oxigênio $[NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 = NAD^+ + H_2O]$, gerando água e CO₂.

Segundo a teoria químio-osmótica, a passagem de elétrons através dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória provoca um fluxo de H⁺ da membrana interna mitocondrial para o seu espaço intermembranas, criando um potencial elétrico ($\Delta\Psi$) positivo neste espaço. A intensidade deste gradiente eletroquímico é, então, a força eletromotriz responsável pela formação de ATP utilizando do influxo de H⁺ à matriz mitocondrial, tendo o potencial eletroquímico destes prótons como força motriz através dos canais F₀F₁-ATP sintetase (Figura 1).

O NADH tem origem no ciclo do ácido cítrico, tendo como um dos componentes a molécula de succinato utilizada como substrato nos experimentos semelhantes ao presente estudo, que envolvem a medição do controle respiratório mitocondrial (Harris, 1991; Brown, 1994; Cairns, 1998; Boss, 2000).

Além do retorno dos prótons via ATP-sintetase, duas outras vias conhecidas podem ser utilizadas para reduzir o potencial eletroquímico transmembrana e também gerar calor, o vazamento (*leak*) de prótons e a incorporação à membrana interna mitocondrial das proteínas desacopladoras.

Os mecanismos pelos quais ocorre o vazamento de prótons são ainda desconhecidos.

Há muito se sabe que a mitocôndria pode consumir oxigênio sem formar ATP. Esta evidência conhecida como desacoplamento mitocondrial em virtude do retorno dos prótons (H^+) para a matriz mitocondrial através da propulsão gerado pelo gradiente químiomsmótico transmembranas, através das vias que utilizam o canal ATP-sintetase. Esse influxo guarda uma relação estreita com a taxa de metabolismo basal e com a composição estrutural de suas membranas mitocondriais.

Quanto maior a presença de fosfolípidos poliinsaturados e menor de monoinsaturados nas membranas, maior será o “vazamento de prótons” (Hagen, 1976; Brand, 1990; Brown e Rolfe, 1997; Hulbert e Else, 2000).

Uma outra via de retorno dos prótons é aquela que ocorre através da incorporação da proteína desacopladora à membrana mitocondrial interna sendo esta a principal contribuinte para a termogênese “*non shivering*” ou metabólica (Hampl *et al.*, 2006). As proteínas desacopladoras foram identificadas em 1976 e purificadas em 1982. Seu peso molecular é de cerca de 30.000 daltons e contém 300 aminoácidos seqüenciados.

A primeira proteína desacopladora identificada foi chamada de UCP1 e é encontrada mais abundantemente incorporada na região da membrana interna das mitocôndrias do tecido adiposo marrom (Figura 1).

A ativação da síntese de UCP1 dá-se através de adrenoreceptores que ativam o segundo mensageiro denominado AMP cíclico. Segue-se à ativação da proteína quinase A (PKA) que finalmente aumenta a disponibilidade celular de ácidos graxos livres para serem oxidados como de substrato à cadeia respiratória. Esta resposta, por exemplo, pode ser

detectada após cerca de quatro horas de exposição ao frio. Enquanto a função da UCP1 encontra-se bem definida quanto a sua função termogênica de resposta rápida através de um aumento na ineficiência da cadeia respiratória, suas homólogas, as UCP2 e UCP3, estão relacionadas à termogênese dita adaptativa, em resposta ao frio e a excessiva ingestão de alimentos (Feil, 1994; Boss, 2000; Ricquier e Bouillaud, 2000; Erlanson-Albertsson, 2003; Cannon e Nedegaard, 2005).

A termogênese facultativa tornou-se objeto de intenso estudo após ter sua ação envolvida no balanço energético.

Figura 1- Representação das principais reações ligadas à manutenção do gradiente químico-osmótico mitocondrial: oxidação do NADH (a partir das reações ligadas ao ciclo de krebs), transferência dos prótons H^+ para o espaço inter-membrana (contra o gradiente eletro-químico), fosforilação oxidativa, *proton-leak* e a atividade da proteína desacopladora

1.3- Controle da atividade mitocondrial

Desde 1967, vêm-se acumulando dados experimentais relacionando diversos agentes e mecanismos como possíveis reguladores envolvidos no controle do “estoque de energia interna” tais como: glicemia, tecido adiposo e geração térmica (Hervey, 1967).

Atualmente é aceito que este controle seja coordenado pelo sistema nervoso central ao qual convergem, principalmente para os núcleos do hipotálamo (núcleos hipotalâmicos lateral e paraventricular), informações sobre o estoque energético corporal.

Têm sido identificadas como moléculas sinalizadoras destas informações, a aferência neural a estas regiões do SNC, bem como hormônios entre os quais insulina, leptina e glicocorticóides (Rothwell e Stock, 1998; Sahu, 2004).

Estes sinalizadores agem no hipotálamo no núcleo ventromedial e lateral, sedes do controle da saciedade, anorexia e do controle térmico, respectivamente. Estes agentes modulam uma complexa rede neural que utiliza aminas, especificamente catecolaminas, e outros neuropeptídeos (CART, POMC e NPY) como mensageiros interneurais entre estes centros nervosos (Figura 2) (Porte *et al.*, 1998).

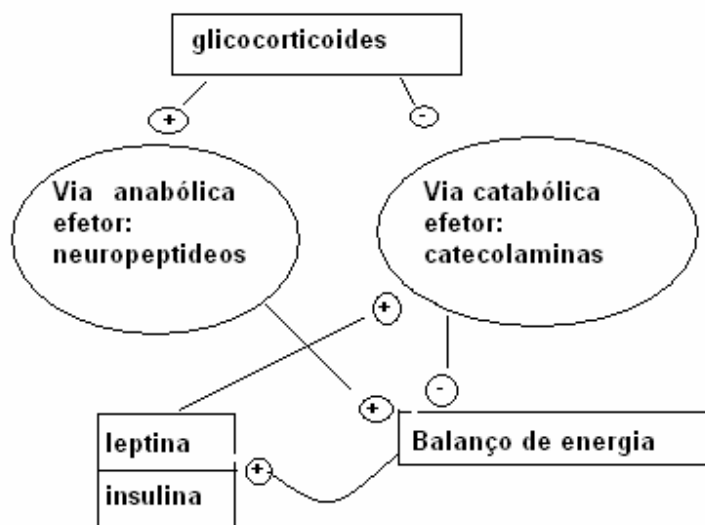


Figura 2- Esquema simplificado da regulação da energia através da sinalização de agentes hormonais. Este tipo de controle via hormônios é designado como mecanismos efetores de alça longa (Spiegelman e Flieri, 2001)

Em roedores, a insulina e a leptina são hormônios ditos anorexigênicos e termogênicos que, quando elevam seus níveis plasmáticos, provocam a perda de peso e aumento na ineficiência nas reações ligadas à formação de ATPs e conseqüentemente reduzem a quantidade de energia acumulada sob a forma de tecido adiposo. Esta resposta ocorre, principalmente, via núcleos hipotalâmicos pela ativação adrenérgica dos receptores β_3 -adrenérgicos presentes na gordura marrom (Shibatta *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 2002; Dobins *et al.*, 2003; Sahu, 2004).

Embora a principal fonte energética seja a lipólise de ácidos graxos livres no citoplasma, observa-se um aumento na captação de glicose pelas células do tecido adiposo marrom, porém não existem experimentos que confirmem a ativação conjunta e simultânea destas vias ligadas à insulina (Cannon e Nedegaard, 2004). Neste sentido, Gasparetti *et al.* (2003) investigando este fenômeno, identificaram a redução da expressão de receptores de insulina (IR1) na gordura marrom de animais durante a exposição ao frio, confirmando os achados prévios de Fasshauer *et al.* (2000), que sugeriam que durante a hiperinsulinemia pode ocorrer a inibição da ativação de UCP1, contrariamente ao seu efeito no sistema nervoso central. De maneira inversa, ratos geneticamente modificados com “*knock-out*” dos receptores insulínicos apresentaram uma maior expressão nas atividades da UCP1. Também foi observado nesta situação que quando a atividade adrenérgica está aumentada, verifica-se uma diminuição da atividade da via fosfatidil inositol 3 fosfato quinase (PI3K), reforçando a separação entre a ativação das vias adrenérgicas e insulínicas (Guerra *et al.*, 2001).

Contraditoriamente, Chernogubova *et al.* (2004) identificaram a ativação da PI3K via receptores β_3 -AMPc-Protein kinase A (PKA) associada à ativação da UCP1 durante exposição ao frio.

Finalmente, em extenso artigo de revisão, Cannon e Nedegaard (2004) descrevem que a ativação de substratos de receptores insulínicos tipo 1 (IRS1) promove a ativação da via glicolítica através da proteína tirosina quinase B (AKT) que por sua vez eleva a expressão e incorporação à membrana celular de GLUT4 (transportadores de glicose na membrana), elevando a captação celular deste carboidrato. Parte deste monossacarídico é oxidado via ciclo do ácido tricarboxílico nas mitocôndrias e parte é transformado em triglicérides e armazenada no citoplasma de adipócitos da gordura marrom.

1.4- Mecanismos envolvidos na termorregulação

1.4.1- Controle da termogênese

O controle térmico corporal é realizado principalmente por um neurosensor (termostato) localizado na área pré-óptica do hipotálamo anterior. Vários outros termostatos são localizados em outras áreas do SNC e podem assumir este comando, inclusive aqueles localizados na medula espinhal, porém em termos de resposta ou mecanismos de ação para ajustar a temperatura interna, a região pré-óptica é a mais especializada (Satinnof, 1978).

A homeostase térmica, não obstante ser monitorizada pelo centro termorregulador, é resultante das inter-relações entre produção e eliminação de calor (Peristein, 1995).

Em estudos utilizando capsaicina, substância que diminui a atividade neural por degranulação de neuromediadores, detectou-se a ativação simultânea da perda e da produção de calor. (Kobaiashi, 1998)

Também os “*set points*” no hipotálamo para a ativação de respostas tais como *shivering*, sudorese ou tônus vasomotor são diferentes, assumindo a possibilidade de que o controle térmico não seja modulado apenas pelo “*set point*” da temperatura corporal, mas sim, como consequência de um equilíbrio dinâmico alcançado pela ação de múltiplas respostas termorregulatórias. Reforçando esta hipótese, Webb (1995) por intermédio de estudos utilizando calorimetria direta observou que a perda de calor é um parâmetro fisiológico independente e que este processo está comprometido, principalmente, com o balanço energético e não apenas com a temperatura corporal. Acompanhando a eliminação de calor por 24 hs, constatou-se que a perda é mais acentuada à noite e que durante todo o dia o organismo apresenta um balanço positivo de estoque de energia térmica (Webb, 1995).

1.4.2- Agentes da termogênese

A eliminação de calor para o meio externo é regulada, principalmente, pela atividade vasomotora atuando na modulação entre o fluxo sanguíneo cutâneo ou periférico e o fluxo sanguíneo esplâncnico ou visceral. Graças a menor resistência induzida aos vasos

periféricos, o fluxo e conseqüentemente o volume circulante periférico, poderá elevar-se em até cinco vezes o normal, favorecendo a taxa de transferência de calor para o meio externo (Charkoudian, 2003; Minson, 2003).

Neste processo, o fenômeno físico mais importante é a radiação, ou seja, emissão de ondas de um espectro conhecido como radiação térmica, que contribui com 60% do total de calor emitido. A convecção, a evaporação e em menor quantidade as trocas de calor através da respiração são os demais processos físicos envolvidos na homeostase térmica corporal.

Em situações de intensa exposição a elevadas temperaturas externas, a evaporação nos mamíferos, torna-se o mecanismo mais eficiente para a transferência de calor (Yong e Sladen, 1994).

1.4.3- Quantificação do calor transferido

As medidas para a quantificação do calor gerado são aferidas através dos métodos de calorimetria direta e indireta.

A calorimetria direta detecta diretamente as mudanças de temperatura nas vizinhanças do objeto a ser estudado através de sensores ou em gaiolas metabólicas denominadas Atwair-Rose. Estas se constituem de gaiolas resfriadas com água corrente, sendo observadas e registradas as diferenças entre as temperaturas de entrada e saída deste conteúdo líquido.

A calorimetria indireta, por outro lado, relaciona o calor produzido com o consumo de oxigênio e associado ao conteúdo de dióxido de carbono gerado e eliminado. Assim, para cada 1mol de glicose oxidada utilizando 6mol de oxigênio, a reação final irá produzir cerca de 2.817 kJ de energia térmica (Wrigglesworth, 1994).

Seagrave (1973) utilizando uma modificação dos métodos de calorimetria direta descreveu um modelo de aquecimento passivo através de imersão em água. Este autor observou que mergulhando o indivíduo em água a uma temperatura semelhante à

temperatura interna (termoneutralidade), seria possível obter um isolamento térmico que permitiria acumular toda sua produção corporal de calor.

Para parâmetros fisiológicos definidos durante o jejum e em repouso e aplicando a primeira lei da termodinâmica pode-se definir que:

$$\Delta U (\text{energia interna}) = \text{Calor} - \text{Trabalho}$$

Desta forma, no modelo do autor, o calor liberado para o sistema é zero em razão da ausência de diferença de temperatura entre o conteúdo (meio termoneutro) e o contingente (corpo). Estando o animal em repouso, o trabalho realizado será igual a zero.

Assim a expressão final pode ser apresentada como:

$$\Delta U = 0, \text{ ou Energia (final) - Energia (inicial) = 0}$$

Tendo em vista que a energia potencial química gerada durante o anabolismo é a correspondente (metabolismo) à energia inicial e à transformação desta energia química em térmica como correspondente à energia final, pode-se deduzir que:

$$\text{Taxa do Metabolismo Basal} = \text{Variação da Energia Térmica}$$

ou seja a

$$\text{TMB (obtida por métodos calorimétricos)} = dT/dt \times \text{massa} \times \text{cap. calorif}$$

De tal forma que dT/dt seja a expressão matemática da variação instantânea da temperatura ao longo do tempo e expressa em Celsius por Hora ($^{\circ}\text{C/h}$)

Substituindo por valores experimentais, pode-se afirmar que:

$$dT/dt = 70(\text{cal/h}) / 70(\text{Kg}) \times 0,86(\text{Kcal} / \text{Kg } ^{\circ}\text{C}) = 1,15^{\circ}\text{C}$$

ou seja, adição de cerca de um grau por hora na temperatura interna corporal, para um indivíduo de 70 quilos imerso em água à temperatura de $36,6^{\circ}\text{C}$.

O aspecto mais interessante neste modelo é o fato de que o aquecimento passivo se faz de maneira gradual e proporcional à taxa de atividade metabólica, e esta não é influenciada pelas respostas fisiológicas de eliminação de calor (Apêndice 1). Estudos similares utilizando o modelo teórico proposto por este autor não foram ainda aplicados a desenhos experimentais para avaliação sistemática aplicada a situações patológicas relacionadas à termogênese.

1.5- Função renal e atividade metabólica

1.5.1- Modelos de lesão renal

A função renal efetiva guarda uma relação direta com a taxa de metabolismo basal e, por conseguinte, com a termogênese metabólica ou obrigatória. Estudos aplicando análises logarítmicas relacionando a massa corporal, a taxa de metabolismo basal e a filtração glomerular, demonstram que, proporcionalmente, quanto maior a massa menor a TMB e a taxa de filtração glomerular.

Para mamíferos esta expressão pode ser redigida como $TMB = 70 \times \text{peso}^{0,73}$, em que 70 é a constante de proporcionalidade para o gênero. Desta forma, esta correspondência se traduz também na taxa de filtração glomerular: Quanto maior a massa renal relativa ao peso corporal, menor a taxa de filtração glomerular. Assim os ratos têm, proporcionalmente, uma taxa de filtração glomerular maior que os humanos e estes maiores ainda que em elefantes (Singer, 2001).

A perda progressiva e crônica da função renal leva a um declínio da TMB, tanto mais intenso quanto maior for este acometimento. Este declínio está associado em parte com a menor ingestão protéica que geralmente ocorre nas síndromes urêmicas (Panesar e Agarwal, 2003).

Experimentalmente é possível reproduzir vários modelos de lesões renais crônicas ou agudas. Para as lesões crônicas tem sido utilizado o modelo de ablação ou nefrectomia a 5/6, que se fundamenta no desenvolvimento progressivo de esclerose

glomerular, proteinúria e redução da taxa de filtração glomerular resultante do processo de hiperfiltração a que são submetidos os néfrons residuais. Este processo já pode ser detectado com cerca de duas semanas do procedimento cirúrgico (Olson, 1982; Kim, 2003).

Como já descrito anteriormente, além de insuficiência renal este modelo produz uma ativação da termogênese facultativa (*non-shivering*) relacionando possivelmente a queda da função renal com o balanço de energia.

Quanto aos modelos, a insuficiência renal aguda tais como obstrução das vias excretoras urinárias, estes apresentam alterações estruturais e funcionais do néfron após aproximadamente 2 horas de obstrução, acompanhados pelo aumento da expressão renal de citosinas pró-inflamatórias tais como, fator de necrose tumoral e fator nuclear kappa beta, como resultado principal do delicado desequilíbrio de forças pressóricas intra e extra glomerulares a que estão submetidas as unidades funcionais do rim (Lutaif, 2003).

1.6- Controle neural do rim

1.6.1- Atividade eferente renal

Em relação à inervação eferente renal, oriunda do plexo renal que emerge entre as vértebras T10 e L3, esta é basicamente constituída de fibras simpáticas cuja finalidade é a regulação do controle hidrossalino, vasomotricidade e secreção de renina.

Dependendo da intensidade e duração da atividade neural, a estimulação eferente renal responde progressivamente e nesta ordem com elevação na produção de renina, reabsorção tubular de sódio e vasoconstrição das arteríolas renais (Dibona, 2000).

Em experimentos nos quais houve a denervação renal bilateral observou-se que este procedimento atenuou a manifestação da hipertensão em ratos geneticamente hipertensos e os níveis pressóricos em modelos de hipertensão induzida pela inibição da síntese do óxido nítrico pelo L-NAME (Huang et al., 1998; Xavier et al., 2000), demonstrando a importância da atividade simpática neural em mecanismos fisiopatológicos da gênese ou manutenção da hipertensão arterial.

A atividade simpática renal (ASR) é modificada por dois principais estímulos, o térmico e o pressórico. Estímulos térmicos cutâneos de curta duração produzem nos animais uma resposta reflexa com elevação ASR, tendo seu pico de intensidade após 2 minutos e declinando progressivamente em seguida (Dibona, 2000). Este fenômeno repete-se mesmo após secção da espinha dorsal ao nível da primeira vértebra cervical (rizotomia) revelando nesta situação a possibilidade da presença de um arco reflexo entre a medula e o plexo renal ou um controle térmico renal independente (Kenney, 2000).

1.6.2- Atividade aferente renal

A maioria dos neurônios sensoriais renais está distribuída na região medular intersticial e na parede pélvica (Liu e Barajas, 1993). Gontijo e Kopp (1994) e Gontijo e Kopp (1999) comprovaram em trabalhos experimentais a influência de vias neurais aferentes renais sobre a modulação da atividade simpática renal e, por conseguinte sobre o controle hidrossalino, através da estimulação tanto mecânica como química de receptores localizados nas paredes pélvicas renais. Um aumento na pressão hidrostática da região intrapélvica promove uma redução da atividade simpática renal contra e ipsi lateral associada a uma significativa natriurese. Da mesma forma, a estimulação de quimiorreceptores pela isquemia e pela perfusão com concentrações crescentes de NaCl, KCL ou “*calcitonin gene-related peptide receptors*” (CGPR), produz a elevação de atividade aferente renal resposta semelhante aquela observada após a estimulação dos mecanorreceptores. Estes efeitos são atenuados após tratamento com capsaicina ou denervação do rim ipsi lateral.

1.7- Controle térmico e função renal

Durante a exposição aguda ao calor, para que não haja uma elevação importante da temperatura corporal interna, o sistema nervoso autonômico modula uma série de ajustes termossensores e cardiovasculares que modificam a temperatura corporal para que se mantenha um adequado funcionamento celular e seja evitada a desnaturação de proteínas e

peptídeos. Estes ajustes se relacionam, principalmente, a elevação da resistência vascular visceral associada simultaneamente a uma diminuição da resistência vascular na circulação cutânea. Estes ajustes identificados promovem queda na pressão arterial, associada a um aumento no débito cardíaco e na frequência cardíaca (Rowell *et al.*, 1970; Masset *et al.*, 2000; Kenney *et al.*, 2001).

Quando a exposição ao calor restringe-se apenas à loja renal retroperitoneal (*back heating*) o efeito é diverso ao da exposição térmica aguda descrita anteriormente, observando-se um aumento na filtração glomerular da diurese e, em animais nefróticos, uma elevação da proteinúria. Esta situação foi significativamente atenuada após a denervação renal bilateral sugerindo a possibilidade da existência de um controle térmico modulado por receptores renais nesta situação (Tsai e Chain, 1993; Chen *et al.*, 1994; Maw *et al.*, 1998).

A resposta renal diante do estímulo térmico está também relacionada ou integrada ao controle do volume circulante intravascular (VCI), através da interação entre os plexos cardíaco e renal, cujas fibras são originadas no núcleo do trato solitário. Uma diminuição no VCI, detectada pelo barorreceptores aórticos ou carotídeos, promove um aumento na atividade simpática renal (ASR) produzindo retenção tubular de sódio e água. Por outro lado, a desidratação causada pela transpiração acentuada induzida pelo calor produz hipovolemia e vasodilatação, com transferência de volume do intra para o extracelular e a manutenção do VCI para auxiliar na transferência de calor através da evaporação. Contrariamente, na desidratação induzida pela não ingestão líquida sem modificações térmicas ambientais ocorre redução do volume intravascular com acentuada ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, porém sem alteração do volume intracelular em virtude do risco menor de hipertermia. Estudos com remoção dos barorreceptores têm produzido animais com uma intolerância maior ao calor, devido a impossibilidade moduladora neural de atuar sobre o sistema cardiovascular durante a hipertermia (Barney *et al.*, 1999; Hope *et al.*, 2001; Kenney *et al.*, 2001).

1.8- Termogênese renal

1.8.1- Consumo de oxigênio renal

O estudo do consumo de oxigênio renal em humanos foi realizado por Brundin em 1983 quando observou que, em condições basais, a utilização de oxigênio pelos rins atingiu valores próximos de 23 ± 2 ml/min, o que correspondeu a $9 \pm 1\%$ do total corporal de oxigênio consumido pelo indivíduo estudado no mesmo período. A diferença entre as concentrações de oxigênio arteriovenosa no rim foi de 15 ± 1 ml/L, pequena, quando comparada aos tecidos extra-renais, tais como o coração, cujos valores foram de $54 \pm$ ml/L, explicável pelo intenso fluxo de sangue renal a cada débito cardíaco durante as 24 horas (Brundin e Wahren, 1994). Em situações de insuficiência renal crônica moderada, a taxa de extração renal de oxigênio é reduzida em comparação aos indivíduos normais (Kurnik *et al.*, 1992).

O consumo renal de oxigênio está relacionado, preponderantemente, à habilidade renal de concentrar a urina e conseqüentemente ao transporte transepitelial de sódio (Singer, 2001). Uma vez reduzida a filtração glomerular e conseqüentemente o aporte de sódio aos seguimentos tubulares ocorre uma redução dramática do consumo renal de oxigênio. Este transporte de sódio está vinculado em grande parte à atividade de Na/K ATPase, e portanto, à hidrólise de ATP. Esta hidrólise produz trabalho (transferir íons contra um gradiente eletroquímico) e também calor em proporções a quantidade de bombas de Na/K ATPase ativadas ao número de mitocôndrias presentes nas células tubulares. Esta especial capacidade termogênica renal permite supor que este órgão apresente mecanismos e condições que o caracterizem como órgão produtor térmico. Por outro lado, o elevado fluxo sanguíneo associado ao fluxo do filtrado intratubular podem relacionar os rins a um intrincado e complexo sistema de refrigeração, responsável pelo “resfriamento” de todo o sistema néfrico com redução da transferência do calor gerado para todo o organismo.

A existência de um sistema neural sensor (aferente) renal permite especular que o rim também esteja envolvido na modulação de sensibilidade térmica através de um eixo rim-SNC.

1.8.2- Calorimetria indireta renal

Como referido anteriormente, pelo método de calorimetria indireta que relaciona consumo de oxigênio e geração de calor durante o metabolismo basal, observou-se que o rim pode gerar uma taxa calculada correspondente a $8,5 \pm 0,6$ W de energia calorífica, sendo esta proporcional a $10,2 \pm 0,6\%$ de todo calor total produzido pelos indivíduos.

A média da diferença entre a artéria renal e a veia renal oscilou em cerca de um décimo de °C (Brundin e Wahren, 1994).

Quanto à eficiência do gasto energético, em um dos primeiros estudos publicados sobre o custo do trabalho renal foi quantificado o incremento no consumo de oxigênio em repouso, após uma sobrecarga de produtos nitrogenados, obtendo uma relação de 70 calorias por mililitro de urina excretada com uma eficiência extremamente baixa (1 a 2 %) por mol/ de oxigênio (Borsook e Winegarden, 1931).

Alguns mecanismos adaptativos metabólicos têm sido observados, assim, em animais aclimatados ao calor observa-se uma adaptação da cadeia respiratória destes animais com uma diminuição do consumo de oxigênio em 15%, assim como em 47% da enzima glicose-6-fosfatase componente da via glicolítica (transformação da glicose em piruvato) (Inbar, 1975).

Em síntese, pode-se sugerir por meio dos raros estudos existentes, que a atividade termogênica renal está intrinsecamente relacionada ao consumo de oxigênio pela atividade mitocondrial. Dessa forma, em razão do elevado consumo renal de oxigênio, o rim pode ser considerado como um órgão relevante na geração de calor. Injúrias renais podem modificar esta homeostase e envolver um amplo espectro de sistemas e vias metabólicas na tentativa de se estabelecer um novo balanço de energia, através da ativação dos núcleos do hipotálamo e da gordura marrom.

Estas alterações podem refletir na eficiência da cadeia respiratória e na geração de compostos ricos em fosfatos (ATP).

Quanto o rim está envolvido neste sistema homeostático, não é possível afirmar ainda.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Tendo em conta os escassos conhecimentos a respeito, o presente estudo pretende avaliar o quanto da redução da massa e conseqüentemente o comprometimento da função renal pode interferir na produção de calor corporal e se a íntima relação neural entre o rim e o sistema nervoso central pode estar envolvida na ativação de mecanismos compensatórios, notadamente os relacionados à eficiência da cadeia respiratória, tanto no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, quanto pelo desacoplamento da síntese de ATP, provocado pelas atividades da UCP e pelo metabolismo de glicose na gordura marrom.

2.2- Objetivos específicos

Identificar as possíveis alterações na taxa de geração de calor em animais submetidos à denervação renal, nefrectomia a 5/6 e obstrução das vias urinárias, por meio da realização de curvas térmicas em um modelo de aquecimento passivo.

Identificar na gordura marrom os níveis de atividade da UCP1 e possíveis alterações nas vias energéticas relacionadas às vias pós receptores associadas à ação insulínica, como decorrência das lesões renais provocadas, por meio da técnica de *immunoblotting*.

Identificar possíveis modificações do controle respiratório em mitocôndrias hepáticas que possam estar relacionadas às lesões renais, e cujas reações estejam fortemente associadas à termogênese, denominada metabólica.

Estabelecer a possível implicação renal na regulação térmica, através da produção de calor e do controle neurosensorial térmico localizado nestes órgãos.

3- METODOLOGIA

3.1- Animais utilizados

Foram utilizados para os experimentos ratos *Sprague Dawley*, com idade entre cinco e seis semanas e pesando entre 180 e 230 gramas e provenientes do Biotério da Universidade de Campinas (CEMIB). Os ratos foram alojados em contêineres com temperatura e iluminação controlados, e sem restrição quanto à ração oferecida (Nuvital, Curitiba, PR) e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos seguindo as mesmas normas para experimentação animal definidos pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Unicamp.

Os experimentos foram subdivididos em três partes: estabelecimento das curvas térmicas, para a determinação dos perfis térmicos e a influência da disfunção renal sobre a geração de calor; *immunoblotting* para a investigação da termogênese facultativa *non-shivering* em tecido adiposo marrom e controle respiratório em tecido hepático, para a investigação da termogênese obrigatória. Nos três procedimentos experimentais foram empreendidos diferentes tipos de injúria renal produzidas cirurgicamente, cujos passos serão descritos a seguir.

3.1.1- Grupo nefrectomizado a 5/6 ou Nx5/6 (n = 7)

Os animais deste grupo foram inicialmente anestesiados com cloridrato de S(+)Ketamina na dose 75 mg/Kg (Cristalia, Itapira, SP) + xilastatina na dose 10 mg/Kg (Bayer, São Paulo, SP) + sulfato de atropina na dose de 0,1 ml/100mg (Hipolabor, Sabará, MG) dados intraperitonealmente (i.p.), e após o estabelecimento de um plano anestésico adequado (ausência de reflexo córneo-palpebral), procedeu-se a uma incisão lateral à esquerda, expondo o rim esquerdo para retirada cuidadosa da cápsula renal (preservação da supra-renal). A ablação renal foi realizada utilizando um bisturi elétrico para a excisão dos dois pólos renais e depois se retornou o órgão para a cavidade retroperitoneal. Após descapsulação renal, o rim à direita foi nefrectomizado totalmente 24 horas após a ressecção dos pólos renais. Posteriormente os animais foram alojados em gaiolas

individuais por sete dias, desde a primeira intervenção até a realização dos diferentes procedimentos experimentais. Prévio aos experimentos foi observado jejum de seis horas somente para ração sólida, permitindo livre acesso à água.

3.1.2- Grupo denervado ou Dx (n = 5)

Após a anestesia via i.p. com cloridrato de S(+) Ketamina na dose 75 mg/Kg (Cristalia, Itapira, SP) + xilastatina na dose 10 mg/Kg (Bayer, São Paulo, SP) + sulfato de atropina na dose de 0,1 ml/100mg (Hipolabor, Sabará, MG); os animais foram submetidos a uma incisão dorsal ampla (T10 a S1) . Com ajuda de um estereomicroscópio Nikon utilizando-se uma ocular de 2,5x e objetiva com ampliação de 20x, promoveu-se a retirada das fibras nervosas visíveis localizadas ao longo das artérias renais através de um processo mecânico por dissecação inicialmente, e em seguida, à denervação química, utilizando algodão embebido com fenol alcoólico a 10% aplicado em toda a extensão da artéria renal. A incisão cirúrgica foi suturada por planos e os animais foram alojados em gaiolas individuais por sete dias até a realização dos experimentos. Previamente aos experimentos foi observado jejum de seis horas somente para ração sólida.

3.1.3- Grupo obstruído ou Ox (n = 5)

Como previamente descrito, após a anestesia os animais foram submetidos à oclusão da uretra posterior, através de um ponto dado com fio de algodão três zeros, o suficiente para provocar uma obstrução total das vias urinárias inferiores. Este procedimento cirúrgico foi realizado duas horas antes dos experimentos. Foi observado jejum de 6h para todos os animais, somente para ração sólida.

3.1.4- Grupo simulado ou Sham (n = 5)

Realizado grupo simulado para os procedimentos cirúrgicos pareando os grupos *sham* e cirúrgicos. Para todos os procedimentos simulados, os rins foram expostos e suavemente manipulados sem qualquer procedimento que causasse dano aos mesmos.

3.1.5- Grupo íntegro ou *Non operative* (n = 5)

Grupo utilizado para padrão e referência experimental. Este grupo não sofreu qualquer manipulação cirúrgica.

3.2- Bloqueio β adrenérgico com propanolol ou Grupo (+)

Adicionalmente, após a realização das curvas térmicas, os grupos: denervados, íntegros, simulados e nefrectomizados, foram tratados com propanolol (Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ) por três dias, via gavagem à dose 15mg/Kg/dia para novas determinações das curvas térmicas.

3.3- Modelo de bloqueio externo de transferência térmica pela imersão em água termoneutra (*Water Immersion*)

A imersão em água foi o modelo utilizado neste estudo com o objetivo de bloquear a transferência térmica para o meio externo, acumulando progressivamente a temperatura interna. Nessa situação ocorre uma re-distribuição fisiológica do volume sanguíneo periférico para os vasos venosos centrais elevando também a temperatura nestes órgãos. Este efeito é resultado de três principais fatores: a) a pressão hidrostática reduz a capacitância venosa das extremidades; b) a imposição de força antagônica à gravidade (empuxo); c) e, a uma pressão intratorácica negativa (Park *et al.*, 1999).

Em humanos este aumento da distribuição venosa central pode chegar a 700ml, elevando o débito cardíaco em até 33% e a pressão venosa central em 12-18 mmHg. Em vista da ativação dos barorreceptores de baixa pressão respostas neurais e humorais são observadas. As respostas humorais mais relevantes relacionam-se com a redução na concentração dos hormônios antidiurético (ADH) e secreção de renina com a elevação simultânea do Péptido Atrial Natriurético (Epstein *et al.*, 1985).

O segundo estímulo relacionado à redistribuição volêmica central é originado pela estimulação neural de mecano-sensores localizados no átrio e vasos venosos centrais. Estes barorreceptores encaminham ao SNC (núcleo trato solitário) informações conduzidas pelo nervo vago e glossofaríngeo, promovendo um reflexo que inibe a atividade simpática inclusive a renal, elevando a diurese e a natriurese.

Este efeito é atenuado em indivíduos depletados de sódio e volume, ou em modelos de denervação cardíaca ou renal (Miki et al., 1989; Kenju *et al.*, 2002).

Os animais foram imersos em água termoneutra, isto é, com a temperatura da água igual à temperatura corporal, tendo em vista ter sido demonstrado que em uma ampla faixa de variação térmica (22°C a 36°C), a temperatura da água não modifica a diurese/natriurese como decorrência da supremacia do estímulo cárdio-renal sobre o térmico. Em temperaturas extremamente abaixo do normal (15°C) a acentuada vasoconstrição promove a redistribuição do volume sanguíneo elevando a volemia central e conseqüentemente a diurese; em elevadas temperaturas, acima de 38°C, ocorre uma elevação do fluxo urinário, porém esta é parcialmente atenuada pela redução da resistência vascular das artérias periféricas, resultando em queda da pressão arterial e do aquecimento corporal passivo (Allison e Reger, 1998; Nakamitsu *et al.*, 1994; Sramek *et al.*, 2000;).

3.4- Desenho experimental

3.4.1- Curvas térmicas

Para a realização das curvas térmicas, utilizou-se um banho térmico, especialmente construído para esta finalidade (BioÉtica, São Paulo, SP), com ajuste de temperatura digital e capacidade de 3,2 litros. O banho foi equipado com dois contentores feitos sob medida para os experimentos, modelados em aço inoxidável e ajustados para acomodar um rato cada vez, imerso em água até a região cervical e cujo desenho propiciou a determinação das temperaturas através de sensor térmico (Harvard, MA, EUA). As mensurações foram efetuadas por um termômetro digital (IOPE, São Paulo, SP) com

calibração para graus Celsius (°C) e precisão de centésimos de centígrados, calibrado de acordo com os padrões do Instituto Brasileiro de Normas Técnicas.

Após a sedação i.p. com Ketamina + Romprum (0,2ml/100g) e sulfato de atropina (0,1ml/100g), introduziu-se via retal o *probe* com sensor térmico para monitorização da temperatura retal.

Após um período de estabilização, de aproximadamente 5 minutos pós sedação, os ratos foram imersos em um banho previamente descrito e aquecido com temperatura ajustada próxima a da temperatura corporal dos ratos, ou seja, a 37,3 ° C. Os animais permaneceram imersos durante 30 minutos, apenas com a cabeça para fora da água, sendo aferida a temperatura a cada 60 segundos.

O ganho térmico, representado pelo aquecimento decorrente da impossibilidade de transferência de calor para o meio externo (abolição do gradiente térmico entre este e o meio interno), foi registrado minuto a minuto e representado graficamente em uma curva de temperatura em graus Celsius versus tempo em minutos. Para cada grupo foram realizadas cinco curvas térmicas independentes. Com o intuito de se estabelecer a análise estatística dos resultados, foram considerados alguns parâmetros: temperatura inicial, temperatura final, área sobre a curva térmica e a inclinação da reta a partir do ponto inicial (*slope* da curva). A declividade da curva foi obtida pela regressão linear dos pontos plotados pelo método dos mínimos quadrados.

3.4.2- Estimativa da taxa de filtração glomerular através da dosagem de creatinina

Ao final de cada experimento foram coletadas amostras de sangue para a dosagem de creatinina e estimativa da função renal.

Para a dosagem foi empregada a técnica de Folin-Wu com desproteinização do plasma e adição de 3,5ml de ácido pícrico em 0,7 ml de amostra (Laborlab-Guarulhos, SP/Brasil). Após a centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm foi adicionado o reativo alcalino (NaOH 1mol/L) à amostra, e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 510nm, juntamente com o padrão de creatinina (2mg/dL). Os resultados foram expressos mg/dL.

3.4.3- Termogênese metabólica

3.4.3.1- Controle respiratório mitocondrial

Três experimentos, no mínimo, foram realizados para cada grupo experimental, a saber, Nx5/6, Dx, Ox, Íntegro e Simulado e cada experimento realizado em triplicata. Após jejum de seis horas os ratos foram sacrificados por destroncamento cervical. O fígado foi isolado, separado, fragmentado e homogeneizado (10 *strokes*) em um homogeneizador (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments), em meio a solução contendo 250 mM de sacarose, 0.5 mM de EGTA e 5.0 mM de tampão Hepes (ph 7.2). Em seguida a amostra foi centrifugada em três ciclos de 10 minutos cada, sendo o primeiro ciclo a 2500 rpm e os dois ciclos seguintes a 8000 rpm, seguindo a técnica de centrifugação diferenciada (Schneider e Hogebon, 1950).

A suspensão da amostra foi lavada por duas vezes em um mesmo preparado contendo 0.1 mM de EGTA e a solução final diluída em 250 mM de sacarose. A concentração das suspensões de mitocôndrias foi determinada pelo método de Biureto usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (Gornall e Hunter, 1941). Os experimentos foram realizados em meio padrão contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCL, 10 nM de tampão HEPES, 1mM de $MgCl_2$, 2 mM P_i , 5 mM succinato, 5 μM rotenona e 50 μM de $CaCl_2$ (28°C).

A taxa de consumo de oxigênio foi medida usando um eletrodo tipo Clark (*Yellow Springs Instruments*, Ohio, EUA) a 28°C. O eletrodo de Clark é composto de duas células separadas por uma ponte de sal (KCL a 50%). Dois eletrodos de platina e prata são separados por um isolante elétrico e mantidos sob uma diferença de potencial constante entre eles. Dessa forma, o eletrodo de platina carrega-se negativamente e o de prata positivamente ocorrendo através das equações:

- Ânodo: $4Ag^+ + 4Cl^- = 4AgCl + 4e^-$
- Cátodo: $4H^+ + 4e^- + O_2 = 2H_2O$
- Equação geral: $4Ag^+ + 4Cl^- + 4H^+ + O_2 = 4AgCl + 2H_2O$

A platina dissocia a molécula de água, gerando elétrons livres em solução. Estes elétrons combinam-se com o oxigênio dissolvido na água, para então gerar novas moléculas de água. Estes elétrons livres, quando submetidos à diferença de potencial produzem uma corrente elétrica que é detectada pelo oxígrafo. Esta corrente é, portanto, determinada pela quantidade de oxigênio dissolvida na água. A saturação de oxigênio na água é a mesma do ar (20,9%). Assim 1 ml de solução a 28 graus C possui 225 nm de O₂ ou 450 nano-átomos de oxigênio. Utiliza-se este valor para calcular a velocidade da fase III e IV. Inicialmente calcula-se o fator respiratório que corresponde ao número de átomos de oxigênio consumidos pelo progresso do *chart* em milímetros, plotando-se a curva de consumo de oxigênio do meio na abscissa contra o tempo em minutos na ordenada. Após a adição de ADP, identifica-se a projeção da inclinação da curva III da fase respiratória durante o período de um minuto sobre o eixo x e multiplicam-se estes dois valores (fator respiratório e inclinação) com a quantidade de proteínas da amostra (que expressa a quantidade de mitocôndrias adicionadas):

Velocidade do consumo de oxigênio:

$$(\text{fator}) \times (\text{comprimento}) \times (\text{quantidade de proteína})$$

Repete-se este mesmo procedimento com a fase IV e obtém-se o valor do controle respiratório pela razão entre os valores obtidos da velocidade do consumo de oxigênio da fase III e a fase IV.

O valor ADP/O foi obtido utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{ADP/O} = (\text{Qtde de ADP}) / (\text{fator}) \times (\text{projeção da curva III sobre o eixo y})$$

3.5- Técnica de *Westernblot*

Os ratos foram anestesiados após jejum de 12 horas com Thiopental (110 µg/kg; Cristália; Itapira, São Paulo, Brazil). Após 10 minutos de anestesia efetiva (abolição do reflexo palpebral) retirou-se cerca de 0,3 mg de gordura marrom localizada na

região cervical posterior de cada animal. A esta amostra foi adicionada 2 ml de solução tampão a 4 °C para cada amostra contendo, EDTA a 10 mM, Trisma a 100 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, ortovanato de sódio a 10 mM, PMSF a 2mM, aprotinina a 0,1mg/ml, água deionizada até completar 25 ml de solução e triton a 10%.

Procedeu-se, em seguida, à homogeneização da amostra utilizando um Polytron (modelo PT 10/35, *Brinkmann Instruments*) operando a velocidade máxima por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 11000 rpm por 20 minutos a 4 °C.

A quantificação protéica foi realizada com método de Biureto, com adição de 400 µl do extrato, a 1 ml de reagente Biureto. As amostras são lidas por espectrofotometria após a adição de 100µ de leure (anti-fúngico) e 0,015 mg de DTT.

Quantidades iguais de proteínas de cada amostra foram transferidas para o gel de poliacrilamida a 12% juntamente com marcadores protéicos de peso molecular padrão (*Bio-Rad*, Hercules, Califórnia, EUA). Estas são, então, transferidas para a membrana de nitro celulose (*Hybond ECL nitrocellulose membrane*, Amersham, Inglaterra) em um aparelho de transferência elétrica (*Mini Proteam*) mantido a 120V por duas horas. Durante a transferência, adicionou-se à solução tampão de transferência: SDS e β-mercaptoethanol (*Bio Rad*, Hercules, Califórnia, EUA) para quebra das pontes de sulfeto e diluição das proteínas de alto peso molecular. Depois, incubou-se a membrana em solução bloqueadora (5% de leite desnatado, 10 mM de Tris, 150mM de NaCl e 0,02% Tween 20) por duas horas a 22 graus Celsius.

As membranas foram deixadas “*overnight*” em câmara fria com solução contendo anticorpos de coelho marcado para UCP1, ERK1,2, PI3K, AKT e IRS1 (*Sta Cruz Biothecnology*, Cal, EUA). No dia seguinte as membranas foram lavadas duas vezes, inicialmente com solução bloqueadora contendo 3% de leite desnatado por duas horas e depois somente com solução bloqueadora por três vezes por 10 minutos e em seguida foram incubadas com proteína A marcada com iodo radioativo (I^{125} -Protein A) para exposição por 7 dias em -80°C com filme Kodak (pré flashed Kodak XAR).

As bandas de proteínas específicas para cada marcador presentes em cada “blot” foram analisadas por densitometria óptica (*ScionCorp*, Frederick, Md, EUA).

3.6- Cálculos estatísticos

3.6.1- Curvas térmicas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP e foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$ obtidos pelo teste ANOVA após comparação simultânea de todos os grupos, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni para determinação das diferenças individuais entre os diferentes grupos. Utilizou-se para tal o software de estatística Prism 4 (*GraphPad*, MA, EUA).

3.6.2- Equações utilizadas para as predições teóricas

- a) Ganho térmico: TMB (obtida por métodos calorimétricos) = $dT/dt \times \text{massa} \times \text{cap. calorif}$;
- b) Área sobre a curva: Em princípio, igual à TMB (Calorias/hora)/2 uma vez que a variação térmica é igual à variação do metabolismo;
- c) Contribuição térmica renal: 10% da TMB (supondo que o rim é responsável por 10% do consumo de oxigênio utilizado no metabolismo basal) (Brundin e Wahren, 1994).

3.6.3- Equações utilizadas para os cálculos experimentais

- a) Ganho térmico: $T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}$, onde T é a temperatura;
- b) Área sobre a curva: Calculada através do algoritmo: $\int f(x)dx$, sendo $f(x) = y_0 \cdot L / (y_0 + (L - y_0) \cdot e^{-kt})$, e sendo L a distância entre o ponto inicial e final (no eixo y) e kt a constante de proporcionalidade da curva;

- c) Contribuição térmica renal: Diferença entre as áreas das curvas dos grupos experimentais comparado ao grupo íntegro. Ou seja, a variação no comportamento das curvas deve-se ao fator renal. No caso do denervado o SNC aumentou em 10% a atividade termogênica devido à falsa supressão do nervo renal. No caso do nefrectomizado o organismo do rato perdeu esta contribuição.

3.6.4- Dosagem de creatinina e variação ponderal

Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP e considerados significativos os valores de $p < 0,05$ obtidos pelo teste ANOVA para todos os grupos entre si.

3.7- Controle respiratório e razão ADP/O

Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP e foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$ obtidos pelo teste ANOVA para os diferentes grupos experimentais.

3.8- Técnica de *Westernblot*

Para a comparação entre os três experimentos realizados avaliando a expressão e a atividade protéica através de *Westernblotting*, os valores foram normalizados e expressos em porcentagem em relação ao grupo íntegro cujo valor foi considerado de 100%. As porcentagens de cada grupo foram analisadas pelo teste de ANOVA e posteriormente submetidas à avaliação pelo *post hoc* de Bonferoni.

4- RESULTADOS

4.1- Variação ponderal dos grupos experimentais

Os resultados apresentados a seguir serão expressos como média $\pm$ DP. Os animais foram pesados em três situações: na chegada, pré-cirurgia e sete dias após os procedimentos cirúrgicos ou simulados, quando foram iniciados os experimentos. Abaixo os resultados da variação ponderal comparando diferentes grupos observados, 7 dias após as cirurgias.

- **Grupo Íntegro:** $51,75 \pm 2,2173$ g. ($p < 0,01$);
- **Grupo Sham:** $17,3 \pm 6,429$ g. ($p < 0,01$);
- **Grupo Nx5/6:** $-20 \pm 6,879$ g ($p < 0,01$);
- **Grupo Ox:** não houve comparação entre os grupos uma vez que o procedimento cirúrgico foi realizado algumas horas antes do experimento
- **Grupo Dx:** $17,5 \pm 3,696$ g ($p < 0,01$).

Teste de ANOVA seguido por análise de Bonferroni com valor de $p < 0,05$ para todos em relação ao grupo íntegro.

Não houve variação estatisticamente válida entre os demais grupos devido ao elevado desvio padrão.

4.2- Níveis séricos de creatinina

As amostras foram coletadas por punção intracardíaca sob anestesia, após os experimentos realizados para estabelecer as curvas térmicas dos diferentes animais.

- **Grupo Íntegro:** $0,6 \pm 0,1357$ ($p < 0,005$)
- **Grupo Sham:** $0,54 \pm 0,06$. ($p < 0,005$)
- **Grupo Nx5/6:** $0,8 \pm 0,02$. ($p < 0,005$)

- **Grupo Ox:** Utilizaram-se os mesmos valores para o Grupo OX e Non
- **Grupo Dx:** $0,46 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)

Teste de ANOVA seguido por análise de Bonferroni com valor de $p < 0,05$ para o grupo Nx em relação ao grupo Sham, Dx e Íntegro.

4.3- Perfil das curvas térmicas

4.3.1- Imersão dos animais em meio termoneutro

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores obtidos durante a realização do experimento com bloqueio da transferência de calor utilizando o meio termoneutro. A temperatura foi registrada em graus Celsius. A declividade em números arbitrários adimensionais. Área sob a curva, utilizada para estudar a produção calórica total, deve ser interpretada em Caloria/30 minutos, uma vez que o calor gerado observado é o resultante do metabolismo basal.

Tabela 1- Valores representam as médias $\pm$ DP obtido para os diferentes grupos experimentais, durante a imersão dos animais em meio termoneutro

	Íntegro	Sham	Nx	Dx	Ox
T inicial (°C)	$37,05 \pm 0,1106$	$36,92 \pm 0,1641$	$36,14 \pm 0,8083$	$37,51 \pm 0,9601$	$37,22 \pm 0,4338$
T final (°C)	$39,25 \pm 0,35$	$39,09 \pm 0,21$	$38,74 \pm 0,56$	$40,38 \pm 1,04$	$39,13 \pm 0,40$
Declividade	$0,05182 \pm 0,005546$	$0,04238 \pm 0,006312$	$0,05613 \pm 0,006858$	$0,05836 \pm 0,007683$	$0,04516 \pm 0,005107$
Área sob a curva	$39,82 \pm 5,848$	$41,03 \pm 3,06$	$63,96 \pm 13,8$	$45,22 \pm 4,622$	$35,61 \pm 7,792$

Tabela 2- Valores das médias $\pm$ DP, obtidas durante a imersão dos animais em meio isotérmico em animais tratados previamente com propanolol

	Íntegro +	Simulado+	Nx +	Dx +
T inicial (°C)	35,63 $\pm$ 0,7592	37,22 $\pm$ 0,8442	36,14 $\pm$ 0,3606	36,64 $\pm$ 0,7300
T final (°C)	38,64 $\pm$ 0,4734	39,43 $\pm$ 0,6270	39,53 $\pm$ 0,3333	39,33 $\pm$ 0,3748
Slope	0,06205 $\pm$ 0,0067	0,05216 $\pm$ 0,0067	0,06391 $\pm$ 0,0063	0,05764 $\pm$ 0,0054
Área	67,51 $\pm$ 20,58	55,91 $\pm$ 21,94	62,35 $\pm$ 9,76	57,05 $\pm$ 17,82

4.4- Gráficos dos perfis das curvas térmicas

As curvas a seguir foram obtidas durante imersão a aproximadamente 37° Celsius de temperatura correspondente à temperatura retal inicial de cada animal. Durante 30 minutos foram anotados os valores registrados acima da temperatura inicial (*range*). Os Gráficos apresentam os resultados do grupo simulado comparado aos diferentes grupos.

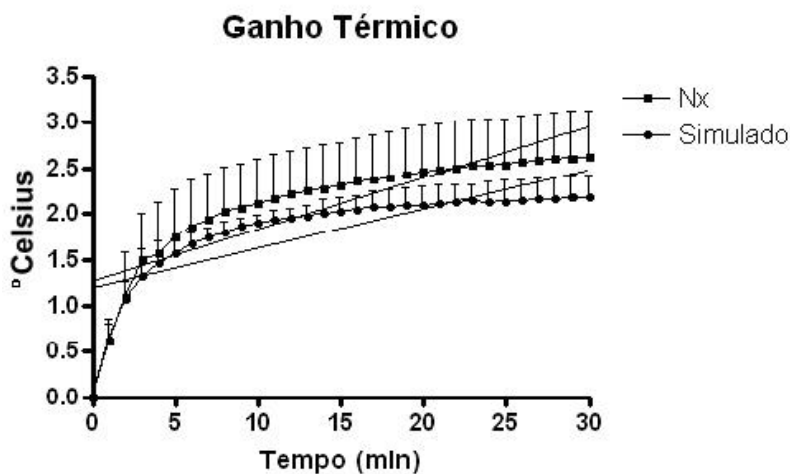


Gráfico 1- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Nx e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (*slope*)

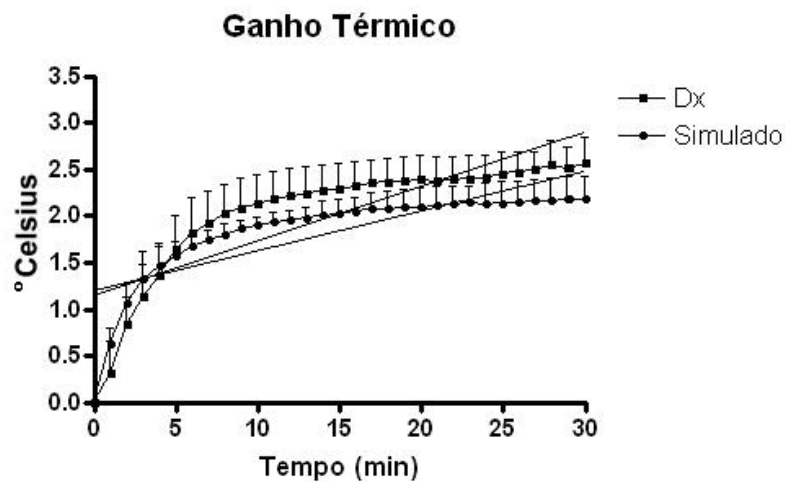


Gráfico 2- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Dx e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (*slope*)

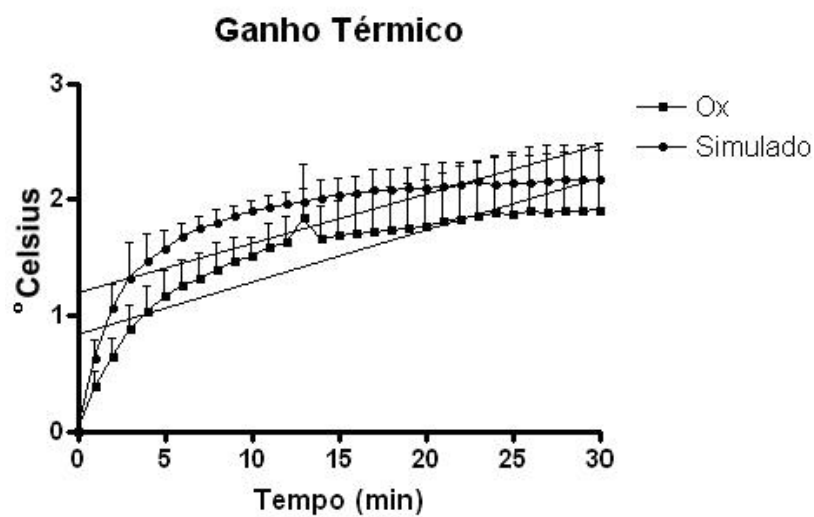


Gráfico 3- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Ox e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (*slope*)

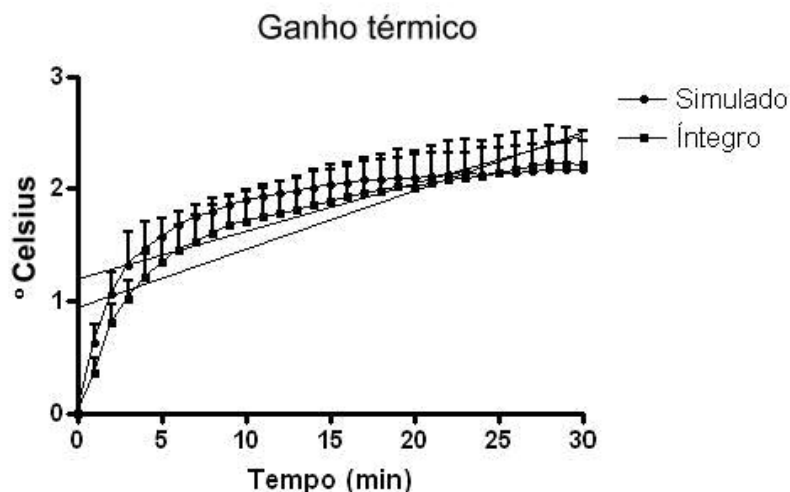


Gráfico 4- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Íntegro (Non) e Simulado. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (*slope*)

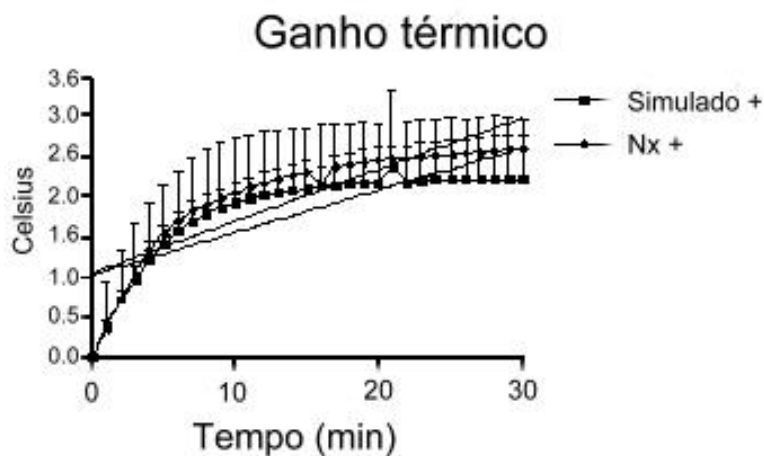


Gráfico 5- Representa a curva térmica comparativa entre os grupos Nx + e Simulado +, que foram tratados previamente com propanolol. Também estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (*slope*)

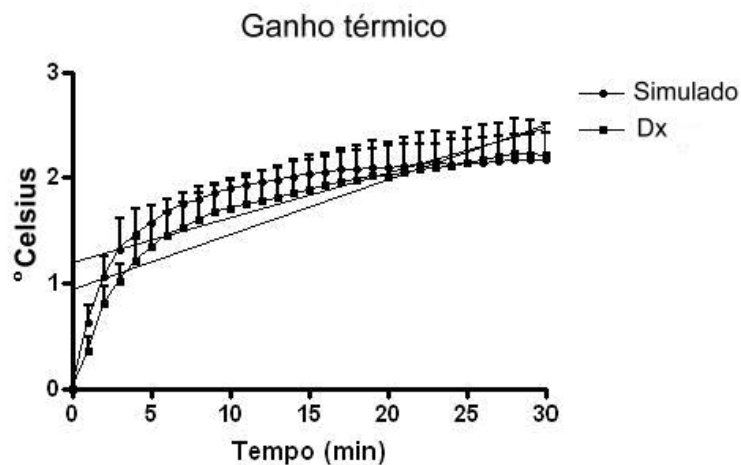


Gráfico 6- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Dx + e Simulado + , que foram tratados previamente com propanolol. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (*slope*)

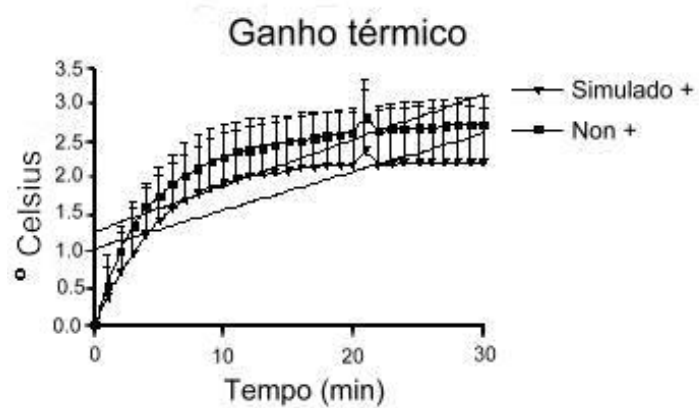


Gráfico 7- Apresenta a curva térmica comparativa entre os grupos Integro (Non) + e Simulado+, que foram tratados previamente com propanolol. Estão representados no gráfico o desvio padrão e a declividade (*slope*)

4.5- Gráficos dos perfis térmicos que analisados estatisticamente

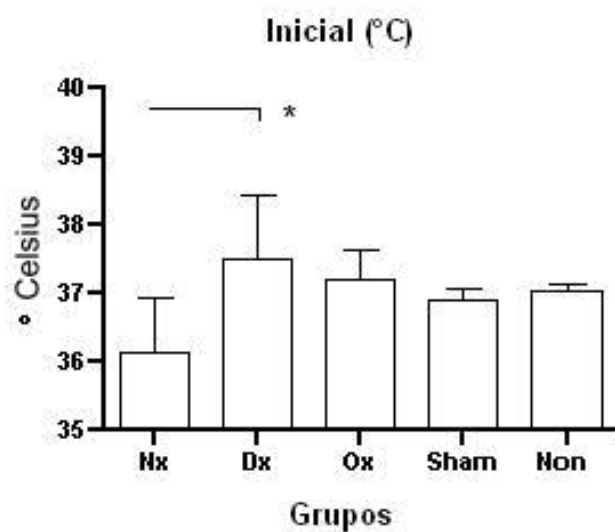


Gráfico 8- Apresenta os resultados como médias + desvio padrão das temperaturas iniciais obtida nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido

* denota : ANOVA ($p < 0,05$); Bonferroni ($p < 0,05$)

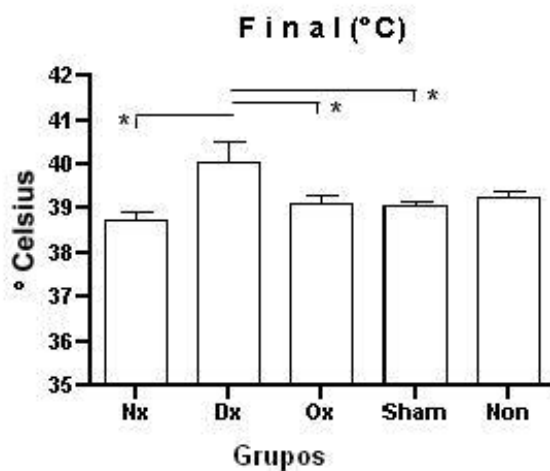


Gráfico 9- Representa os resultados como médias + desvio padrão das temperaturas finais obtidas nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido

* denota: ANOVA ($p < 0,005$); Bonferroni ($p < 0,05$)

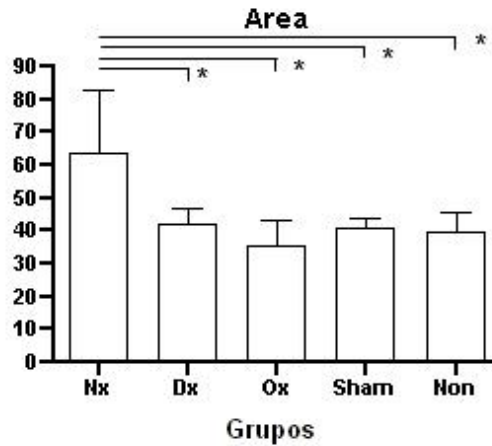


Gráfico 10- Apresenta os resultados como médias + desvio padrão das áreas obtidas nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido

* denota: ANOVA ($p < 0,005$); Bonferroni (0,05)

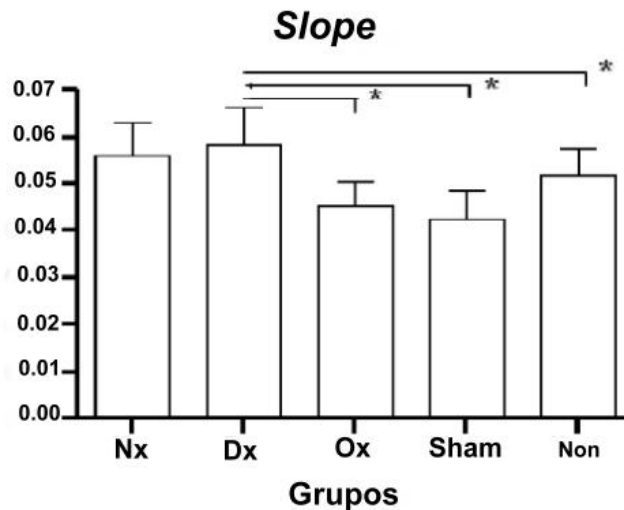


Gráfico 11- Representa os resultados como médias + desvio padrão das declividades (*slope*) obtidas nos diferentes grupos. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido

* denota: ANOVA ($p < 0,005$); Bonferroni ($p < 0,05$)

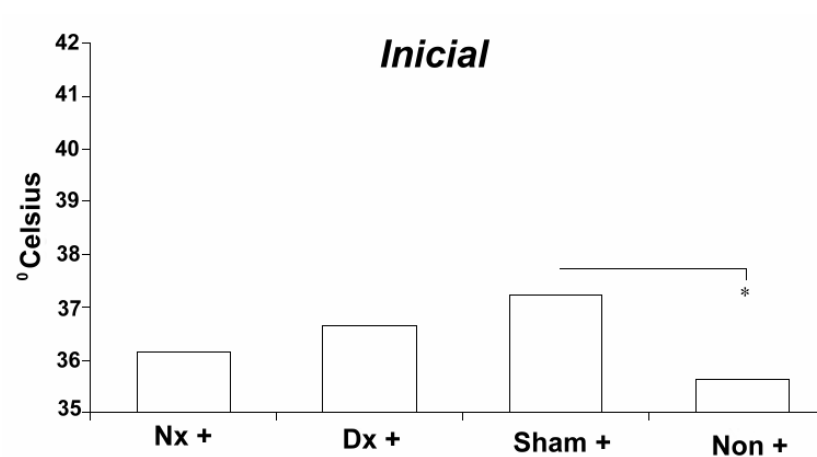


Gráfico 12- Resultados como médias + desvio padrão das temperaturas iniciais obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido

* denota: ANOVA ($p < 0,05$); Bonferroni ($p < 0,05$)

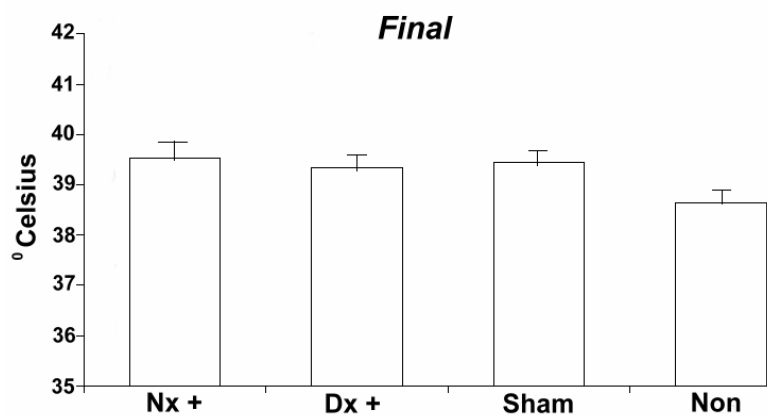


Gráfico 13- Resultados como médias + desvio padrão das temperaturas finais obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido. ANOVA: $p < 0,05$

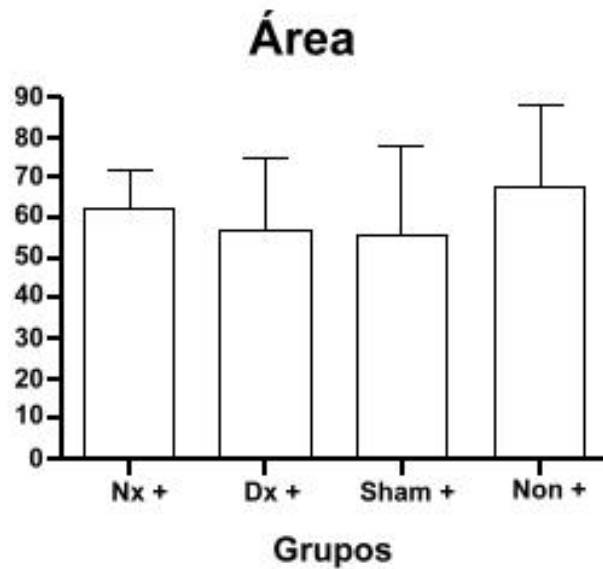


Gráfico 14- Resultados como médias + desvio padrão das áreas obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido

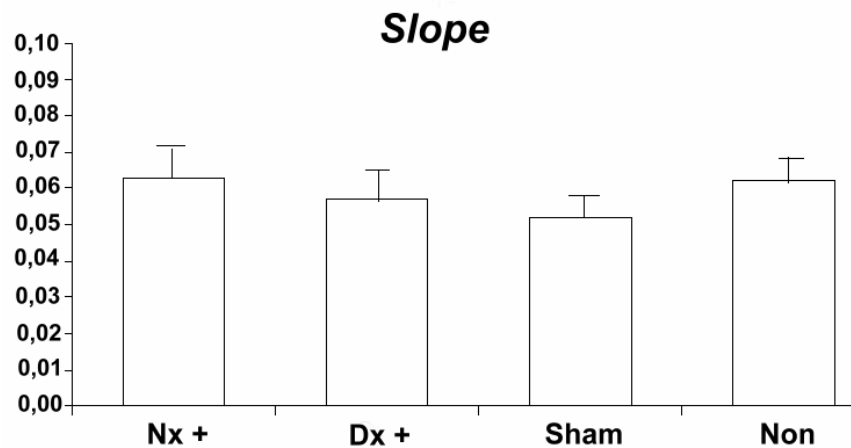


Gráfico 15- Resultados como médias + desvio padrão das declividades obtidas nos diferentes grupos que foram tratados previamente com propanolol. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA e como teste *pos hoc* Bonferroni; $p < 0,05$ foi o nível de significância permitido ANOVA: $p < 0,0001$

* denota: $p < 0,01$

** denota: $p < 0,001$

4.6- Apresentação e análise comparativa entre os valores teóricos calculados e valores experimentais referentes à área sobre a curva, ganho térmico e contribuição térmica na composição da temperatura corporal dos diferentes grupos

Na Tabela 3 é apresentada a comparação entre os valores calculados e os valores encontrados, tendo como referência para os valores teóricos os animais com características do grupo Íntegro. O ganho térmico teórico foi calculado de acordo com os valores descritos no Apêndice 1 e na metodologia para o experimental pela da diferença entre a Tfinal –Tinicial.

Com relação à área sobre a curva, o valor teórico foi calculado por meio da conversão do ganho térmico em graus Celsius por calorías, levando-se em conta a massa corporal e a capacidade calorífica do animal; para os grupos experimentais, foi necessária a conversão das aferições obtidas nas curvas térmicas para o sistema CGS (Cal/horas) das aferições obtidas nas curvas térmicas. No referente à contribuição térmica renal, os valores teóricos são correspondentes a 10% do metabolismo basal. Para os grupos experimentais, os dados foram obtidos por meio da diferença entre as áreas dos grupos injuriados e o grupo Íntegro (Non). No grupo Dx, houve um incremento na geração de calor exatamente igual a contribuição renal normal, em virtude de uma interpretação errônea do SNC, pois foi induzido por meio da denervação, a considerar o órgão renal sem atividade térmica.

Tabela 3- Comparação entre os valores calculados e os valores encontrados, tendo como referência para os valores teóricos os animais com características do grupo íntegro

	Valor teórico (Normal)		Valor experimental		
	Normal	Dx	Nx	Simulado	Íntegro
Ganho térmico (°C)	2,7	2,6	2,8	2,2	2,2
Área sobre a curva (Cal/h)	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9
Contribuição térmica da injúria renal	10%	10%	10%	0	0

4.7- Consumo de oxigênio pela cadeia respiratória em mitocôndrias do fígado

4.7.1- Controle respiratório

Utilizando mitocôndrias de fígados de animais dos diferentes grupos estudados foram realizadas três medidas independentes para cada grupo do controle respiratório, sendo cada medida repetida em triplicata. Os valores abaixo representam as médias + DP para os três experimentos realizados. Os menores valores obtidos representam um menor consumo de oxigênio em um determinado período de tempo, para as mitocôndrias na presença de ADP e succinato. A análise dos resultados avaliados pelo teste de ANOVA não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) na comparação entre os diferentes grupos. Os resultados obtidos também não foram significativamente diferentes daqueles obtidos para fígados estudados em animais controles nos diferentes estudos do laboratório. ($p > 0,05$)

Valores das médias + DP do controle respiratório para os diferentes grupos:

- **Grupo Nx 5/6:** $4,48 \pm 0,3464$
- **Grupo Dx:** $4,525 \pm 0,2872$
- **Grupo Ox:** $4,8 \pm 0,3464$
- **Grupo Sham:** $5,0 \pm 0,3882$
- **Grupo Normal:** $4,7 \pm 0,5639$
- ***Teste de Anova:** $p > 0,05$

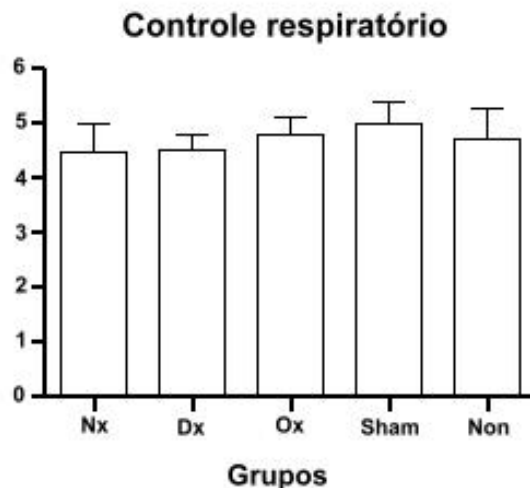


Gráfico 16- Resultados do controle respiratório para os diferentes grupos, em estudos realizados com mitocôndrias hepáticas. A análise estatística utilizou ANOVA e $p < 0,05$ foi considerado para estabelecer o nível de significância. ANOVA: $p > 0,05$

4.7.2- Relação ADP/O – Eficiência da cadeia respiratória

A avaliação da razão ADP/O demonstra que quanto maior esta razão, maior o número de ATPs formados por mol de oxigênio consumido e conseqüentemente maior é a eficiência durante a fosforilação oxidativa. A seguir os valores expressos como médias + DP, dos diversos grupos experimentais. Para a razão ADP/O, a análise de variância (ANOVA) entre os grupos não foi significativa ($p > 0,05$).

- **Grupo Nx:** $1,4 \pm 0,1528$
- **Grupo Dx:** $1,4 \pm 0,1155$
- **Grupo Ox:** $1,2 \pm 0,05773$
- **Grupo Sham:** $1,4 \pm 0,1155$
- **Grupo Íntegro:** $1,3 \pm 0,05774$
- *Teste de ANOVA: $p > 0,05$

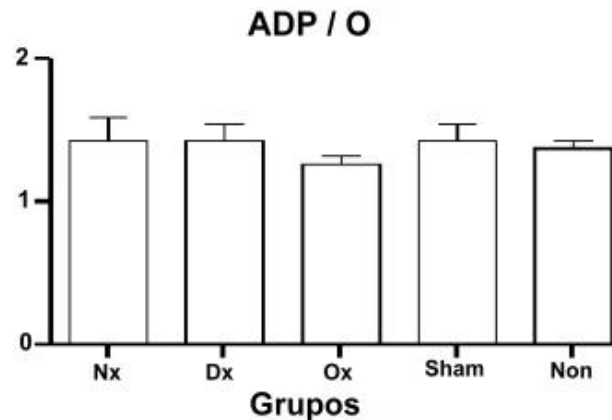


Gráfico 17- Resultados do controle respiratório para os diferentes grupos, em estudos realizados com mitocôndrias hepáticas. A análise estatística utilizou ANOVA e $p < 0,05$ foi considerado para estabelecer o nível de significância. ANOVA: $p > 0,05$

4.8- Gráficos representativos do traçado do polígrafo durante o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias hepáticas

No Gráfico 18 é possível observar que no grupo de animais nefrectomizados, inicialmente o consumo de oxigênio é menos intenso, apresentando consumo do substrato contendo succinato. Quando da adição de ADP, verifica-se um maior consumo de oxigênio associado a um aumento do potencial elétrico transmembrana que está representado pela inclinação da curva no estágio ou fase III da respiração. Após o consumo do ADP, inicia-se a fase IV com redução do consumo de oxigênio e retorno ao basal do gradiente eletroquímico intermembranas.

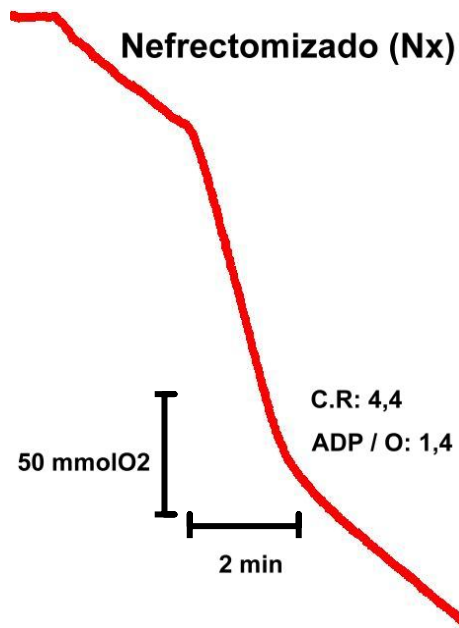


Gráfico 18- Representação gráfica da curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Nx

O Gráfico 19 demonstra que nos animais denervados, no início, o consumo de oxigênio é menos intenso, com consumo do substrato contendo succinato. Quando da adição de ADP, verifica-se um maior consumo de oxigênio associado a um aumento do potencial elétrico transmembrana que está representado pela inclinação da curva no estágio ou fase III da respiração. Após o consumo do ADP, inicia-se a fase IV com redução do consumo de oxigênio e retorno ao basal do gradiente eletroquímico intermembranas.

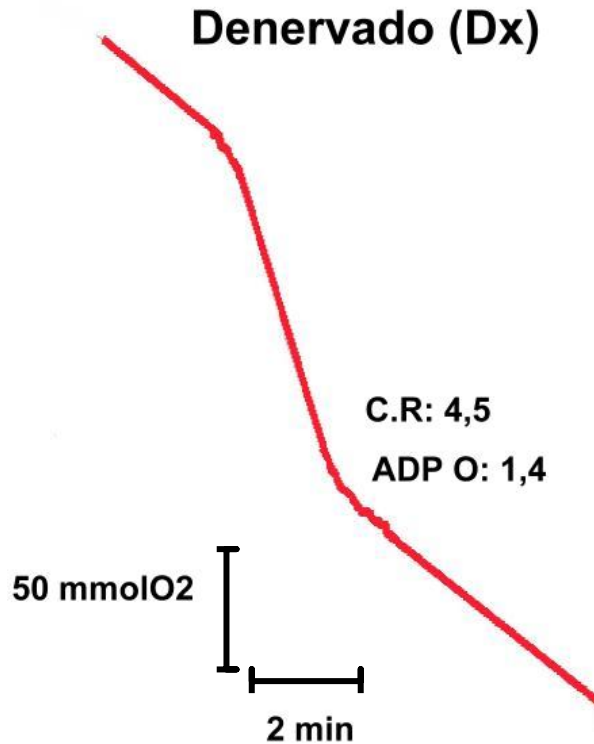


Gráfico 19- Representação da curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Dx

Como apresentado no Gráfico 20, para um animal do grupo Ox, inicialmente verificou-se um consumo de oxigênio menos intenso, com consumo do substrato contendo succinato. Quando da adição de ADP, observou-se um maior consumo de oxigênio associado a um aumento do potencial elétrico transmembrana que está representado pela inclinação da curva no estadio ou fase III da respiração. Posteriormente, após o consumo do ADP, inicia-se a fase IV com redução do consumo de oxigênio e retorno ao basal do gradiente eletroquímico intermembranas.

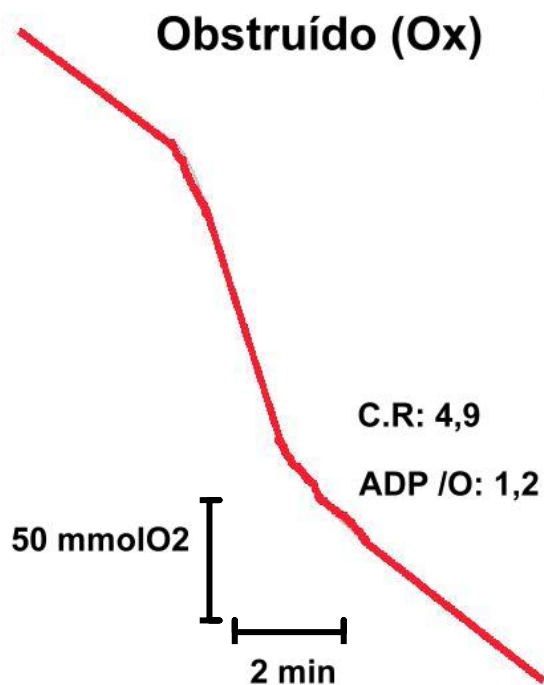


Gráfico 20- Representação gráfica da curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Ox

No Gráfico 21, é possível observar, inicialmente, um consumo de oxigênio menos intenso, com consumo do substrato contendo succinato. Quando da adição de ADP, notou-se um maior consumo de oxigênio associado a um aumento do potencial elétrico transmembrana que está representado pela inclinação da curva no estágio ou fase III da respiração. A seguir, após o consumo do ADP, inicia-se a fase IV com redução do consumo de oxigênio e retorno ao basal do gradiente eletroquímico intermembranas.

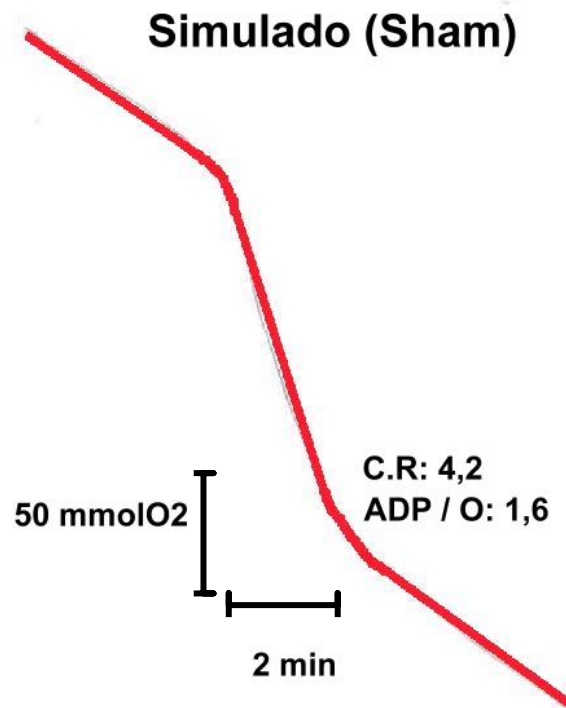


Gráfico 21- Curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Sham

No início, como apresentado no Gráfico 22, foi observado um consumo de oxigênio menos intenso, com consumo do substrato contendo succinato. Quando da adição de ADP, observou-se um maior consumo de oxigênio associado a um aumento do potencial elétrico transmembrana que está representado pela inclinação da curva no estágio ou fase III da respiração. A continuação do consumo do ADP iniciou-se a fase IV com redução do consumo de oxigênio e retorno ao basal do gradiente eletroquímico intermembranas.

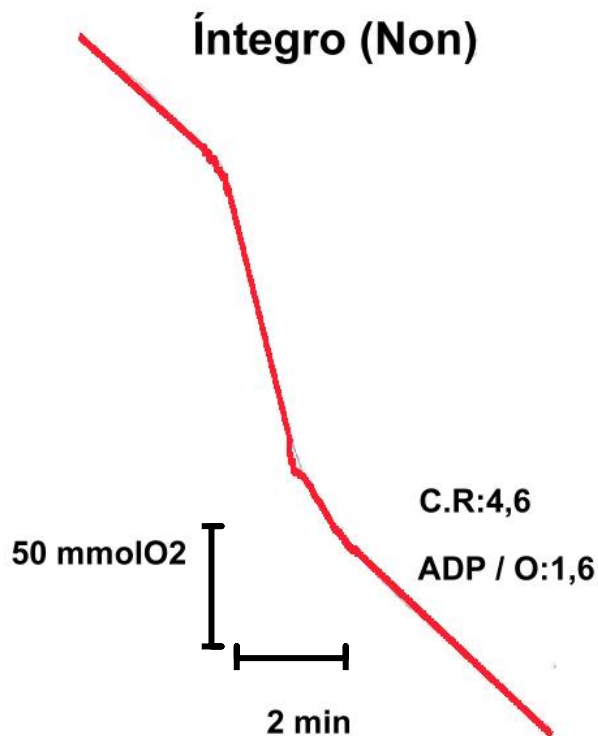


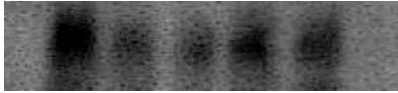
Gráfico 22- Curva obtida pelo oxígrafo de Clark para um animal do grupo Íntegro (Non)

4.9- Estudo da expressão e atividade de UCP e das proteínas envolvidas na via insulínica pós-receptora em gordura marrom

4.9.1- Atividade das vias Insulínicas

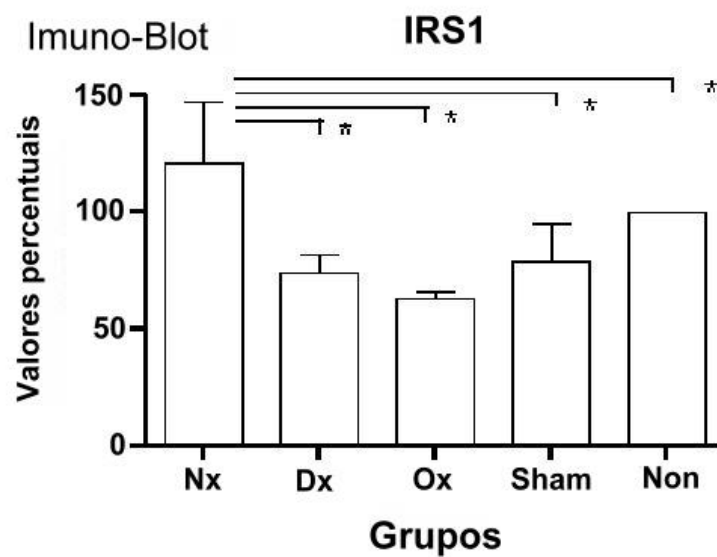
Para o estudo de atividade protéica em vias metabólicas em gordura marrom, os experimentos foram realizados e seus resultados analisados após a exposição do filme fotográfico. As imagens das bandas normatizadas foram transferidas para um computador DELL Latitude 100 e analisados por meio do programa *Scion* para determinação da intensidade da densitometria. Os valores apresentados representam, em porcentagem, a média +DP desta análise. As Figuras 3, 4, 5 e 6 assim como os Gráficos 23, 24, 25 e 26 utilizaram como parâmetro de referência as densidades do grupo íntegro.

IP-IRS1



IB: α -py

Figura 3- Expressão da atividade de IRS1 em gordura marrom de ratos submetidos aos diferentes procedimentos



* Denota: $p < 0,05$ (Bonferroni)

Gráfico 23- Valores obtidos pela densitometria mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste *pos hoc* de Bonferroni. ANOVA: $p < 0,05$

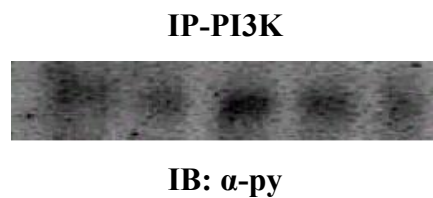


Figura 4- Expressão da atividade de PI3K em gordura marrom de ratos submetidos aos diferentes procedimentos

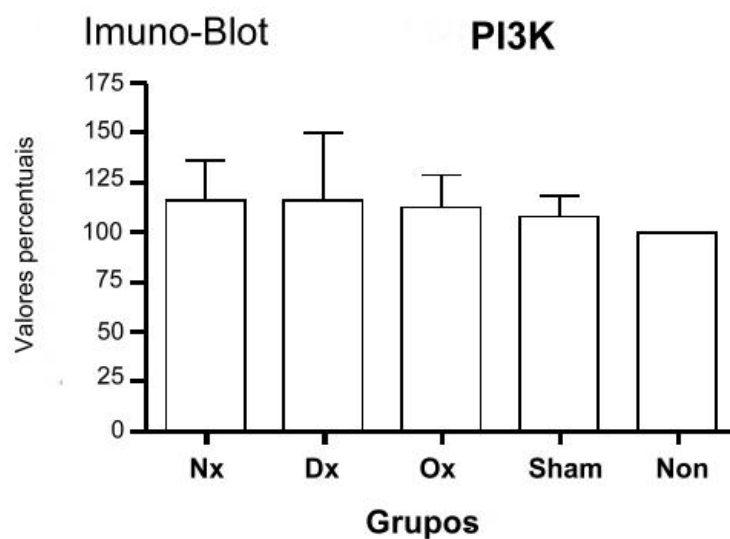
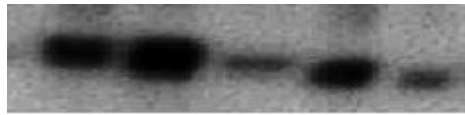


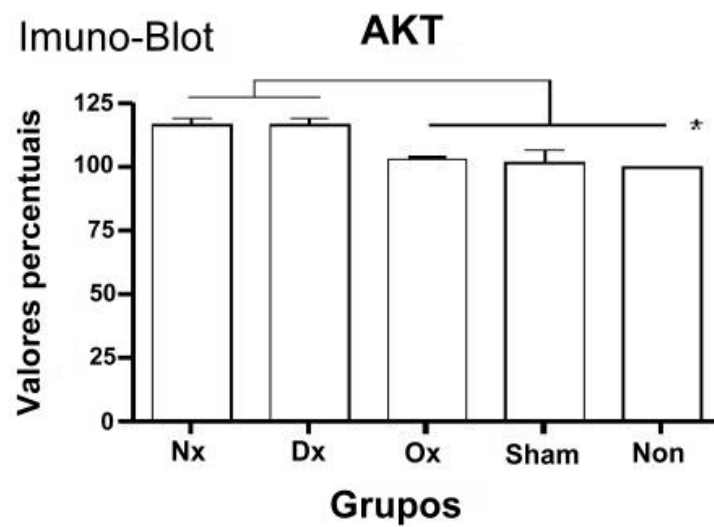
Gráfico 24- Valores obtidos pela densitometria não mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA). ANOVA: $p > 0,05$

IP-AKT



IB: α -py

Figura 5- Expressão da atividade de AKT1 em gordura marrom de ratos submetidos aos diferentes procedimentos



* Denota: $p < 0,05$ (Bonferroni)

Gráfico 25- Os valores obtidos pela densitometria mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste *pos hoc* de Bonferroni. ANOVA: $p < 0,005$

ERK 1 e 2



IB: α -py

Figura 6- Expressão da atividade de ERK1 e 2, em gordura marrom de ratos submetidos aos diferentes procedimentos

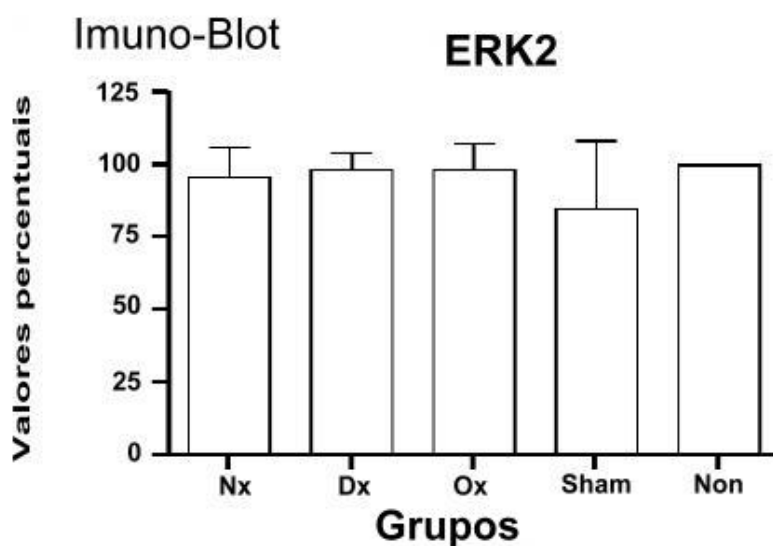


Gráfico 26- Valores obtidos pela densitometria mostram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste *pos hoc* de Bonferroni. ANOVA: $p > 0,05$

4.9.2- Atividade da proteína desacopladora Tipo 1 na gordura marrom

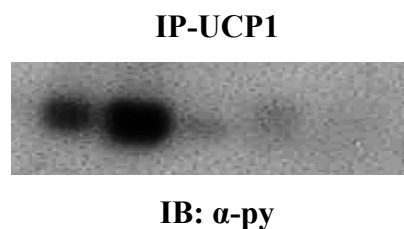
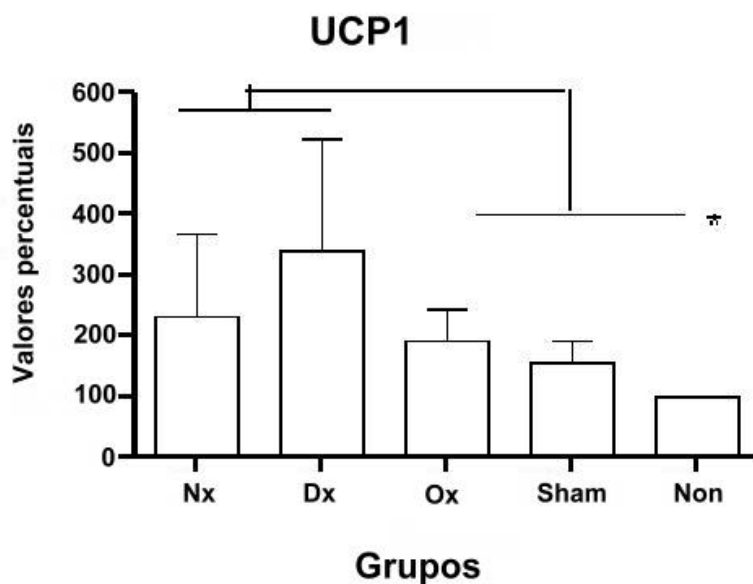


Figura 7- Expressão da atividade de UCP1 em gordura marrom de ratos submetidos a diferentes procedimentos



* Denota: $p < 0,05$ (Bonferroni)

Gráfico 27- Valores obtidos pela densitometria exibem diferenças significativas entre os grupos, quando estudados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste *post hoc* de Bonferroni

5- DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que as lesões renais provocaram diversas alterações na homeostase térmica dos grupos tratados. Quanto aos experimentos relacionados às curvas térmicas foi possível observar que o grupo nefrectomizado apresentou uma diminuição da sua temperatura corporal em relação ao grupo denervado, porém com uma área sobre a curva superior em relação aos demais grupos. Outro achado observado nas curvas térmicas foi quanto ao grupo denervado, que apresentou temperaturas corporais ao final da experiência superiores a todos os grupos, exceto o grupo íntegro e, também, uma declividade acentuada e significativamente maior em relação aos demais grupos exceto o grupo nefrectomizado. Na análise da técnica de *Westernblot* na gordura marrom, observou-se que houve uma maior expressão e atividade das proteínas desacopladoras (UCP1) assim como da proteína quinase B (AKT1) nos grupos denervados e nefrectomizados. Também foi observada uma elevação da atividade e expressão do substrato de receptores de insulina (IRS1) no grupo nefrectomizado.

Os rins podem ser responsáveis por até 20% do total de energia consumida pelos indivíduos em repouso. Com o declínio da filtração glomerular, observa-se uma progressiva redução da massa magra nos portadores de doença renal crônica, associada a uma redução das necessidades e do consumo calórico basal (Panesar e Agarwal, 2003). Este quadro ainda não está completamente esclarecido, pois inicialmente pensava-se que a uremia levaria a um estado de anorexia, com isso o organismo adaptaria sua demanda de energia com a redução na ingestão de alimentos. Recentemente, porém, a caquexia urêmica é tida como consequência de um estado inflamatório generalizado tendo como agente principal a secreção de leptina pelo tecido adiposo e sua ação central, em núcleos relacionados à saciedade no hipotálamo lateral e paraventricular. Com o declínio da filtração glomerular, o *clearance* da leptina sérica estaria comprometido, elevando a concentração plasmática desta citocina. Sua ação central através dos receptores melanocórticotróficos, em especial no núcleo ventromedial, inibiria a ingestão alimentar (Mak *et al.*, 2006).

Os rins, portanto, quando lesados, promovem, aparentemente, um desequilíbrio no balanço de energia de todo o organismo, afetando inclusive as reservas estocadas sob outra forma que não os tecidos adiposos. Porém, surpreendentemente, as consequências

deste desarranjo homeostático na temperatura interna ainda não foram completamente estudadas, nem a magnitude destes efeitos demonstrada de uma forma clara.

Quando são observadas as figuras relativas às curvas térmicas, é possível notar uma clara diferença entre os animais tratados (Nx e Dx) e os controles (íntegro e simulado). Esta evidência foi confirmada pela análise estatística entre os grupos controles e os demais grupos experimentais dos principais parâmetros estudados, temperatura inicial e final, declividade da curva e área sobre a curva térmica. Embora os resultados tenham sido obtidos com um desenho metodológico relativamente simples, elaborações teóricas apresentadas nos resultados e no Apêndice 1, para a estimativa do ganho térmico, ganho calorimétrico total (área sobre a curva) e contribuição térmica renal, mostraram previsões muito próximas dos valores obtidos experimentalmente nas principais características dos gráficos tais como, temperatura inicial e final, inclinação e área sobre a curva.

No presente modelo, a temperatura final representou a não transferência do calor gerado pelo metabolismo durante o tempo da experiência. Esta energia térmica adicionada, quando convertida em calorias por hora ou calculada através da área sobre a curva, é o exato valor da TMB (normalmente calculada por outros métodos calorimétricos, como por exemplo, o consumo de oxigênio). O *slope* ou inclinação da reta representou, indiretamente, o quão rápida estava a atividade metabólica.

Ao analisar os diferentes grupos experimentais, o presente estudo mostrou que a ablação parcial do rim com comprovada redução da funcionalidade promoveu uma evidente redução na geração calórica com temperaturas basais significativamente inferiores aos demais grupos experimentais.

Aventou-se a hipótese de que a análise destes resultados, obtidos pelas curvas térmicas, pode inferir o impacto da atividade funcional renal sobre a homeostase corporal.

A produção calórica aferida em 30 minutos pela área sob a curva mostrou, por outro lado, que apesar da redução do metabolismo renal, outros mecanismos compensatórios estão ativados. Reflexo disto, foram os valores encontrados na análise da temperatura final deste grupo que foi inferior apenas ao grupo Dx. Quando analisados em

conjunto com os resultados observados para a expressão de UCP1, IRS1 e AKT, estes sugerem que o aumento da expressão e fosforilação destes produtos após a nefrectomia 5/6 levam a: a) uma atividade compensatória termogênica de caráter facultativo (*non shivering*); b) que essa produção calórica é dependente da captura celular de glicose; c) que esses mecanismos agregados objetivam a produção de calor para a recomposição térmica corporal. Esta sequência de eventos confirma os resultados de Cannon e Nedegaard (2002) quando mostraram em seus resultados um elevado *clearance* de glicose durante a atividade da UCP1 na gordura marrom.

Interessante notar, entretanto, que a ativação das vias metabólicas pós-receptores induzidos pela insulina não se deva, no presente estudo, a uma dieta excessiva, mas sim, à redução da filtração glomerular e excreção de catabólitos.

Observando agora os animais submetidos à denervação renal bilateral, foi evidenciado que suas curvas térmicas apresentaram temperaturas iniciais e finais maiores que aquelas observadas nos demais grupos. Com esses resultados foi inferido que, ao bloquear a sinalização aferente e eferente renal e sua interação com o sistema nervoso central, interromperam-se vias que possivelmente exerciam uma modulação sobre áreas termorreguladoras do SNC, modificando a atividade simpática renal. Assim como a atividade neurosensorial renal foi modificada, o rim como órgão termosensor pode ter sido afetado. Desse modo, os resultados podem sugerir que os rins tenham uma atividade frenadora ou inibitória sobre áreas termogênicas centrais, e sua descontinuidade permitiria uma rápida e acentuada elevação térmica corporal.

Esta menor ação inibitória sobre os núcleos hipotálamicos elevou a atividade adrenérgica ao nível dos receptores β_3 nas células que compõem o tecido adiposo marrom.

No presente estudo esta possível interação foi bloqueada quando os animais foram tratados com β -bloqueadores adrenérgicos por três dias, nos grupos denervados. Nestes animais a maior produção calórica registrada no grupo Dx foi significativamente atenuada.

Esta resposta termogênica em termos calóricos foi de intensidade proporcional a aquela teórica calculada, tendo em vista a contribuição dos rins para o metabolismo basal (Apendice1).

Finalmente, o grupo Ox mostrou um padrão de resposta diante dos experimentos, semelhante ao dos dois grupos controles: Simulado e Íntegro. Neste grupo submetido a disfunção renal aguda e reversível, esta não foi suficiente para interferir na manutenção da temperatura corporal e nem de ativar o sistema homeostático térmico ao nível do SNC.

As alterações térmicas causadas pelas lesões renais agudas ou crônicas não se refletiram no funcionamento da cadeia respiratória e na eficiência da síntese de ATP.

A análise gráfica, registrada pelo oxímetro de Clark, comparando as inclinações das fases III e IV não revelou alterações no consumo de oxigênio quando comparadas aos grupos controles. A eficiência deste processo, medida pela razão ADP/O, também não se revelou diferente dos controles.

Estes dados contrastam, em parte, com outro estudo envolvendo a termogênese obrigatória e aclimação de animais, que demonstram uma redução no consumo de oxigênio em mitocôndrias renais (Puranan *et al.*, 1984). Uma explicação para este fato poderia ser explicado pelo uso de mitocôndrias hepáticas, que representam melhor o metabolismo basal em razão da distribuição uniforme das mitocôndrias no tecido, além de reforçar o rim como importante fonte térmica (Else, 1985).

As principais dificuldades técnicas do trabalho foram, em primeiro lugar, a montagem do protocolo das curvas. Diversos modelos foram testados em mais de uma centena de experimentos, para então encomendar, sob medida, a manufatura do banho com a gaiola acoplada e o termômetro com a precisão desejada. Em segundo lugar, dada a combinação das técnicas: cirúrgicas, banhos, *imunoblotting* e consumo de oxigênio em cinco grupos de animais; foi necessário um total mínimo de 75 experimentos válidos necessários à conclusão da tese. Embora elevado e suficiente para a estatística, um n de 5 para cada grupo poderá não ser suficiente para uma validação de técnica de mensuração de

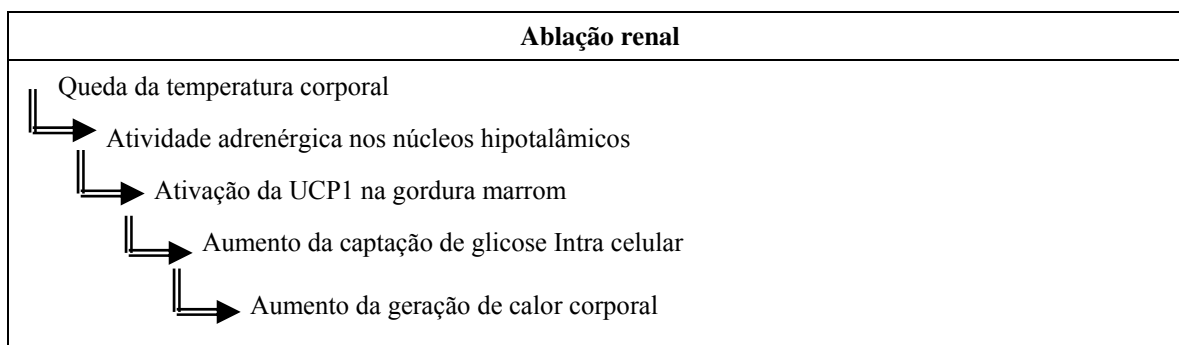
função renal através da temperatura. Medições posteriores com uma amostragem maior deverão ser realizadas.

Com relação às perspectivas, o presente trabalho indicou a hipótese de que o rim pode estar envolvido na homeostase térmica corporal. Devido às suas funções, particularmente as que envolvem o transporte transmembrana de íons e sódio em grande quantidade diariamente, e sendo esta função ligada à hidrólise de ATPs (Seguro *et al.*, 2000), o rim deve ser considerado como potencial fonte geradora de calor. Este calor gerado contribui efetivamente para a composição da temperatura corporal (10%) (Brundin e Warren, 1994). No entanto, supõe-se que esta contribuição só não é maior pela existência de mecanismos que, ou “isolam” o rim tal qual a gordura retroperitoneal ou dissipam este calor através do complexo sistema anatômico renal que como um “radiador” entremeia uma rede vascular com sistema de fluxo intratubular de fluidos de alto fluxo, criando condições para a realização de um *clearance* de calor.

Modulando este sistema homeostático, tanto como sensor como quanto efetor apresenta-se o sistema neural do rim. Próximos esforços deverão centrar esforços na comprovação dessas hipóteses.

No Quadro 1, uma breve seqüência dos principais eventos estudados e encadeados como causa e efeito.

Quadro 1- Representa a cadeia de eventos que se segue após a ablação renal, segundo os resultados obtidos no presente estudo



6- CONCLUSÃO

Os animais nefrectomizados parcialmente (5/6) apresentaram médias térmicas inferiores a todos os demais grupos e significativamente em relação aos animais denervados.

O bloqueio da transferência de calor para o meio externo, pela imersão em água termoneutra foi significativamente afetado nos animais denervados, mas não nos outros grupos. A denervação renal bilateral promoveu um maior ganho térmico corporal com temperaturas finais mais elevadas, bem como uma maior rapidez para atingir estas temperaturas.

A denervação renal, de modo semelhante à nefrectomia 5/6 promoveu uma elevação da atividade das proteínas desacopladoras mitocondriais localizadas na gordura marrom.

A elevação térmica adicional em animais denervados renais foi significativamente atenuada pelo tratamento prévio destes com β -bloqueadores.

A ativação da UCP1 observada no presente estudo após a lesão renal, está associada à ativação de uma via intracelular responsável pela maior captação celular de glicose e estímulo à glicólise.

O presente estudo não foi capaz de demonstrar modificações relacionadas à termogênese obrigatória, uma vez que tanto o consumo de oxigênio quanto a eficiência da cadeia respiratória não foram comprometidos pela denervação ou ablação parcial dos rins.

O presente estudo mostra que a ablação parcial renal pode estar envolvida numa menor contribuição renal deste órgão para a manutenção da temperatura corporal basal. No entanto, essa ablação não prejudica a capacidade termogênica total do organismo.

As experiências também indicam a participação neurosensorial renal na modulação da homeostase térmica do organismo, assim como um aumento reflexo da atividade aferente ao sistema nervoso central que contribuiria para a manutenção, por intermédio da termogênese facultativa, da temperatura corporal basal.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison TG, Reger WE. Comparison of responses of men to immersion in circulating water at 40.0 and 41.5 degrees C. *Aviat Space Environ Med* 1998. 69(9):845-50.
- Barney CC, Smith GL, Folkerts MM. Thermal dehydration-induced thirst in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999. 276(5Pt2):R1302-10.
- Bigazzi R, Kogosov E, Campese VM. Altered norepinephrine turnover in the brain of rats with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1994. 4(11):1901-10.
- Bigazzi R, Kogosov E, Campese VM. Altered norepinephrine turnover in the brown fat of rats with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1994. 4(11):1896-900.
- Borsook H, Winegarden HM. The energy cost of the excretion of urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1931. 17(1):13-28.
- Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3. *Diabetes* 2000. 49:143-56.
- Brand MD. The contribution of the leak of protons across the mitochondrial inner membrane to standard metabolic rate. *J Theor Biol* 1990. 145(2):267-86.
- Brown CG. Control of respiration and atp synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* 1994. 284(Pt 1):1-13.
- Brown CG, Rolfe D. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997. 77(3):731-58.
- Brown JE, Thomas S, Digby JE, Dunmore SJ. Glucose induces and leptin decreases expression of uncoupling protein-2 mRNA in human islets. *FEBS Lett* 2002. 513(2-3):189-92.
- Brundin T, Wahren J. Renal oxygen consumption, thermogenesis, and amino acid utilization during iv infusion of amino acids in man. *Am J Physiol* 1994. 267(5 Pt 1):E648-E55.
- Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3. *Diabetes* 2000. 49:143-56.
- Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *Am J Physiol* 1998. 274 (5 Pt 2):R1376-R86.

Cannon B, Nedegaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004. 84:277-359.

Charkoudian N. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it was, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc* 2003. 78(5):603-12.

Chen CF, Chien CT, Wu MS, Fu TC. Role of renal nerves on renal functional change after back heating in the rat. *Neurosci Lett* 1994. 174(2):154-6.

Chernogubova E, Cannon B, Bengtsson T. Norepinephrine Increases Glucose Transport in Brown Adipocytes via β 3-Adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-Kinase-Dependent Pathway Stimulating Conventional and Novel PKCs. *Endocrinology* 2004. 145(1):269-80.

Dibona N. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol* 2000. 279:R1517-R24.

Dobbins RL, Szcpaniak LS, Zhang W, McGarry JD. Chemical sympathectomy alters regulation of body weight during prolonged ICV leptin infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003. 284(4):E778-87.

Erlanson-Albertsson CE. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand* 2003. 178(4):405-12.

Else PL, Hulbert AJ. Mammals: an allometric study of metabolism at tissue and mitochondrial level. *Am J Physiol* 1985. 248(4 pt 2):R415-21.

Epstein M, Norsk P, Loutzenhiser R. Effects of water immersion on atrial natriuretic peptide release in humans. *Am J Nephrol* 1985. (9):1-24.

Even PC, Rolland V, Roseau S, Bouthegourd J, Tome D. Prediction of basal metabolism from organ size in the rat: relationship to strain, feeding, age and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001. 280(6):R1887-R96.

Faber F, Garby L. Fat content affects heat capacity: a study in mice. *Acta Physiol Scand* 1995. 53(2):185-7.

Fasshauer KJ, Benito M, Khan CR. Insulin and the beta3-adrenoceptor differentially regulate uncoupling protein-1 expression. *Mol Endocrinol* 2000. 14(6):764-73.

- Feil S, Rafael J. Effect of acclimation temperature on the concentration of uncoupling protein and GDP binding in rat brown fat mitochondria. *Eur J Biochem* 1994.219(1-2): 681-90.
- Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, Velloso LA. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 2003. 552(Pt1):149-62.
- Gontijo JA, Kopp U. Renal sensory receptor activation by calcitonin gene-related peptide. *Hypertension* 1994. 23(6):1063-67.
- Gontijo JA, Kopp UC. Activation of renal pelvic chemoreceptors in rats: role of calcitonin gene-related peptide receptors. *Acta Physiol Scand* 1999. 166(2):159-65.
- Gornall AG, Hunter A. A colorimetric method for the determination of citrulline. *Biochem J* 1941. . 5(5-6):650-8.
- Guerra G, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Bruning J, Kozak LP, Khan CR, Benito M. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 2001. 108(8):1205-13.
- Hagen JH. Cellular thermogenesis. *Annu Rev Physiol* 1976. 38:315-51.
- Hampl R, Starka L, Jansk L. Steroids and thermogenesis. *Physiol Res* 2006. 55(2):123-31.
- Harris DA, Das AM. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J* 1991. 280(Pt 3):561-73.
- Havenit HG. Individualized model of human thermoregulation for the simulation of heat stress response. *J Appl Physiol* 2001. 90:1943-54.
- Hervey GR. Regulation of energy balance. *Nature* 1967. 222:629-631.
- Hope A, Aanderud L, Aakvaag A. Dehydration and body fluid-regulating hormones during swing warm (38 degrees C) fresh-and seawater immersion. *J Appl Physiol* 2001. 91(4):1529-34.
- Huang WC, Fang TC, Cheng JT. Renal denervation prevents and reverses hyperinsulinemia-induced hypertension in rats. *Hypertension* 1998. 32(2):249-54.

- Hulbert AJ, Else PL. Mechanism underlying the cost of living in animals. *Annu Rev Physiol* 2000. 62:207-35.
- Inbar I, Chayoth R, Cassuto Y. Energy metabolism in kidney of heat-acclimated hamsters. *Am J Physiol* 1975. 229(5):1234-6.
- Kenju M, Yoshiaki H, Keizo S. Role of cardiac-renal neural reflex in regulating sodium excretion during water immersion in conscious dogs. *J Physiol* 2002. 545(1):305-12.
- Kenney MJ, Pickar JG, Weiss ML, Saindon CS, Fels RJ. Effects of midbrain and spinal cord transections on sympathetic nerve responses to heating. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 2000. 278:R1329-R38.
- Kenney MJ, Musch TI, Weiss ML. Renal sympathetic nerve reulation to heating is altered in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001. 280:H2868-H75.
- Kim KH, Kim Y, Park HW, Jeong HJ, Mauer M. A re-evaluation of renal ablation of progressive renal disease in rats. *J Nephrol* 2003. 16:196-202.
- Kluger MJ, VanDeKerkhove KM, Eiger SM, Port FK. Enhanced thermolability in anephric rabbits. *Am J Kidney Dis* 1987. 10(2):89-91.
- Kobayashi A, Osaka T, Namba Y, Inoue S, Lee TH, Kimura S. Capsaicin aactivates heat loss and heat production simultaneously and independent in rats. *Am J Physiol* 1998. 275(1Pt2):R92-8.
- Kurnic BR, Weisberg LS, Kurnic PB. Renal and systemic oxygen consupcion in pacientes with normal and abnormal renal function. *J Am Soc Nephrol* 1992. 2(11):1617-26.
- Liu L, Barajas L. The rat renal nerves during development. *Anat Embryol (Berl)* 1993. 188(4):345-61.
- Lutaif NA, Yu L, Abdulkader RC. Factors influencing the non-recovery of renal function after the relief of urinary tract obstruction in women with cancer of cervix. *Ren Fail* 2003. 25(2):215-23.
- Mak RH, Cheung W, Cone RD, Marks DL. Leptin and inflammation-associated cachexia in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2006;69(5):794-7.

- Masset MP, Lewis SJ, Stauss HM, Kregel KC. Vascular reactivity and baroreflex function during hyperthermia in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000. 279(4):R1282-R9.
- Maw GJ, MacKenzie IL, Taylor NA. Human body-fluid distribution during exercise in hot, temperate and cool environments *Acta Physiol Scand* 1998. 163(3):297-302.
- Meis L. Energy Interconversion by the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase: ATP hydrolysis, Ca^{2+} transport, ATP synthesis and heat production. *An Acad Bras Cienc* 2000. 72(3):365-379.
- Miki K, Hayashida Y, Sagawa S, Shiraki K. Renal sympathetic nerve activity and natriuresis during water immersion in conscious dogs. *Am J Physiol* 1989. 256(2 Pt 2):r299-305.
- Minson CT. Hypoxic regulation of blood flow in humans. Skin blood flow and temperature regulation. *Adv Exp Med Biol* 2003. 543:249-62.
- Nakamitsu S, Sagawa S, Miki K, Wada F, Nagaya K, Keil LC, Drummer C, Gerzer R, Greenleaf JE, Hong SK, et al. Effect of water temperature on diuresis-natriuresis: AVP, ANP, and urodilatin during immersion in men. *J Appl Physiol* 1994. 77(4):1919-25.
- Olson JL, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM, Venkatachalam MA. Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. *Kidney Int* 1982. 22(2):112-26.
- Panesar A, Agarwal R. Resting energy expenditure in chronic kidney disease: relation with glomerular filtration rate. *Clin Nephrol* 2003. 59(5):360-6.
- Park KS, Choi JK, Park YS. Cardiovascular regulation during water immersion. *Appl Human Sci* 1999. 18(6):233-41.
- Peristein PH. Thermoregulation. *Pediatr Ann* 1995. 24(10):531-7.
- Porte D Jr, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz S, Schwartz MW. Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 1998. 41(8):863-81.
- Puranam RS, Shivaswamy V, Ramasarma T. Oxidations in kidney mitochondria of heat-exposed rats: regulation by cytochrome c. *J Bioenerg Biomembr* 1984. 16(5-6):421-31.

- Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 2000. 529(1):3-10.
- Rothwell NJ, Stock MJ. Insulin and thermogenesis. *Int J Obes* 1998. 12(2):92-102.
- Rowell LB, Brengelmann GL, Blackmon JR, Murray JA. Redistribution of blood flow during sustained high skin temperature in resting man. *J Appl Physiol* 1970. 28:415-20.
- Sadowski J, Kruk B, Chwalbinska-Moneta J. Renal function changes during preoptic-anterior hypothalamus heating in the rabbit. *Pflugers Arch* 1997. 370(1):51-7.
- Sahu A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 2004. 145(6):2613-20.
- Satinoff E. Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science* 1978. 201:16-22.
- Schneider WC, Hogeboon GH. Intracellular distribution of succinoxidase and cytochrome oxidase activities in normal mouse liver and in mouse hepatoma. *J Natl Cancer Inst* 1950. 10(4):969-75.
- Seagrave R. Energy balances in closed systems in Biomedical application of heat and mass transfers. Ames (Iowa): The Iowa Associated Press, 1973.
- Seguro AC, Magaldi AJ, Helou CM, Malnic CG, Zatz R. Processamento de água e eletrólitos pelos túbulos renais. In: Zatz R, editor. *Fisiopatologia Renal*. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p.71-96.
- Shibata HS, Perusse F, Bukowiecki L. The role of insulin in nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol* 1987. 65(2):152-8.
- Singer MA. Of mice and men and elephants: metabolic rate sets glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2001. 37(1):164-78.
- Spiegelman BM, Flierj S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001. 104(4):531-43.
- Sramek P, Simeckova M, Jansky L, Savlikova J, Vybiral S. Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. *Eur Appl Physiol* 2000. 81(5):436-42.

Tsai TJ, Chen CF. Effects of heat therapy on renal hemodynamics, compensatory hypertrophy and glomerulonephritis in rats. *Nephron* 1993. 63(2):207-13.

Webb P. The physiology of heat regulation. *Am J Physiol* 1995. 258(4):R838-R50.

Wigglesworth J. Energy requirements and energy expenditure. In: *Energy and Life*. London (UK): Taylor & Francis, 1994. Chapter 2, p.15-29.

Young CC, Sladen RN. Temperature monitoring. *Int Anesthesiol Clin* 1994. 34(3):149-74.

Xavier F, Magalhaes AM, Gontijo JA. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on blood pressure and renal sodium handling in renal denervated rats. *Braz J Med Biol Res* 2000. 33(3):347-54.

8- APÊNDICES

APÊNDICE 1

Para confirmar os valores obtidos experimentalmente, foi utilizada uma variante da primeira lei da termodinâmica, adaptada por Seagrave:

$$M + \Delta M + T = Q - W \quad (1)$$

Onde:

M = Taxa de metabolismo basal

ΔM = Ganho metabólico da dieta

T = Taxa de variação da energia térmica interna

Q = Taxa de calor transferido ao ambiente

- W = Trabalho realizado sobre o sistema externo

Após o isolamento térmico proporcionado pela imersão em água quente e em jejum e repouso, os valores serão:

$$\Delta M = 0$$

$$- W = 0$$

$$Q = 0$$

E a equação (1) pode se reescrita como:

$$M \cdot \dot{T} + \dot{Q} = 0 + 0$$

ou

$$\dot{T} = - \dot{Q} / M$$

Uma vez que procuramos a taxa de variação da temperatura em função do tempo (dT/dt) e sendo a taxa de variação da energia térmica (calor) igual a: massa x capacidade calorífica x dT/dt, o resultado será:

$$m C dT/dt = - \dot{Q} \quad [2]$$

Onde:

m = massa do rato ~ 0,225 (Kg)

C = capacidade calorífica do rato Sprague dowley ~ 0,83 (Cal/Kg°C) (Faber e Garby, 1995)

M = taxa do metabolismo basal do rato de 225 gramas: 0,96 (Cal/hour) (68)

E reescrevendo a equação [2] com os novos valores:

$$dT/dt = 0,96(\text{Cal/hour}) / 0,83(\text{Cal/Kg}^\circ\text{C}) \cdot 0,25(\text{Kg})$$

$$dT/dt = 5,28(^\circ\text{C/hour})^*.$$

* Portanto, como os experimentos foram realizados em 30 minutos, devemos dividir por 2 a taxa, assim em 30 minutos serão acrescidos 2,64 graus a temperatura inicial dos ratos.

APÊNDICE 2

RENAL CONTRIBUTION TO RATS'S BODY TEMPERATURE:

RENAL INNERVATION FUNCTION

Running title: Temperature and Renal

Nelson Afonso Lutaif ¹, Eduardo Melani Rocha ², Licio Augusto Veloso ¹, José Antonio Rocha Gontijo ¹

¹ Department of Clinical Medicine, Campinas State University , Campinas, SP, Brazil ² Department of Ophthalmology², Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Word count:

Abstract word count:

Supported by: FAPESP, CNPq

Corresponding author:

Nelson Afonso Lutaif, MD

Adress:

Brazil

E-mail: n840824dac.unicamp.br

Abstract

Introduction: To investigate the kidney action on heat exchange and the effects on signaling mechanisms and respiratory chain we associated the passive heat model after three renal injuries: (Nx5/6)I mass reduction, (Dx) denervatio and (Ox) urinary tract obstruction; and two controls groups: sham and non operative (Non). **Methods:** rats were immersed in warm water to avoid temperature dissipation and rectal temperature recorded. Thermal curves and the following signaling elements involved in thermogenesis and metabolism UCP1, IRS-1, AKT and PI3K were compared in brown adipose tissue (BAT). In addition the mitochondria respiratory chain was evaluated in those groups. **Results:** Thermal curve: *Initial temperature:* Nx group presented significant lower temperature than Dx group: $36,14 \pm 0,8083$ °C x $37,51 \pm 0,9601$ °C ($p < 0,05$). *Final temperature:* Dx group presented significant higher temperature than Sham, Nx, and Ox groups. Dx Group: $40,38 \pm 1,04$ °C; Sham group: $39,09 \pm 0,21$ °C; Nx group: $36,14 \pm 0,8083$ °C and Ox group: $37,22 \pm 0,4338$ °C ($p < 0,05$). *Slope:* Dx group presented significant higher values than: Sham, Non and Ox: groups. Dx group: $0,05836 \pm 0,007683$; Sham group: $0,04238 \pm 0,006312$; Integrity group: $0,05182 \pm 0,005546$ and Ox group: $0,04516 \pm 0,005107$ ($p < 0,05$). *Area Under Curve:* Nx group presented significant higher values than Dx, Ox Sham and Non: Nx group: $45,22 \pm 4,622$; Dx group: $57,05 \pm 17,82$; Ox group: $35,61 \pm 7,792$; Sham group: $41,03 \pm 3,06$; Non group: $39,82 \pm 5,848$ ($p > 0,001$). These results infer that renal injuries affected the thermoregulation, by less contribution of renal thermic activity in maintenance of rat's body temperature. Additionally the experimental results were predicted with good agreement by theory model.

Keywords: Temperature; Renal injuries; Passive heating

Introduction

Previous works observed that kidney play a role in thermogenesis and nephrectomized rabbits have more thermo liability, lower deep temperature and lower tolerance to heat than normal animals.(1, 2).

More recently, it was founded that sub total renal mass ablation induces sympathetic nervous system modulation of ventromedial hypothalamic (VMH) nuclei and in brown adipose tissue (BAT), which are involved in thermogenesis (3, 4).

Global Thermogenesis (GT) is constituted by facultative (FT) and obligatory (metabolic) thermogenesis (OT)(5). FT in rodents has the principal source of heat generation by activation of brow adipose tissue, increasing the uncoupled protein 1 (UCP1) activities (5-7). Two main physiological processes are involved with FT. The defense of body temperature and the control of inefficiency of metabolic thermo genesis (OT) (6). In a recent work it was detected a linkage between FT and activation of UCP1 and IRS1 after cold stimulation (8).

The OT is mostly related with the mainitence of osmotic gradient among matrix and internal membrane of mitochondria witch is formed by respiratory chain and oxidative phosphorylation.(6,8-11).

We hypothesize that renal injuries can reduce thermogenesis and that may affect BAT metabolism through insulin and UCP 1 signaling and mitochondrial respiratory chain.

In order to prove the thermo liability originated by renal thermic function reduction, we performed three models of renal injuries in rodents: chronic, denervation and acute followed by temperature curve evaluation, blocking the heat dissipation in warm water. In addition, we investigated the impact pf these events in the expression of UCP1 and insulin signaling pathways in BAT and finally we evaluated mitochondrial oxygen consumption in those models.

Methods

Animals:

Sprague Dawley rats aging 6 weeks and mena weight of 200g, were used in experiments. All animal were obtained from University of Campinas Central Animal Breeding and housed under standard conditions and feed with standard rodent chow and water *ad libitum*.

Procedures involving animals were conducted in strict accordance with the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication no. 85-23) and were approved by local Research Ethics committee. All surgical procedures are made in ambient room with controlled air temperature

Experimental groups:

Renal 5/6 mass reduction or Group (Nx) (N=5):

Renal mass reduction is a model widely used of chronic renal insufficiency who is associate a progressive glomerular sclerosis and gradually declining of glomerular filtration rate(12). In summary, after given anesthesia with Ketamine and Romprum (1,5ml/100g) i.p., two incisions were made at right and left flanks. The right kidney was removed but preserving adrenal gland. Both poles from the left kidney were excised. The size of remniscent kidney was obligatory smaller than the two poles added. The rats were used for experiment one week after nephrectomy.

Renal denervation or Group (Dx)(N=5):

The renal denervation procedure was made as follow: after given anesthesia, surgical bilateral renal dernervation was performed with aid of stereomicroscope by cutting all visible nerves along the renal artery. So, the renal vessels were wrapped with cotton previously soaked in 10% (v/v) phenol diluted with absolute ethanol. The rats were also used one week after the surgery.

Obstruction at lower urinary tract or Group (Ox)(N=5):

The third model assume that acute obstruction of posterior urethra occlude totally the urine elimination and developing an inflammatory process in renal medulla after few hours(16). Surgical obstruction was done by tying a 2-zero silk ligature around the urethra. In this group, the experiments were performed 2 hours after the surgical procedures.

Sham group (Sham) (n=5):

Was performed with the same surgical steps of renal denervation except that integrity of renal system was preserved. The rats were also used one week after the surgery.

Non operative (Non)(n=5):

No surgical techniques were applied and the rats were submitted to the same set of following experiments.

Passive heating:

This model of passive heating was previously described and its mathematical description is detailed in Appendix (13). Briefly, after immersing in warm water whose temperature was about 37,3 °C (as the same as rectal temperature), the heat dissipation was blocked based on thermal isolation. The body temperature was registered with a thermometer with sensitivity of centesimal part of Celsius degree (IOPE, São Paulo, Brazil). Under this condition, the progressive elevation in basal temperature reflected the intensity of global thermogenesis. Comparisons of thermal curves from treated groups and control groups were performed.

Thermal Curves:

Seven days after the surgical procedure for chronic kidney injuries (*Nx 5/6*, *Dx* and *Sham*) or thirty minutes of intervention on *Ox* group and also in *Non* group the water immersion protocol was applied using a water bath (Bioetica, São Paulo, Brasil). To avoid excessive movements during the water bath, rats were mildly restrained during the experiments, with bracelets around the neck and abdomen. The thermal probe (Havard, Boston, USA) was maintained 5cm in the rectum. The colonic temperature was measure

and then the animals were anesthetized with i.p. injection of the same way of surgical processes. Confirmed that the internal temperature was not altered by sedation. The water bath temperature was adjusted to equalize the internal temperature of the rat, in order to obtain a closed system with thermal isolation. As predicted, unable to dissipate heat, the colonic temperature slowly rised, reflecting the heat generated by basal metabolism (13). The colonic temperature was recorded every minute for thirty minutes and the data of all groups were plotted in a graphic to compare the following parameters: initial and final temperature, slope and area under curve.

Immunobloting:

After seven days of the surgical kidney procedures, animals of all groups were euthanized by cervical dislocation. The brown adipose tissue was excised by cervical incisions and immediately homogenized using a Polytron PTA 20S homogenizer (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, local, pais), operated at maximum speed for 30 seconds in 10 volumes of solubilization homogenization buffer at 4°C consisted of 1% Triton X-100, 50mM, Hepes(pH 7,4), 100mM sodium pirophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10mM EDTA, 2mM PSMF 9 (Sigma; St Louis, Missouri, USA), 10mM sodium orthovanate and 0,1mg/ml of aprotinin (Bayer, São Paulo, Brazil). The extracts were centrifuged at 11 000g in a Jouan MR 18 22 rotor (Fabricante, local, pais) a 4°C for 20 minutes to remove a insoluble material. Protein quantification was performed using the biuret dye method (Labtest; Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) and equal amounts of protein were used for immunoprecipitation with 10µl of following antibodies: Anti-IR1, Anti-ERS2, Anti-MAPk, Anti-UCP1and anti-ERK (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA). The immune complex were precipitated with protein A-Sparse 6 MB (Pharmacia; Uppsala, Sweden) and then washed three times with 50mM Tris (ph 7,4) containing 2 mM sodium orthovanato and 0,1% Triton X-100. After washing , the pellet was resuspended in Laemmli sample buffer containing 100 dithithreitol and then heated in a boiling water bath for 5 min. The samples were allocated in 12% poliacylamide gel in a miniature slab gel apparatus along with pre stained protein standards (Santa Cruz , Ca, USA).

Electrotransfer of proteins from the gel to Hybond ECL nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham; UK) was performed for 2 hours at 120v with addition of 0,02% SDS and beta-mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described (14).

Non specific protein binding to nitrocellulose was reduced incubating the membrane for 2 hours at 22° C, with blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10mm tris, 150mm NaCl and 0,025 tween 20). After, the nitrocellulose membrane was incubated for overnight in a cold camera with antiphosphotyrosine antibody (0,5µg/ml), diluted in blocking buffer (3% non-fat dry milk). After washing with blocking buffer without milk for three times, it was incubated with secondary polyclonal antibody anti IgG (1,25µg) (Sigma ; St. Louis Missouri, USA)- diluted in 10ml of blocking buffer without milk for 2 hours at 22°C. Washed it again and then incubated with 2µCi of [¹²⁵ I]-Protein A (30µCi/µg) (Amersham; UK), in 10 ml of blocking buffer (1% non-fat dry milk) and followed by final wash. It was stored with radiograph film (Kodak XAR) at -70° for 36-170hs. Images from radiograph film were scanned (Hewlet-Packard ScanJet 5p) into PaintNet (Washington University, USA) on DELL latitude 110L PC and band intensities were quantified by optical densitometry with Scion Image software

Respiratory control: Preparation of Rat Liver Mitochondria to measure oxygen consume

Mitochondria were obtained from animal of describe groups after 7 days of and prepared) by homogenizing the livers in solution of cold sucrose/Hepes/EGTA solution (250 mM sucrose, 10 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 1 mM EGTA) and centrifuging the homogenate at 480 g for 5 min. The supernatant was centrifuged at 9,750 g for 10 min. The resulting mitochondrial pellet was resuspended to the original volume and resedimented three times, again at 9,750 × g for 10 min. Finally the pellet was suspended in medium containing 250 mM sucrose and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.2, to give a 40-50 mg/ml suspension. The protein concentration of the final suspension was determined by the biuret method in the presence of 0.2% colato.

Measurements of Oxygen Uptake -- Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) in 1.3 mL of standard incubation medium (25°C) containing 125 mM Suc, 65 mM KCl, 10 mM Hepes,

pH 7.4, 0.33 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, and 2.5 mM KH₂PO₄, with 0.4 to 0.5 mg of mitochondrial protein.

For respiratory control ratio (RCR) analysis, mitochondria were diluted in reaction buffer with 5 μ M rotenone as the oxidizable substrate and 7 mM succinate (except when stated respiration was analyzed before the addition of succinate). The measurements were performed in the presence of 2.5 μ g oligomycin mL⁻¹ incubation medium. After recording respiration, 150 μ M ADP was added to induce state 3 respiration. The rate of oxygen consumption was calculated from the recorder tracing and is expressed as nmol atomic oxygen per min per mg of protein. The oxygen consumed by mitochondria under State respiration is used to drive both ATP synthesis and proton leakage across the mitochondrial membrane. In this context, the efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation (P/O ratio) represents the balance between the rates of ATP synthesis and proton leak, implying that, when total mitochondrial State 3 respiration is altered, efficiency can only be preserved if ATP turnover and proton leak are affected in a similar way.

Statistics:

We utilized Graphpad 4.0 software, Prism, San Diego, CA,USA) to evaluate continuous datas by ANOVA method and Bonferroni *post hoc* test when significance value ($p < 0,05$) was founded.

Results

Thermal Curves:

The values are showed in Table 1. The initial temperature was lower in Nx5/6 group when compared with Dx group. ($p < 0,05$). The final temperature was higher in Dx group when compared with: Nx, Ox and Sham. ($p < 0,05$). The slope of thermal curve was significantly higher among Dx group and Sham, Ox, Non and Nx group ($p < 0,001$). Area under curve (AUC) in Group Nx was significantly higher then others ($p > 0,001$), meaning the higher thermic gain and activation of compensatory thermogenesis.

Immuno Blotting:

The data are representative of two independent experiments.

- 1) Anti bodies against UCP1 phosphospecific lipids. Groups Dx and Nx showed higher statistical significance when it compared with all remaining groups ($p<0,05$);
- 2) Anti bodies against Erk 1,2 phosphospecific lipids. No statistical differences were observed among the groups;
- 3) Anti bodies against AKT phosphospecific lipids. Groups Dx and Nx showed higher statistical significance when it compared with all remaining groups ($p<0,05$);
- 4) Anti bodies against PI3K phosphoespecif lipids. No statistical differences were observed;
- 5) Anti bodies against IRS 1 phosphospecific lipids. Group Nx showed higher statistical significance when it compared with all remaining groups ($p<0,05$).

Respiratory Control:

The data are representative of three independent experiments. There was no difference on mitochondrial oxygen consume from oxidative phosforilation in all groups) $P= ???$ (Figure 5).

No statistical difrence was observed on values of among oxygen consume and ATP production (ADP/O ratio) (Figure 6).

Discussion

The present work show evidences that renal injuries can promote a significant alteration in global thermo genesis. First of all, it was demonstrated that kidney injury lead to increased internal temperature in the passive heating by water immersion assay.

The experiment has a theory background, described in appendix, which was combined with a good agreement with the experimental values. The discrepancy among real measure and theory prediction, based in normal group results, can be credit to influence of several factors: small quantity of animals, anesthetics and weight variation.

Despite of heating, water temperature does not influences renal sympathetic activities except in extremely conditions (15,16). At contrary, the immersion, promotes a central hypervolemia and increases strongly the diureses by neuro-humoral agents stimulated by aortic baroreceptors.(17,18,19). When we performed renal denervation, both effects were blocked (19). More, apparently we cut off some renal thermostatic information who could act in set point of thermo regulation placed in central nervous system. This can be explained analyzing first the final temperature that was higher when it was compared with others groups. Somehow, denervation produced information that internal temperature, at least in kidneys, was low starting the responses of the regulatory agents doing the increases the beta adrenergic and ucp1 activities in brown adipose tissue. So, when they were immersed in warm water the FT was activated and the thermic gain was high. Similarly, the group Nx modulated the set point of thermo regulation too. In this case, associated with the renal fibers injury, we produced a sub total mass reduction which could reduced the thermic effect of renal thermogenesis and consequently observation of initial temperature lower than group Dx. In spite of lower initial temperature, the thermo genesis was activated and it has explicated first by the values of area under curve and the slope which were representing a accelerated thermic gain during the experiment and second by the activation of UCP1 in BAT. We have tried to study the biologically active lipids that serve as intracellular signaling factors. The activation of UCP demands energy supplies and cells from BAT increases glucose capitation when suffer sympathetic stimulus. Although controversial, Cannon and Nedegaard (23), suggest that the glucose capitation were made by insulin path ways, specifically by activation of: IRS1-PI3K-AKT1. So, we demonstrated at least part of it through the western blot experiments. They presented activation of IRS1 and AKT associated with UCP1 activation. We not able to confirm over expression activation of PI3K associated UCP1 activation, confirming the difficult observed in other studies to achieve a consensus about this point (24,25,26). Concluding, we utilized a model of passive heating with a relative success when it was utilized to register the alteration in faculty

thermogenesis associated with renal injuries. This activation had to be secondary of less renal thermic contribution to maintenance of internal temperature though sympathetic of BAT. When we investigated the efficiency of the oxidative fosforilation it was founded that renal injuries not modify the efficiency of ATP synthesis neither oxygen consume from mitochondria hepatocytes, excluding alterations in obligatory thermogenesis.

References

1. Kluger MJ, VanDeKerkhove KM, Eiger SM, Port FK..Enhanced thermolability in anephric rabbits.Am J Kidney Dis. 1987 Aug;10(2):89-91.
2. Brundin T, Wahren J. Renal oxygen consumption, thermogenesis, and amino acid utilization during i.v. infusion of amino acids in man.Am J Physiol. 1994 Nov;267(5 Pt 1):E648-55.
3. Bigazzi R, Kogosov E, Campese VM..Altered norepinephrine turnover in the brain of rats with chronic renal failure.J Am Soc Nephrol. 1994 May;4(11):1901-7.
4. Bigazzi R, Kogosov E, Campese VM. Altered norepinephrine turnover in the brown fat of rats with chronic renal failure.J Am Soc Nephrol. 1994 May;4(11):1896-900.
5. Cannon B, Needegaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance.Physiol Rev. 2004 Jan;84(1):277-359.
6. Argyropoulos G, harper MH. Molecular biology of thermoregulation.Invited review: uncoupling proteins and thermoregulation. J Appl Physiol 92: 2187-2198, 2001.
7. Albertsson CE. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. Acta physiol Scand. 178:405-412, 2003.
8. Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, Velloso LA. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in Rattus norvegicus. J Physiol. 2003 Oct 1;552(Pt 1):149-62.
9. Brown GC,, Rolfe D. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. Physiological Reviews. 77(3):731-758, 1997.
10. Hulbert AJ, Else PL. Mechanism underlying the cost of living in animals. Annu Rev Physiol.62:207-235.2000.
11. Hagen JH. Cellular thermogenesis. Annu Rev Physiol. 38.:315-351,1976.
12. Olson JL, Hosteter TH, Rennke HG, Brenner BM, Venkatachalam MA. Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. Kidney International 22:112-126,1982.

13. Seagrave R. Energy balances in closed systems ,chapter three in Biomedical applicationo fhet and mass transfers, The Iowa associated press, Ames, Iowa, 1973.
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J.Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4350-4.
15. Sramek P, Simeckova M, Jansky L, Savlikova J, Vybiral S. Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. Eur Appl phsysiol. 81(5):436-42.
16. Nakamitsu S, Sagawa S, Miki K, Wada F, Nagaya K, Keil LC, Drummer C, Gerzer R, Greenleaf JE, Hong SK, et al.Effect of water temperature on diuresis-natriuresis: AVP, ANP, and urodilatin during immersion in men J Appl Physiol. 1994 Oct;77(4):1919-25.
17. Park KS, Choi JK, Park YS.Cardiovascular regulation during water immersion. Appl Human Sci. 1999 Nov;18(6):233-41.
18. Epstein M, Norsk P, Loutzenhisier R. Effects of water immersion on atrial natriuretic peptide release in humans. Am J Nephrol (9):1-24,1989.
19. Miki K, Hayashida Y, Sagawa S, Shiraki K. Renal sympathetic nerve activity and natriuresis during water immersion in consius dogs. Am J Physiol. 256(2 pt 2): r299-305.
20. Cannon B. Nedegaard J. Brow adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev, 84:277-359, 2004.
21. Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance Clin Biochem Rev. 2005 May; 26(2): 19–39.
22. Farese RV. Insulin-Sensitive Phospholipid Signaling Systems and Glucose Transport. Update II .Experimental Biology and Medicine 226:283-295 (2001).
23. Klein J, Fasshauer M, Benito M and C. , Kahn R. Insulin and the $\beta 3$ -Adrenoceptor Differentially Regulate Uncoupling Protein-1 Expression Molecular Endocrinology 14 (6):764-773.

24. Faber F, Garby L. Fat content affects heat capacity : a study in mice. *Acta Physiol Scand* 53(2):185-7, 1995
25. Singer MA. Of mice and men and elephants: metabolic rate sets glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis.* 37(1):164-178, 2001.

Appendix

To confirm that the present phenomenon fits in a mathematical model, we utilized the first law of thermodynamic modify by Seagrave to living systems:

$$\dot{M} + \Delta \dot{M} + \dot{T} = \dot{Q} - \dot{W} \quad (1)$$

Where:

$\dot{M}$ = Basal metabolic rate

$\Delta \dot{M}$ = Diet

$\dot{T}$ = Mean body temperature or average temperature of the system

$\dot{Q}$ = Heat transferred from system to ambient

$\dot{W}$ = Work done by the system

After immersion in warm water, in rest and withdraw food, we can infered:

$$\Delta \dot{M} = 0$$

$$- \dot{W} = 0$$

$$\dot{Q} = 0$$

and the equation (1) can be written as:

$$\dot{M} + 0 + \dot{T} = 0 + 0$$

or

$$\dot{T} = - \dot{M}$$

or

$$m C dT/dt = - \dot{M} [2]$$

Where:

$$m = \text{rat mass} \sim 0,225 \text{ (Kg)}$$

$$C = \text{rat heat capacity} \sim 0,83 \text{ (Cal/Kg}^\circ\text{C)} \text{ (24)}$$

$$M = \text{rat metabolic rater } 0,96 \text{ (Cal/hour)} \text{ (25)}$$

And rewriting equation [2] with the values:

$$dT/dt = 0,96 \text{ (Cal/hour)} / 0,83 \text{ (Cal/Kg}^\circ\text{C)} \cdot 0,25 \text{ (Kg)}$$

$$dT/dt = 5,28 \text{ (}^\circ\text{C/hour)}^*$$

** The experiments took 30 minutes , so the increase in initial temperature will be $\sim 2,64^\circ\text{C}$*

Graphics and Tables

Thermic gain

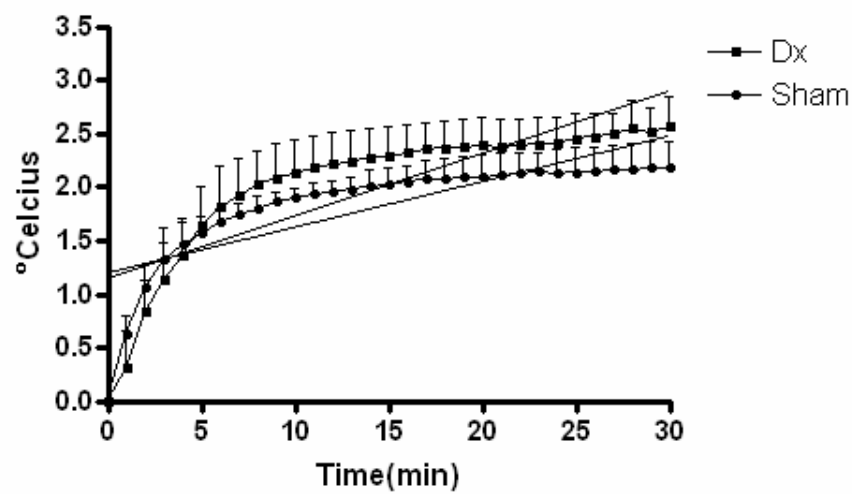


Figure 1

Thermic gain

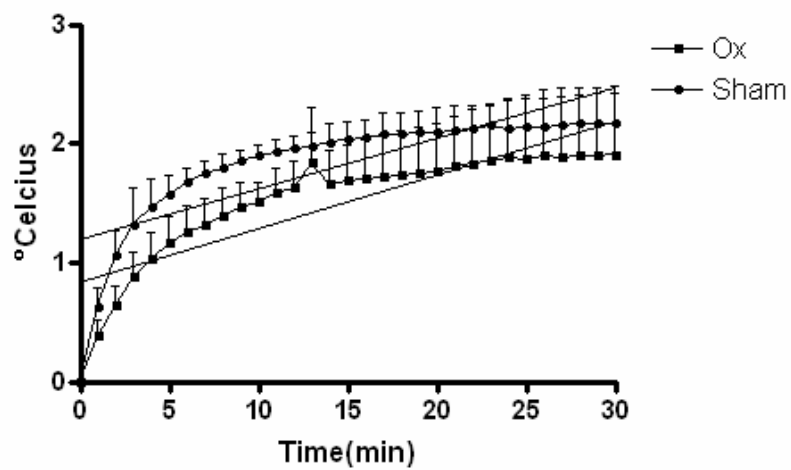


Figure 2

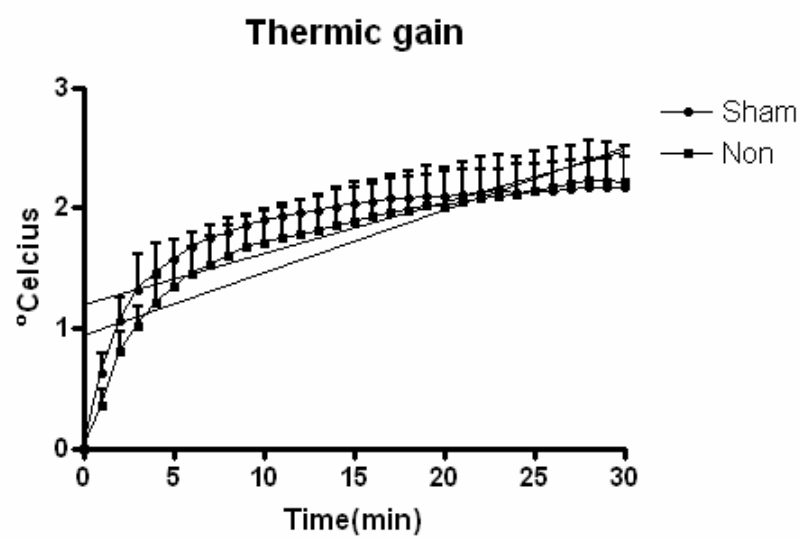


Figure 3

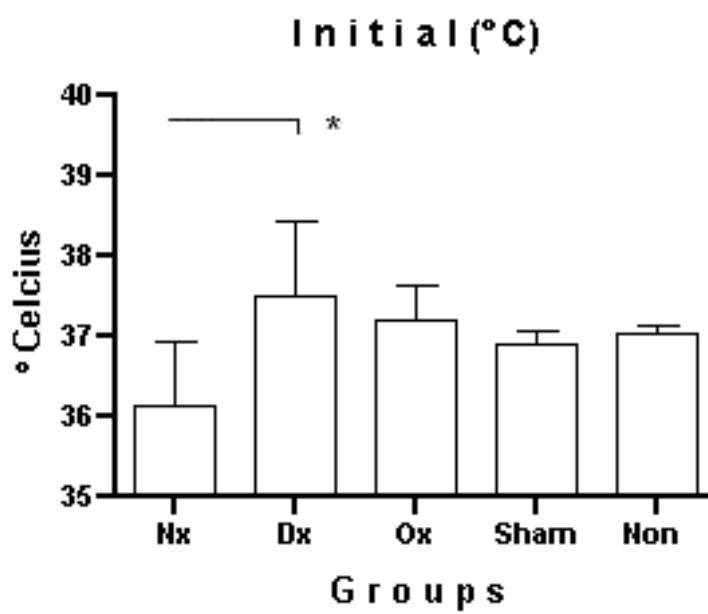


Figure 4

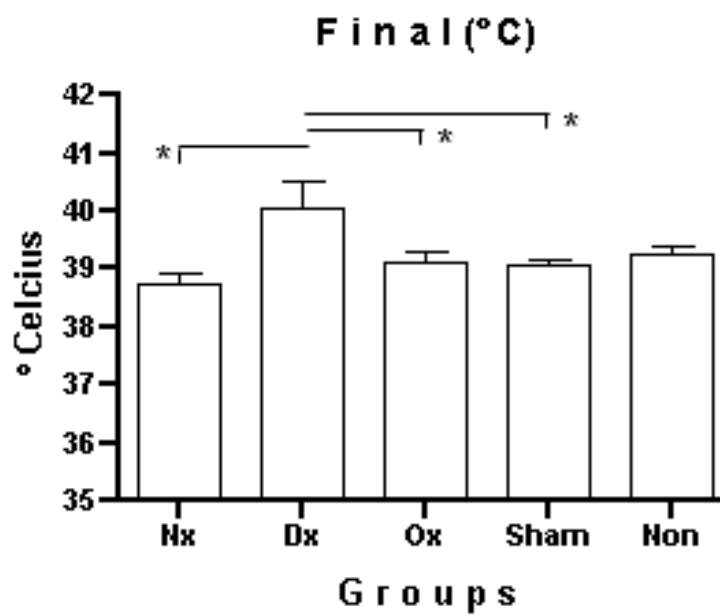


Figure 5

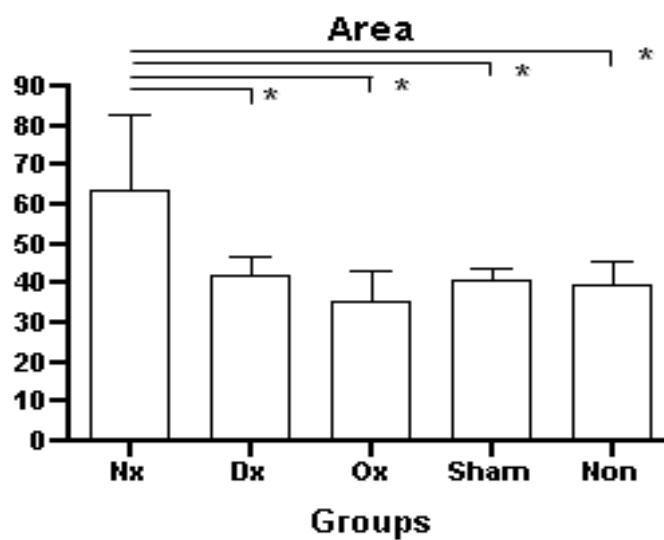


Figure 6

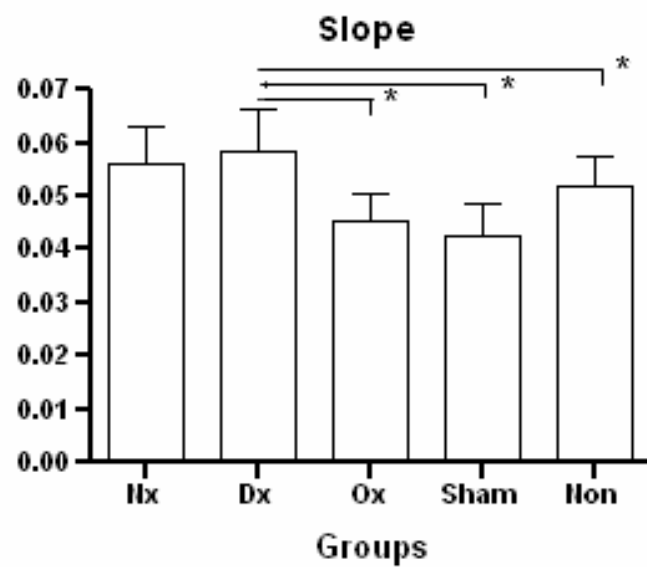


Figure 7

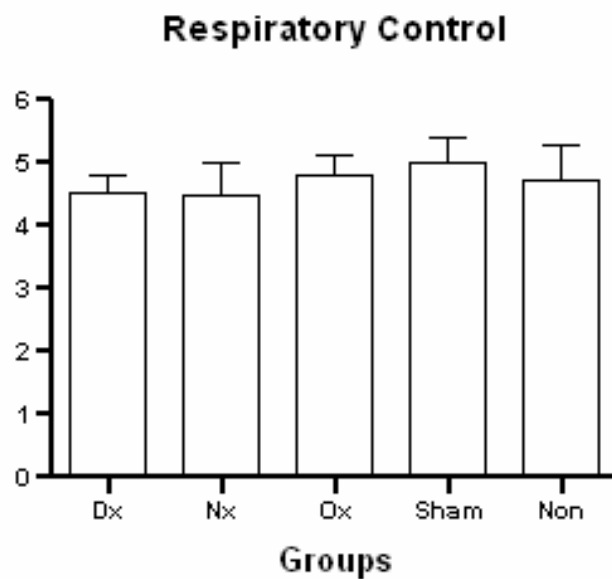


Figure 8

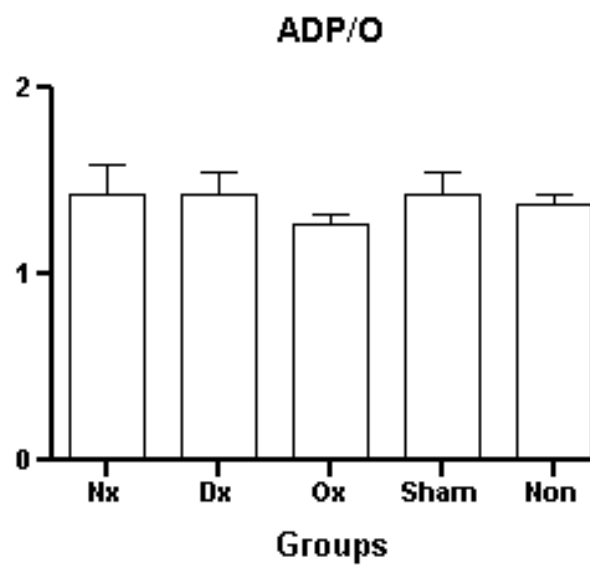


Figure 9

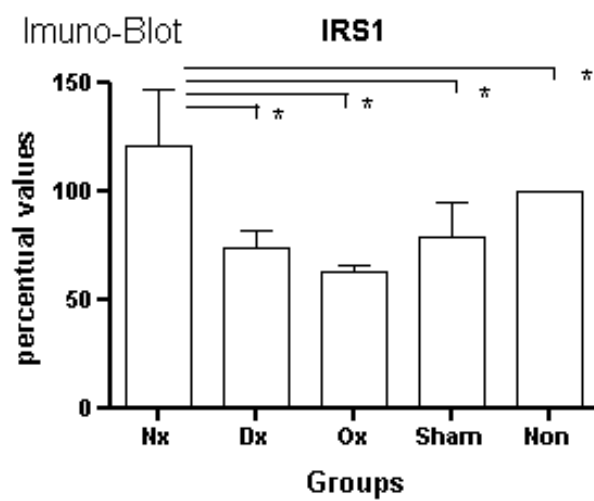
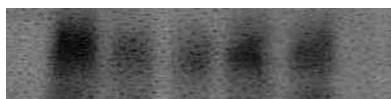


Figure 10

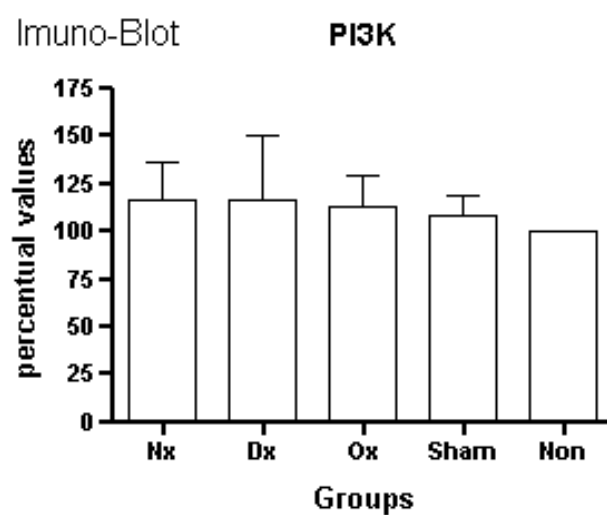
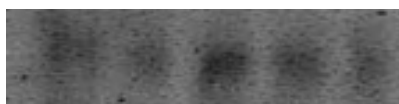


Figure 11

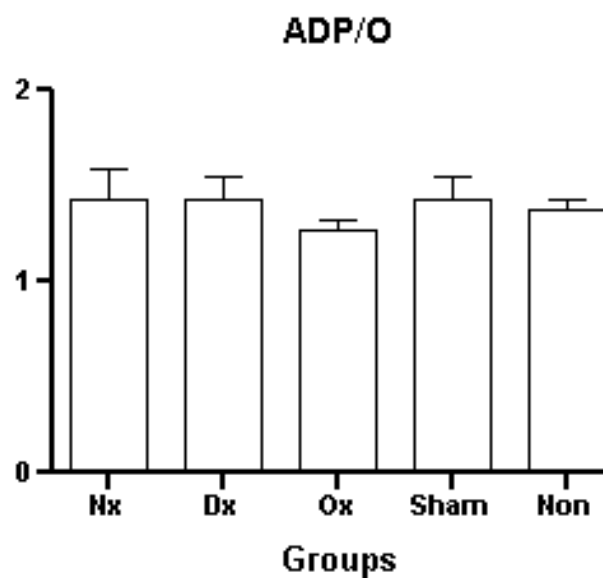


Figure 12

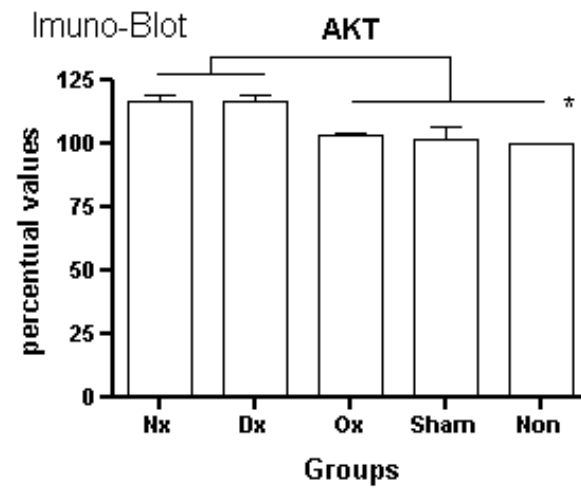


Figure 13

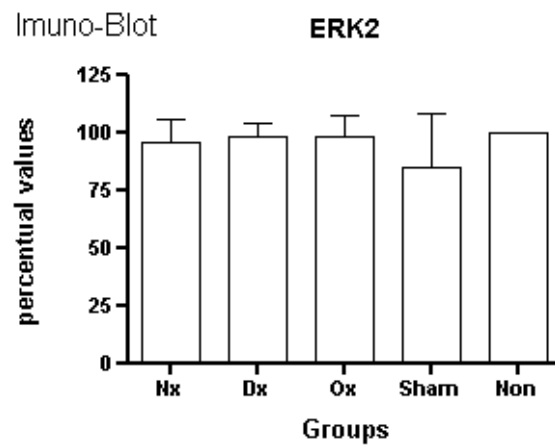


Figure 14

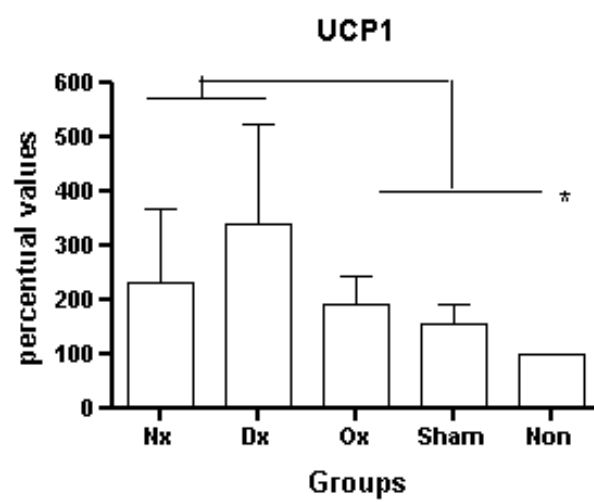
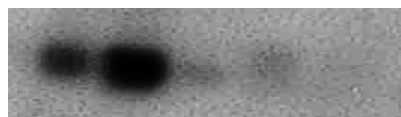


Figure 15

Table 1

	Normal	Sham	Nx	Dx	Ox
T inicial	37,05 ± 0,1106	36,92 ± 0,1641	36,14 ± 0,8083	37,51 ± 0,9601	37,22 ± 0,4338
T final	39,25 ± 0,35	39,09 ± 0,21	38,74 ± 0,56	40,38 ± 1,04	39,13 ± 0,40
Slope	0,05182 ±	0,04238±	0,05613 ±	0,05836 ±	0,04516 ±
	0,005546	0,006312	0,006858	0,007683	0,005107
Área	39,82 ± 5,848	41,03 ± 3,06	63,96 ± 13,8	45,22 ± 4,622	35,61 ± 7,792

LEGENDS

Figure 1:

Thermal curve from Group Dx and Sham. Chronic renal injury producing disconnection among sympathetic renal nerve activity and central nervous system. The graphic represents the increase in initial temperature after immersion in warm water (thermic gain). The lines represent the media from each group and included additionally: standard deviation and slope.

Figure 2:

Thermal curve from Groups Nx and Sham.

Figure 3:

Thermal curve from Groups Ox and Sham.

Figure 4:

Thermal curve from Groups Non and Sham.

Figure 5:

Initial temperature. Values (media + SD), registred before immersion in warm water. * denotes statistical relevance ($p < 0,05$)

Figure 6:

Final temperature. Values (media + SD), registered after thirty minutes immersed in warm water. * denotes high statistical relevance ($p < 0,005$)

Figure 7:

Values (media +SD) from area under curve Calculated from thermic gain graphhics.* denotes high statistical relevance ($p < 0,001$)

Figure 8:

Values (media +SD) from slope. Obtained from thermic gain curves.* denotes high statistical relevance ($p < 0,005$)

Figure 9:

Respiratory control. Values from oxygen consume in hepatic mitochondria . Obtained throughly clark oximeter register of phase 3 and 4 . No statistical differences were observed among the groups.

Fig 10:

ADP/O relation Inefficiency indict of respiratory chain and ATP production. No statistical dirences were observed among the groups

Figure 11:

Representative autoradiography from IRS1 specific antibody. * denotes statistical relevance($p < 0,05$)

Figure 12:

Representative autoradiography from PI3K specific antibody

Figure 13:

Representative autoradiography from AKT specific antibody. * denotes statistical relevance ($p < 0,05$)

Figure 14:

Representative autoradiography from Erk 1,2 specific antibody

Figure 15:

Representative autoradiography. After incubating immunoblots with a phosphospecific UCP1 kinase antibody. * denotes statistical relevance ($p < 0,05$)

Table 1:

All medias and standard deviation extracted from thermal curves.