Projeto de Iniciação Científica submetido para avaliação no Edital: 01/2022

**Título do projeto:** Espectroscopia vibracional no estudo e caracterização de vesículas extracelulares em doença renal aguda.

**Palavras-chave do projeto:** vesículas extracelulares; espectroscopia; síndrome cardiorrenal

**Área do conhecimento do projeto:** Processos de Transformação

**Sumário**

[1. Resumo](#_heading=h.30j0zll) 3

[2. Introdução](#_heading=h.1fob9te) 4

2.1. Síndrome Cardiorrenal 4

2.2. Vesículas extracelulares em doenças renais 5

2.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 5

2.4. Espectroscopia vibracional na caracterização de EVs 6

[3. Objetivos](#_heading=h.3znysh7) 7

3.1. Objetivos gerais 7

3.2. Objetivos específicos 7

[4. Metodologia](#_heading=h.2et92p0) 7

4.1. Modelo animal de isquemia e reperfusão renal 7

4.1.1. Protocolo de indução da lesão renal por isquemia e reperfusão renal 7

4.2. Isolamento das EVs 8

4.3. Caracterização das EVs 8

4.3.1. Análise dos dados 9

[5. Viabilidade](#_heading=h.tyjcwt) 9

[6. Cronograma de atividades](#_heading=h.3dy6vkm) 9

Referências Bibliográficas10

# 

# 

# 

# 

# 

# 

# 

# 

# **1. Resumo**

Doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte em pacientes com doença renal aguda e crônica. Desta forma, a relação entre disfunção cardíaca e renal tem sido bem estudada por mais de um século, onde essa interação órgão-órgão leva à definição bem conhecida de síndrome cardiorrenal (SCR). Diversos estudos se empenharam em caracterizar a fisiopatologia da SCR do tipo 3, ou síndrome renocárdica aguda, na qual a lesão renal aguda (LRA) leva à disfunção cardíaca aguda. Consequentemente, é sabido que a síndrome cardiorrenal gera quadros inflamatórios sistêmicos e que vesículas extracelulares podem estar envolvidas na comunicação patológica entre os rins e o coração. Portanto, as EVs presentes no plasma podem ter papéis significativos em doenças renais, bem como biomarcadores da própria SCR, os fatores de risco para o desenvolvimento de complicações, bem como os fatores de reparo ou proteção que difundem sinais de estresse prejudiciais e, finalmente, seus fatores terapêuticos, sendo parte do problema e parte da solução. Sabendo-se, assim, que estudos detalhados sobre o conteúdo das EVs na SRC são escassos, o uso de ferramentas de precisão para detecção de novos biomarcadores, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de identificá-los em tempo real com o menor custo possível, se faz necessário. Desta forma, estudos recentes também mostraram que a quantificação de proteínas baseada em espectroscopia de IR pode ser adaptada com sucesso à prática experimental para analisar EVs. Assim, o presente estudo visa realizar, através do modelo de isquemia e reperfusão renal (I/R), unilateral, por 60 minutos, seguido de 8 dias de reperfusão renal em camundongos C57BL/6 machos, o isolamento e caracterização das vesículas presentes nos soros dos animais isquemiados e não isquemiados utilizando Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), bem como as análises dos espectros por Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise de Cluster (CLA).

# 

# 

# **2. Introdução e Justificativa**

**2.1. Síndrome Cardiorrenal**

Doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte em pacientes com doença renal aguda e crônica (Di Lullo et al., 2017). Desta forma, a relação entre disfunção cardíaca e renal tem sido bem estudada por mais de um século (Uduman, 2018), onde essa interação órgão-órgão leva à definição bem conhecida de síndrome cardiorrenal (SCR) (Di Lullo et al., 2017).

O *cross-talk* patológico entre o coração e os rins através da inflamação sistêmica (Caio-Silva et al., 2020), ou seja, a síndrome cardiorrenal (SRC), é caracterizado por um estado em que a terapia para aliviar os sintomas de insuficiência cardíaca congestiva é limitada pela piora da função renal, onde, da mesma forma, foi demonstrado de forma convincente que a função renal prejudicada, ou a piora da função renal, no cenário de insuficiência cardíaca descompensada aguda, pressagia um prognóstico significativamente pior (Ronco et al., 2008).

Sendo assim, um sistema de classificação formal para SCR foi proposto em uma Conferência de Consenso pelo *Acute Dialysis Quality Initiative Group* em 2008 (Ronco et al., 2009). Essa classificação primeiro divide a SCR em dois grupos principais: síndrome cardiorrenal (tipos 1 e 2) e síndrome renocárdica (tipos 3 e 4), com base em qual disfunção é primária versus secundária, bem como a classificação é subdividida ainda para denotar se a disfunção primária é aguda (tipos 1 e 3) ou crônica (tipos 2 e 4) no início. Finalmente, a SCR tipo 5 descreve uma doença sistêmica, como diabetes mellitus ou sepse, que resulta em disfunção cardíaca e renal simultaneamente (Di Lullo et al., 2019).

De forma específica, existem diversos estudos que se empenharam em caracterizar a fisiopatologia da SCR do tipo 3, ou síndrome renocárdica aguda, na qual a lesão renal aguda (LRA) leva à disfunção cardíaca aguda, como estudos que demonstraram que a isquemia/reperfusão renal (IR) é capaz de promover hipertrofia cardíaca após 15 dias de reperfusão com contribuição de citocinas inflamatórias e dependente da presença dos receptores Toll-Like 2 e 4 (Cirino-Silva et al., 2017; Trentin-Sonoda et al., 2015; Trentin-Sonoda et al., 2019; Panico et al., 2019), bem como foi observado que alterações eletrofisiológicas e sinalização inflamatória estão presentes em tempos mais curtos de reperfusão, após 8 dias, comprovado por alterações nos intervalos Qt e QTc (Alarcon et al., 2019). Além disso, demonstrou-se que a resposta hipertrófica do cardiomiócito *in vitro*, após estímulo do TLR4, seja por LPS (PAMP) ou por HSP 60 (DAMP), é dependente da sinalização do sistema complemento através da via da CamKII delta B/NF-KB (Junho et al., 2019). Da mesma forma, visando caracterizar o estresse oxidativo na síndrome cardiorrenal tipo 3 induzida por IR, evidenciou-se que esse evento ocorre de maneiras distintas nos rins e coração (Caio-Silva et al., 2020). De forma complementar, recentemente, o grupo também demonstrou que há contribuição da disfunção mitocondrial no modelo de síndrome cardiorrenal tipo 3 (SCR3) por IR, assim como a proteção exercida pela vitamina C em ambos os órgãos (Neres-Santos et al., 2021).

Concomitantemente, é sabido que a síndrome cardiorrenal gera quadros inflamatórios sistêmicos e que vesículas extracelulares podem estar envolvidas na comunicação patológica entre os rins e o coração (Virzì et al., 2019; Di Lullo et al., 2019).

**2.2. Vesículas extracelulares em doenças renais**

As vesículas extracelulares (EVs) representam um grupo heterogêneo de vesículas derivadas de células ativadas ou geradas durante a apoptose de quase todas as células de mamíferos (Erdbrügger et al., 2016). Assim, pequenas bolhas ou vesículas membranosas são liberadas da superfície da maioria das células como resultado de uma variedade de processos biológicos, onde as menores vesículas extracelulares, chamadas de exossomos, são formadas pela fusão de corpos multivesiculares intracelulares (também conhecidos como endossomos tardios) com a membrana plasmática, levando à liberação de seu conteúdo vesicular no espaço extracelular (Karpman et al., 2017).

Desta forma, o interesse em vesículas extracelulares cresceu exponencialmente na última década, principalmente entre pesquisadores em nefrologia, tendo-se em vista que as EVs foram inicialmente pensadas como artefatos ou poeira celular, mas há evidências acumuladas de seu importante papel como mensageiros para sinalização e comunicação celular em estados normais e de doença, onde as mesmas podem funcionar na transferência de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e representam um novo tipo de biomarcador (Erdbrügger et al., 2016).

Concomitantemente, pesquisadores em nefrologia detectaram EVs em vários fluidos corporais, incluindo urina e sangue, onde, como estas EVs carregam marcadores da célula-mãe, subpopulações específicas de EV, como vesículas derivadas de células endoteliais, células imunes ou células específicas do rim, como podócitos, podem ser determinadas (Erdbrügger et al., 2016). Portanto, as EVs presentes no plasma podem ter papéis significativos em doenças renais, bem como biomarcadores da própria SCR, os fatores de risco para o desenvolvimento de complicações, bem como os fatores de reparo ou proteção que difundem sinais de estresse prejudiciais e, finalmente, seus fatores terapêuticos, sendo parte do problema e parte da solução (Georgatzakou et al., 2020).

Desta forma, tendo-se em vista que as tecnologias avançadas para avaliação de EVs ainda estão evoluindo, a compreensão de sua biologia, desde a biogênese até os efeitos finais nas células receptoras, é de fundamental importância para revelar sua relevância clínica para as doenças renais (Georgatzakou et al., 2020) e, concomitantemente, para a SCR do tipo 3.

**2.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

As espectroscopias de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Raman estão sendo amplamente investigadas por sua capacidade de fornecer informações essenciais sobre a composição e conformação estrutural de espécies moleculares específicas (Balan et al., 2019), bem como de seu potencial de serem traduzidas para a pesquisa clínica, no estabelecimento de diagnósticos, bem como em técnicas forenses quando seus espectros são combinados com análise de dados (Cameron et al., 2018), através da combinação de técnicas quimiométricas tradicionais somadas às análises estatísticas próprias às análises de FTIR (Huang et al., 2020).

Sendo assim, tendo por princípio o tipo de interação das ligações químicas de uma amostra com a radiação de uma fonte de luz para gerar uma impressão digital de assinatura na forma de um espectro, a espectroscopia de infravermelho (IR) fornece informações estruturais em análises qualitativas e quantitativas de praticamente qualquer composto com base na simetria da molécula (Balan et al., 2019). As principais regiões de interesse biológico dos espectros de infravermelho são, geralmente, os picos da amida I/II e a região da impressão digital (do inglês “*fingerprint*”) em 900-1900 cm⁻¹ (Cameron et al., 2018). Desta forma, qualquer alteração nos sistemas biológicos induzida por uma condição patológica produz mudanças estruturais e funcionais significativas que são refletidas diretamente dentro dessas regiões dos espectros vibracionais (Balan et al., 2019).

**2.4. Espectroscopia vibracional na caracterização de EVs**

Sabendo-se que estudos detalhados sobre o conteúdo das EVs na SRC são escassos, o uso de ferramentas de precisão para detecção de novos biomarcadores, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de identificá-los em tempo real com o menor custo possível, se faz necessário. Desta forma, de acordo com Azevedo et al. (2021), estudos recentes também mostraram que a quantificação de proteínas baseada em espectroscopia de IR pode ser adaptada com sucesso à prática experimental para analisar EVs.

Agnieszka et al., (2022) descrevem que a análise das assinaturas espectrais por Raman, por exemplo, de vesículas extracelulares urinárias (UEVs) representa um método confiável e preciso para a estratificação de pacientes com doença renal crônica, possibilitando avaliar a eficácia de tratamentos farmacológicos no futuro. Os autores ainda apresentam que a boa correlação entre o perfil bioquímico Raman de UEVs e a Taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) sugere que o método proposto pode ser usado para estimativa não invasiva da filtração glomerular em pacientes com diabetes tipo 2 em vários estágios da DRC (Agnieszka et al., 2022), demonstrando que a espectroscopia vibracional pode encontrar sua aplicação clínica no futuro para monitorar a progressão da doença.

Portanto, o presente projeto tem por objetivo a caracterização de vesículas extracelulares (EVs) produzidas num quadro de lesão renal isquêmica em modelo animal, utilizando a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) como ferramenta para a detecção de assinaturas biológicas presentes nas EVs.

# **3. Objetivos**

**3.1. Objetivo geral**

Detectar assinaturas biológicas próprias das vesículas extracelulares (EVs) produzidas no quadro de lesão renal isquêmica aguda em modelo animal, utilizando a espectroscopia vibracional.

**3.2. Objetivos específicos**

* Extrair e isolar as EVs do soro, após a isquemia e reperfusão renal (I/R);
* Utilizar a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) como ferramenta para a detecção de assinaturas biológicas presentes nas EVs.

# **4. Metodologia**

# **4.1. Modelo animal de isquemia e reperfusão renal**

# Os experimentos serão realizados de acordo com a lei federal no 6638, de 1979, que regulamenta o emprego de animais em experimentação científica, sob o protocolo 9019180122 da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do ABC. Serão utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando entre 20 e 28g. Todos os animais serão acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, à temperatura ambiente constante de 25°C, com suplemento de água e alimento disponível o tempo todo.

**4.1.1. Protocolo de indução da lesão renal por isquemia e reperfusão renal**

O protocolo experimental para indução de insuficiência renal será efetuado dentro do projeto de uma das doutorandas do laboratório, sendo conforme o descrito por Feitoza et al. (2008) devido a eficiência do modelo e sobrevivência dos animais. Os animais serão submetidos à anestesia com xilazina e ketamina (Agribands do Brasil Ltda, São Paulo) por via intraperitoneal (IP), na dose de 0,004 mg/g de peso, em dose única. O pedículo renal esquerdo de cada animal será ocluído com clipe microvascular (DL Micof, São Paulo) por 60 minutos unilateralmente. Os animais serão mantidos em aquecimento por iluminação indireta até completa recuperação da anestesia.

Os animais serão divididos nos seguintes grupos:

- Grupo Sham (sem oclusão do pedículo renal, apenas procedimento cirúrgico),

- Grupo IR 8 dias de reperfusão.

Os estudos anteriores do laboratório indicaram que o *time point* de 8 dias de reperfusão renal apresenta alterações inflamatórias e cardíacas agudas proeminentes, concluindo-se que as alterações já conhecidas nos rins e coração ocorram durante esse período. Sendo assim, para caracterizar e isolar as EVs, esse mesmo *time point* será utilizado, justificando a existência apenas do grupo IR 8 dias.

Após o período de reperfusão, os camundongos serão pesados e submetidos à eutanásia para a coleta do coração, rins, tíbia e soro. Os rins, coração e tíbia serão utilizados para obtenção dos padrões morfométricos renal e cardíaco, visando validar macroscopicamente as alterações renais e cardíacas, após a IR: razão peso do coração/peso corpóreo (mg/g), razão peso do coração/comprimento da tíbia (mg/cm), razão peso rim esquerdo ou direito/peso corpóreo (mg/g) e razão rim esquerdo ou direito/comprimento da tíbia (mg/cm).

**4.2. Isolamento das EVs**

Para o isolamento das EVS provenientes do soro, serão realizadas duas centrifugações de 3000 xg por 15 minutos a 4ºC, com a finalidade de remover células (hemácias, leucócitos e plaquetas), e uma centrifugação de 10000 xg por 30 minutos a 4ºC, com a intenção de remover os debris celulares. Após a preparação, as amostras de soro serão armazenadas a -80ºC para a realização do protocolo de isolamento das EVs. As EVs serão isoladas de acordo com as recomendações do kit Total Exosomes Isolation Reagent, TEIR (from serum) (Thermo Fisher Scientific), conforme descrito a seguir:

As amostras de soro serão descongeladas a 25ºC em banho-maria até adquirirem o aspecto líquido. Em seguida, 20 uL de TEIR serão adicionados a 100 uL de amostra de soro, misturadas no vórtex até a formação de um aspecto de névoa e incubadas entre 2 a 8ºC durante 30 minutos. As amostras serão centrifugadas a 10000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Encerrada a centrifugação, os sobrenadantes serão descartados e os pellets ressuspensos em 50 uL de PBS 1x. Os exossomos isolados serão armazenados a -80 ºC até as análises seguintes

**4.3. Caracterização das EVs**

Todas as análises no FTIR serão orientadas e interpretadas com o auxílio e colaboração de um dos professores da UFABC, o Prof. Dr. Herculano Martinho da Silva, que atua no desenvolvimento de aplicações tecnológicas das técnicas de espectroscopia vibracional na área de biópsia óptica. O espectroscópio instalado na Central Experimental Multiusuário da Universidade Federal do ABC (UFABC), FT-IR 660 – Varian Inc. será utilizado para aquisição dos dados espectrais.

Para análise, as amostras de soro, contendo as EVs, serão descongeladas à temperatura ambiente em sala de cultura de células utilizando-se fluxo laminar a fim de evitar contaminações por agentes dispersos no ar (poeira, microorganismos, etc). Neste mesmo ambiente, alíquotas de 1 mL de biofluidos serão coletadas para os experimentos no FTIR, sendo que o processo de secagem das microgotas do biomaterial a ser estudado por biópsia líquida é uma etapa importante, podendo impactar diretamente na exatidão da classificação espectral das amostras em estudo. O processo potencialmente ótimo para obtenção do biofilme de soro seco envolve depositar a alíquota em substrato plano, homogêneo, em ambiente com alta umidade relativa (> 70%) (Pisitkun et al., 2004).

**4.3.1. Análise dos dados**

Os espectros serão obtidos sob os parâmetros de aquisição de: *background* de 50 escaneamentos, número de varreduras de 50 escaneamentos e resolução de 4 cm-1. Sendo a medida realizada por reflexão total atenuada (ATR). Todos os espectros serão pré-processados ​​para se tornarem comparáveis ​​por análise estatística. A linha de base será corrigida usando o método de ajuste de curva polinomial de mínimos quadrados conforme descrito por Lieber & Mahadevan-Jansen (2003). Todos os espectros serão normalizados usando a escala de Pareto.

A Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise de Cluster (CLA), sub-rotinas do software R (versão 3.6.1) (Cheng et al., 2014), serão aplicadas ao conjunto de espectros. Estas duas técnicas estatísticas multivariadas são conhecidas por serem ferramentas poderosas de análise de dados com muitas variáveis que contêm grande população de padrões individuais. Em particular, o PCA tem provado ser uma ferramenta valiosa para a redução efetiva de dados através da descoberta de padrões espectrais que revelam as principais características do conjunto analisado. Além do cálculo dos PCs, serão também armazenados os scores que possibilitaram a construção do gráfico *Loading Plot* que representa os PCs em relação ao número de onda, viabilizando a observação dos modos vibracionais destacados. Modelos de regressão logística/análise de discriminante linear e “*receiving operator curves*” (Barile et al., 2014), poderão também ser empregados para obter quantitativamente a correta discriminação dos dados.

# **5. Viabilidade**

O presente projeto está vinculado a um projeto maior do presente orientador. Todos os equipamentos aqui descritos já fazem parte do projeto maior ao qual este está vinculado, bem como às dependências da UFABC, como a Central Multiusuário. O projeto ainda está vinculado ao de doutorado de uma das alunas do grupo (FAPESP 2021/12425-8), onde os mesmos animais serão utilizados, não sendo necessário a obtenção de um protocolo CEUA próprio, favorecendo o presente estudo em tempo e demanda de n animal.

# **6. Cronograma de atividades**

# **Etapa 1 - 08/2022 até 12/2022**: Realização do protocolo experimental e obtenção das vesículas. Início da caracterização das EVs.

# **Etapa 2 - 01/2023 até 04/2023**: Análise detalhada dos espectros obtidos.

# **Estapa 3 - 05/2023 até 08/2023**: Finalização das análises dos espectros. Análise final dos dados e confecção do relatório final e manuscrito.

**Tabela 1** – Cronograma de atividades previstas

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Etapa** | **Mês/Ano** | | | | | | | | | | | | |
| **08/22** | **09/22** | **10/22** | **11/22** | **12/22** | **01/23** | **02/23** | **03/23** | **04/23** | **05/23** | **06/23** | **07/23** | **08/23** |
| **1** | X | X | X | X | X |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **2** |  |  |  |  |  | X | X | X | X |  |  |  |  |
| **3** |  |  |  |  |  |  |  |  |  | X | X | X | X |

# 

# **Referências Bibliográficas**

Di Lullo L, Bellasi A, Russo D, Cozzolino M, Ronco C. Cardiorenal acute kidney injury: Epidemiology, presentation, causes, pathophysiology and treatment. Int J Cardiol. 2017 Jan 15;227:143-150. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.156. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27863290.

Uduman J. Epidemiology of Cardiorenal Syndrome. Adv Chronic Kidney Dis. 2018 Sep;25(5):391-399. doi: 10.1053/j.ackd.2018.08.009. PMID: 30309456.

Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. Intensive Care Med. 2008 May;34(5):957-62. doi: 10.1007/s00134-008-1017-8. Epub 2008 Feb 5. PMID: 18251008.

Wellington Caio-Silva, Danielle da Silva Dias, Carolina Victoria Cruz Junho, Karine Panico, Raquel Silva Neres-Santos, Milena Trevisan Pelegrino, Joana Claudio Pieretti, Amedea Barozzi Seabra, Kátia De Angelis, Marcela Sorelli Carneiro-Ramos, "Characterization of the Oxidative Stress in Renal Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiorenal Syndrome Type 3", BioMed Research International, vol. 2020, Article ID 1605358, 11 pages, 2020. https://doi.org/10.1155/2020/1605358.

Ronco C, McCullough P, Anker SD, Anand I, Aspromonte N, Bagshaw SM, Bellomo R, Berl T, Bobek I, Cruz DN, Daliento L, Davenport A, Haapio M, Hillege H, House AA, Katz N, Maisel A, Mankad S, Zanco P, Mebazaa A, Palazzuoli A, Ronco F, Shaw A, Sheinfeld G, Soni S, Vescovo G, Zamperetti N, Ponikowski P; Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) consensus group. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. Eur Heart J. 2010 Mar;31(6):703-11. doi: 10.1093/eurheartj/ehp507. Epub 2009 Dec 25. PMID: 20037146; PMCID: PMC2838681.

Di Lullo L, Reeves PB, Bellasi A, Ronco C. Cardiorenal Syndrome in Acute Kidney Injury. Semin Nephrol. 2019 Jan;39(1):31-40. doi: 10.1016/j.semnephrol.2018.10.003. PMID: 30606406.

M. S. Cirino-Silva, R.; Kmit, F.V.; Trentin-Sonoda, M.; Nakama, K.K.; Panico, K.; Alvim, J.M. ; Dreyer, T.R. ; Martinho-Silva, H.; Carneiro-Ramos, “Renal ischemia/reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice: Cardiac morphological and morphometric characterization.,” J. R. Soc. Med. Cardiovasc. Dis., no. 6, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1177/2048004016689440.

M. S. Trentin-Sonoda, M.; da Silva, R. C.; Kmit, F. V.; Abrahão, M. V.; Cahli, G. M.; Brasil, G. V.; Muzi-Filho, H. ; Silva, P. A. ; Tovar-Moll, F. F.; Vieyra, A.; Medei, E.; Carneiro-Ramos, “Knockout of toll-like receptors 2 and 4 prevents renal ischemia-reperfusion- induced cardiac hypertrophy in mice.,” PLoS One, vol. 10, p. e0139350, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0139350.

F. M. Trentin-Sonoda, M.; Fratoni, W. C. Junho, C. V. C.; Silva, and M. S. Panico, K.; Carneiro-Ramos, “Caspase-1 as Molecular Key in Cardiac Remodeling during Cardiorenal Syndrome Type 3 in the Murine Model.,” Curr Mol Med ., vol. 20, pp. 72–78, 2019, doi: 10.2174/1566524019666190916153257.

K. Panico, M. V. Abrahão, M. Trentin-Sonoda, H. Muzi-Filho, A. Vieyra, and M. S. Carneiro-Ramos, “Cardiac inflammation after ischemia-reperfusion of the kidney: Role of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system,” Cell. Physiol. Biochem., vol. 53, no. 4, pp. 587–605, 2019, doi: 10.33594/000000159.

M. M. L. Alarcon et al., “Cardiac arrhythmias after renal I/R depend on IL-1β.,”J. Mol. Cell. Cardiol., vol. 131, pp. 101–111, 2019, doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.04.025.

C. V. C. Junho, M. Trentin-Sonoda, J. M. Alvim, F. Gaisler-Silva, and M. S. Carneiro-Ramos, “Ca2+/ Calmodulin-dependent kinase II delta B is essential for cardiomyocyte hypertrophy and complement gene expression after LPS and HSP60 stimulation in vitro.,” Brazilian J. Med. Biol. Res., vol. 52, no. 7, p. e8732, 2019, doi: 10.1590/1414-431X20198732.

Neres-Santos R.S., Junho C.V.C., Panico K., Caio-Silva W., Pieretti J.C., Tamashiro J.A., Seabra A.B., Ribeiro C.A.J., Carneiro-Ramos M.S. "Mitochondrial Dysfunction in Cardiorenal Syndrome 3: Renocardiac Effect of Vitamin C". Cells, 2021, doi: 10.3390/cells10113029

L. Di Lullo, A. Bellasi, D. Russo, M. Cozzolino, and C. Ronco, “Cardiorenal acute

kidney injury: Epidemiology, presentation, causes, pathophysiology and treatment,”

Int. J. Cardiol., vol. 227, pp. 143–150, 2017, doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.156.

G. M. Virzì, A. Clementi, G. G. Battaglia, and C. Ronco, “Multi-Omics Approach: New Potential Key Mechanisms Implicated in Cardiorenal Syndromes.,” CardioRenal Med., vol. 2019, pp. 201–211, 9AD, doi: 10.1159/000497748.

Erdbrügger U, Le TH. Extracellular Vesicles in Renal Diseases: More than Novel Biomarkers? J Am Soc Nephrol. 2016 Jan;27(1):12-26. doi: 10.1681/ASN.2015010074. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26251351; PMCID: PMC4696584.

Karpman, D., Ståhl, Al. & Arvidsson, I. Extracellular vesicles in renal disease. Nat Rev Nephrol 13, 545–562 (2017). https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.98.

Georgatzakou HT, Pavlou EG, Papageorgiou EG, Papassideri IS, Kriebardis AG, Antonelou MH. The Multi-Faced Extracellular Vesicles in the Plasma of Chronic Kidney Disease Patients. Front Cell Dev Biol. 2020 Apr 15;8:227. doi: 10.3389/fcell.2020.00227. PMID: 32351956; PMCID: PMC7174738.

Balan V., Mihai C.T., Cojocaru F.D., et al. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. Materials (Basel).12(18):2884, 2019. doi:10.3390/ma12182884.

Cameron J.M., Butler H.J., Palmer D.S., Baker M.J. Biofluid spectroscopic disease diagnostics: A review on the processes and spectral impact of drying. J Biophotonics.11(4):e201700299, 2018. doi:10.1002/jbio.201700299.

Huang J., Ramoji A., Guo S., et al. Vibrational spectroscopy as a powerful tool for follow-up immunoadsorption therapy treatment of dilated cardiomyopathy - a case report. Analyst.145(2):486-496, 2020. doi:10.1039/c9an01696a.

Azevedo CAB, da Cunha RS, Junho CVC, da Silva JV, Moreno-Amaral AN, de Moraes TP, Carneiro-Ramos MS, Stinghen AEM. Extracellular Vesicles and Their Relationship with the Heart-Kidney Axis, Uremia and Peritoneal Dialysis. Toxins (Basel). 2021 Nov 4;13(11):778. doi: 10.3390/toxins13110778. PMID: 34822562; PMCID: PMC8618757.

Agnieszka Kamińska, Maciej Roman, Andrzej Wróbel, Agnieszka Gala-Błądzińska, Maciej T. Małecki, Czesława Paluszkiewicz, Ewa Ł. Stępień, Raman spectroscopy of urinary extracellular vesicles to stratify patients with chronic kidney disease in type 2 diabetes, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Volume 39, 2022, 102468, ISSN 1549-9634, https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102468.

C. Q. Feitoza, “Inhibition of COX 1 and 2 prior to Renal Ischemia/Reperfusion Injury Decreases the Development of Fibrosis.,” Mol. Med., pp. 724–730, 2008.

T. Pisitkun, R. Shen, and M. A. Knepper, “Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.,” Proc Natl Acad Sci USA, vol. 36, no. 10, pp. 13368–13373, 2004, doi: 10.1073/pnas.0403453101.

Lieber, C. A. & Mahadevan-Jansen, A. Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra. Appl. Spectrosc. 57, 1363–1367 (2003).

C. Cheng, Q. Wang, W. You, M. Chen, and J. Xia, “MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis.,” PLoS One, vol. 9, no. 2, p. e88566, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0088566.

L. Barile et al., “Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction.,” Cardiovasc. Res., vol. 103, pp. 530–541, 2014, doi: 10.1093/cvr/cvu167.