



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JÁDER ALMEIDA CANUTO

**EFEITO PROTETOR DE QUERCETINA SOBRE CÉLULAS TUBULARES
RENAIS E O ENVOLVIMENTO COM O EIXO RENINA-ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA**

FORTALEZA

2021

JÁDER ALMEIDA CANUTO

**EFEITO PROTETOR DE QUERCETINA SOBRE CÉLULAS TUBULARES RENAIIS
E O ENVOLVIMENTO COM O EIXO RENINA-ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C235e Canuto, Jáder Almeida.
Efeito protetor de quercetina sobre células tubulares renais e o envolvimento com o eixo renina-angiotensina-aldosterona. / Jáder Almeida Canuto. – 2021.
83 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
Coorientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

1. Lesão renal aguda. 2. KIM 1. 3. Quercetina. 4. Estresse oxidativo . I. Título.

CDD 615

JÁDER ALMEIDA CANUTO

**EFEITO PROTETOR DE QUERCETINA SOBRE CÉLULAS TUBULARES RENAIIS
E O ENVOLVIMENTO COM O EIXO RENINA-ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Gdayllon Cavalcante Meneses (Examinador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr^ª Márcia Machado Marinho (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio (Examinador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará – UFC

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai e Criador, pelo dom da vida, pela família maravilhosa, pelo Seu chamado em minha vida e a graça da conquista, desde o vestibular, do grande sonho de ser farmacêutico, e agora doutor.

Aos meus pais, por todo o apoio, estímulo e dedicação incondicional na educação que tive. Não seria nada sem vocês e esta conquista não é só minha, mas nossa.

Ao meu irmão, Eliseu, a mente mais admirável que conheço. Por todo o apoio dado antes e durante a graduação. Você será sempre um grande exemplo para mim.

À minha esposa Isabela, por toda vez que, durante estes anos, me apoiou, alegrou, levantou, incentivou, aceitou minhas ausências para que este trabalho pudesse nascer e por me mostrar o verdadeiro sentido da vida.

Ao nosso pequeno Pietro Lima Canuto que, ainda no ventre da mãe, já é a tradução do amor de Deus em nossas vidas e vem alegrar cada dia de nossa existência.

A Ana Cristina Lima, minha cunhada, que se tornou irmã. Pela amizade, carinho, atenção e incentivo ao longo de tantos anos.

Às primas do coração, Ana Clara e Karolyna, pela amizade, apoio em todas as situações e por todos os ótimos momentos compartilhados.

Aos demais membros da família, por todo o incentivo e por todas as vezes que através de pedidos de diagnósticos, indicações de medicamentos, tradução de receitas e outras orientações relativas à saúde, me obrigaram a estudar e a me tornar um profissional melhor.

À D. Maria José e Sr. Vicente, pelo constante incentivo e torcida durante este período de minha vida.

À Professora Dr^a. Alice Maria Costa Martins, por toda a confiança que depositou em mim, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e constantes estímulos, mesmo quando tudo ia mal. Foi com a senhora que pude aprender e me descobrir dentro da pesquisa.

Ao prof. Dr. Ramon Pessoa por ser, desde o meu primeiro semestre na faculdade de farmácia, um exemplo de pesquisador e professor dedicado e apaixonado pela ciência. Por cada conselho, ajuda, correção e sobretudo pela amizade constante ao longo desses anos.

Ao prof. Dr. Tiago Lima Sampaio pela amizade de 12 anos construída dentro da faculdade de farmácia. Pela parceria, simplicidade, pela constante disposição em ajudar no que for preciso e por ter aceito participar da banca deste trabalho. Você é um grande exemplo.

À prof^a. Dr^a. Márcia Marinho, por todo o coleguismo ao longo dos anos, pela parceria nos trabalhos do grupo, por seus conselhos tão essenciais e por ter aceito participar desta banca.

Ao Prof. Dr. Gdayllon Cavalcante Meneses, pela amizade que partilhamos, por toda a ajuda em diversos projetos. Por conceder um olhar diferente sobre elementos da vida e por ter aceito participar desta banca.

À Dr^a. Késsia Arruda pela amizade, companheirismo e palavras de incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao amigo Mateus Melo, por sua amizade, companheirismo e dedicação ao longo dos mais de 15 anos. Sempre me estimulando ao crescimento profissional e pessoal.

Ao grupo de oração Lírio da Trindade, por ser minha segunda família e estar sempre me ajudando e impulsionando a trilhar o caminho que leva à felicidade verdadeira.

Aos amigos do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica: Emanuel Paula, Brenna Silva, Igor, Mac Dionys, Mateus, Dânya Bandeira, Livia Fernandes, Gabriela Freire, Paloma Leão, Louise Donadello, pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos, e acima de tudo, pela amizade construída ao longo desses anos.

RESUMO

A síndrome de isquemia-reperfusão (I/R) desempenha um papel importante na lesão renal aguda (LRA) devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Substâncias antioxidantes, sobretudo as de origem natural têm sido estudadas na prevenção de danos oxidativos relacionados a I/R. Nesse contexto, destaca-se a quercetina, um flavonóide com potencial antioxidante, modulatório de enzimas e de inibição do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da quercetina sobre células tubulares renais submetidas a I/R e analisar o envolvimento da inibição do SRAA nesse efeito. As células renais tubulares LLC-MK2 foram submetidas a um modelo de isquemia /reperfusão *in vitro* e em seguida tratadas com quercetina em concentrações consideradas não tóxicas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio (MTT). O dano celular tubular foi avaliado pela liberação da molécula de injúria renal-1 (*Kidney Injury Molecule-1* - KIM-1). O estresse oxidativo foi avaliado pela formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e acúmulo de glutatona reduzida (GSH). A avaliação da morte celular e da despolarização mitocondrial foram analisadas por citometria de fluxo. Ensaio *in silico* foram realizados visando avaliar a interação teórica da quercetina com a enzima conversora de angiotensina e com o receptor AT1 da angiotensina II. No presente trabalho, a quercetina foi capaz de prevenir o dano oxidativo induzido em células renais tubulares após eventos isquêmicos. Esse potencial pode estar relacionado à capacidade de prevenir a morte celular após I/R, principalmente pela proteção às mitocôndrias contra a despolarização, evidenciado pela análise da rodamina 123 e inibição da liberação de KIM-1. Os efeitos da quercetina foram comparados ao lisinopril e à losartana, inibidores do sistema renina-angiotensina (SRAA). O lisinopril, não apresentou efeito protetor. A losartana apresentou efeito moderado quando comparado à quercetina. Nesse contexto, as simulações de *docking molecular* evidenciaram que a quercetina possui potencial para interagir com o receptor AT1 da angiotensina com maior afinidade, apresentando uma ligação estável por meio da formação de cinco ligações de hidrogênio de forte intensidade. Assim, nossos resultados sugerem que a quercetina apresentou efeito protetor sobre as células LLC-MK2 com envolvimento do SRAA, por meio do bloqueio dos receptores AT1.

PALAVRAS-CHAVE: Flavonoides; Lesão Renal Aguda; Estresse Oxidativo; Receptor de Angiotensina; KIM-1.

ABSTRACT

Ischemia-reperfusion (I/R) syndrome plays an important role in acute kidney injury (AKI) due to the generation of reactive oxygen species (ROS). Antioxidant substances, especially those of natural origin, have been studied in the prevention of oxidative damage related to I/R. In this context, quercetin stands out as a flavonoid with antioxidant potential, enzyme modulator and inhibition of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS). The aim of this study was to evaluate the effect of quercetin on renal tubular cells subjected to I/R and to analyze the involvement of RAAS inhibition in this effect. The LLC-MK2 tubular renal cells were submitted to an in vitro ischemia/reperfusion model and then treated with quercetin at concentrations considered non-toxic. Cell viability was assessed by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. Tubular cell damage was evaluated by the release of the kidney injury molecule-1 (Kidney Injury Molecule-1 - KIM-1). Oxidative stress was assessed by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and accumulation of reduced glutathione (GSH). The evaluation of cell death and mitochondrial depolarization were analyzed by flow cytometry. In silico assays were carried out to evaluate the theoretical interaction of quercetin with the angiotensin-converting enzyme and with the AT1 receptor of angiotensin II. In the present work, quercetin was able to prevent oxidative damage induced in renal tubular cells after ischemic events. This potential may be related to the ability to prevent cell death after I/R, mainly by protecting mitochondria against depolarization, evidenced by the analysis of rhodamine 123 and inhibition of KIM-1 release. The effects of quercetin were compared to lisinopril and losartan, inhibitors of the renin-angiotensin system (RAAS). Lisinopril had no protective effect. Losartan had a moderate effect when compared to quercetin. In this context, molecular docking simulations showed that quercetin has the potential to interact with the angiotensin AT1 receptor with greater affinity, presenting a stable bond through the formation of five strong hydrogen bonds. Thus, our results suggest that quercetin had a protective effect on LLC-MK2 cells with RAAS involvement, by blocking AT1 receptors.

KEYWORDS: Flavonoids; Acute Kidney Injury; Oxidative stress; Angiotensin Receptor; KIM-1.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7AAD – 7-amino-actinomycin.

Anx – Annexin V.

ARA II - Antagonista do receptor da angiotensina II.

DCFH-DA – Diacetato de Diclorofluoresceína.

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO – Dimethylsulfóxido.

ECA – Enzima conversora de Angiotensina.

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio.

GSH – Glutationa Reduzida.

IECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina.

I/R – Isquemia e Reperfusão.

KIM-1 – Kidney Injury Molecule 1.

LRA – Lesão Renal Aguda.

MDA – Malondialdeído.

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

PBS – Phosphate Buffer Solution.

Rho123 – Rodamina 123.

SDS – Dodecilsulfato de Sódio.

SRAA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.

TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances.

$\Delta\Psi_m$ –Potencial Transmembranico Mitocondrial.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ativação da apoptose pela via citoplasmática
- Figura 2** Via intrínseca de ativação da apoptose.
- Figura 3** Estrutura química da Quercetina
- Figura 4** Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.
- Figura 5** Princípio do ensaio em Citometria de Fluxo
- Figura 6** Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade da Quercetina sobre células renais LLC-MK2
- Figura 7** Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células renais LLC-MK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após tratamento com Quercetina.
- Figura 8** Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade de Losartana e Lisinopril sobre células renais LLC-MK2.
- Figura 9** Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células renais LLC-MK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após tratamento com Quercetina.
- Figura 10** Níveis de Molécula de Lesão Renal (KIM-1) no sobrenadante de células renais LLC-MK2.
- Figura 11** Avaliação do estresse oxidativo através da medida das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células renais LLC-MK2.
- Figura 12** Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de glutatona reduzida (GSH) em células renais LLC-MK2
- Figura 13** Representação do ensaio de avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por Anx (anexina V).
- Figura 14** Gráficos *density plot* representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V.

Figura 15 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células renais LLC-MK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.

Figura 16 Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com Quercetina na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (A), 100 $\mu\text{g/mL}$ (B) e 50 $\mu\text{g/mL}$

Figura 17 Representação da interação de ligantes com a Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA) por docking molecular. (A) Enalaprilate; (B) Quercetina e (C) Lisinopril. Mapas 2-D que representam as interações de (D) Quercetina e (E) Enalaprilate com o ACE

Figura 18 Representação da interação de ligantes com o receptor de Angiotensina AT1 por docking molecular. (A) Quercetina; (B) ZD7 e (C) Losartana. Mapas 2-D que representam as interações de (D) Losartan e (E) Quercetina com o ACE.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Energia de afinidade dos ligantes com a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

Tabela 2 Tipos de interações e distância (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da Enzima Conversora de Angiotensina

Tabela 3 Classificação das ligações de hidrogênio e distância (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da Enzima Conversora de Angiotensina.

Tabela 4 Afinidade energética dos ligantes com o receptor de Angiotensina AT1.

Tabela 5 Tipos de interação e distâncias (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do receptor AT1.

Tabela 6 Classificação das ligações de hidrogênio e distância (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos receptor AT1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Lesão Renal Aguda (LRA)	14
1.2 Estresse Oxidativo	15
1.3 Morte celular programada	16
1.4 Polifenóis	18
1.4.1 Quercetina	19
1.5 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)	20
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Manutenção e cultivo de células LLC-MK2	29
4.2 Modelo <i>in vitro</i> de isquemia/reperfusão	29
4.3 Tratamento	30
4.4 Ensaio de viabilidade celular	30
4.5 Determinação dos níveis de KIM-1	31
4.6 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células LLC-MK2	32
4.6.1 Ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	33
4.6.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	33
4.7 Ensaios de Citometria de Fluxo	34
4.7.1 Preparação da análise	35
4.7.2 Avaliação do mecanismo de morte celular	36
4.7.3 Avaliação do Potencial Transmembrânico Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	37
4.8 Docking molecular	37
4.8.1 Obtenção e otimização de estruturas moleculares	38
4.8.2 Análise de docking molecular	38
4.9 Análise estatística	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Ensaios de viabilidade celular	40

5.2	Mensuração dos níveis de KIM-1	43
5.3	Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células LLC-MK2	45
5.4	Ensaio de Citometria de Fluxo	47
5.4.1	Avaliação do mecanismo de morte celular	48
5.4.2	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	50
5.5	Ensaio de Docking molecular	52
5.5.1	Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA)	52
6.	DISCUSSÃO	61
7.	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão Renal Aguda (LRA)

A lesão renal aguda (LRA) pode ser caracterizada como a redução ou perda súbita da função renal, sendo caracterizada pela degradação da função tubular e glomerular, originando declínio da filtração glomerular, alterações na diurese, distúrbios hidroeletrólíticos, acidobásicos e o acúmulo de compostos nitrogenados como ureia e creatinina na circulação sistêmica (PARIKH; MANSOUR, 2017; LEE, 2019).

De acordo com a etiologia, a LRA pode ser classificada como pré-renal, renal (intrínseca) e pós-renal. No grupo de LRA renal (intrínseco), se enquadram as formas de lesões ao parênquima, tendo sua classificação baseada no principal local afetado: glomérulo, túbulos, interstício ou vasos. Já o grupo classificado como LRA pós-renal está ligado à obstrução do trato e, conseqüentemente, do fluxo urinário, de forma intra ou extra-renal, sendo esta a causa menos frequente de LRA (GAIAO; PAIVA, 2017).

A LRA pré-renal se dá por uma série de eventos que culminam na redução do volume circulante, bem como do fluxo sanguíneo renal. É uma resposta funcional do órgão intacto à baixa perfusão, sendo esta a principal causa pré-renal de LRA, responsável por cerca de 50% dos casos (DEVARAJAN *et al.*, 2007). Tal lesão se configura como a causa mais frequente de LRA em pacientes hospitalizados, sendo os eventos isquêmicos os principais responsáveis (MAKRIS & SPANOU, 2016).

A isquemia pode ser definida como o fluxo arterial restrito ou insuficiente para manter as funções teciduais normais, por meio da diminuição da oferta de oxigênio e nutrientes, fato que constitui um dos mais importantes problemas enfrentados pela medicina, como o infarto agudo do miocárdio, a oclusão arterial aguda, a insuficiência vascular periférica e no transplante de órgãos (MAXWELL, 1997).

O rim é um órgão altamente suscetível às lesões relacionadas à isquemia, resultando em vasoconstrição, lesão endotelial e processos inflamatórios. Esta suscetibilidade pode ser explicada, pelo menos em parte, pelas associações estruturais entre os túbulos renais e os vasos sanguíneos na medula externa do rim, com a isquemia comprometendo o fluxo sanguíneo para as estruturas críticas do néfron. Após a redução da perfusão, as células epiteliais são incapazes de manter o ATP intracelular em nível adequado para os processos essenciais, devido à diminuição da fosforilação

oxidativa. Essa depleção de ATP leva à lesão celular e, a depender da gravidade, chega à morte celular (SHARFUDDIN & MOLITORIS, 2011).

Durante o processo de isquemia/reperfusão (I/R), todos os segmentos dos néfrons podem ser afetados, mas as células tubulares proximais são as mais comumente lesadas (BONVENTRE & YANG, 2011). Tais eventos podem predispor à LRA por hipóxia tecidual causada pela diminuição do fluxo sanguíneo, formação de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e morte celular programada por apoptose (LAMEIRE *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2018).

1.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e os sistemas de defesas antioxidantes (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004), podendo resultar da diminuição dos níveis de antioxidantes, de mutações, afetando a atividade de defesa de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) ou glutational peroxidase (GPx). Por exemplo, muitos xenobióticos são metabolizados por conjugação com a glutational reduzida (GSH) e, em altas doses, podem esgotar o GSH e causar estresse oxidativo mesmo se o próprio xenobiótico não for capaz de gerar espécies reativas.

Uma das etapas importantes para o estabelecimento do dano tecidual é protagonizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e acontece na etapa de reperfusão. O aumento da oferta de oxigênio em um tecido que se encontra ávido por essa substância, pode gerar um desvio no oxigênio molecular da respiração celular, gerando aumento na produção de ERO (GRANATA *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016).

Isto acontece porque, ao ser submetido à isquemia, a atividade da enzima xantina oxidase (XO) aumenta rapidamente devido a formação da xantina desidrogenase e do aumento da produção de hipoxantina, formada pela depleção de ATP no processo de isquemia. Dessa forma, a XO catalisa a reação que forma xantina e superóxido a partir da hipoxantina em combinação com o oxigênio proveniente da reperfusão. O superóxido, pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), forma peróxido de hidrogênio que, quando esse não é transformado em água pela catalase, leva à formação do radical livre hidroxila, altamente tóxico e reativo. O acúmulo de hipoxantina, que decorre da quebra

do ATP, não se traduz na formação do superóxido sem a presença do oxigênio advindo da reperfusão. Assim, a lesão tecidual pelo estresse oxidativo só se estabelece com a reperfusão (HARRIS *et al.*, 1992), causando danos mitocondriais, levando à disruptura da cadeia transportadora de elétrons (CTE), impossibilitando a fosforilação oxidativa e causando a diminuição na síntese de ATP (GRANATA *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016).

1.3 Morte celular programada

A morte celular programada é um processo fisiológico que desempenha um papel essencial no desenvolvimento e manutenção da homeostase dos tecidos. A ativação dessas vias envolve diversas moléculas sinalizadoras e mediadoras responsáveis por controlar esse processo em condições fisiológicas. Os mecanismos de morte desempenham um papel fundamental em diversos processos, tanto fisiológicos, como no desenvolvimento da tolerância imunológica, quanto patológicos, como no câncer. Estes processos podem ser classificados em autofagia, senescência, necrose e apoptose (HERAULT *et al.*, 1999).

A apoptose é um processo de ordem sequencial de morte celular, portanto, essencial na manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, eliminando células senescentes ou defeituosas. Este processo é caracterizado por diversas alterações a nível celular. Tais alterações incluem a retração da célula, com perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina que se concentra junto à membrana nuclear, esta última mantida intacta. Há ainda a fragmentação internucleossômica do DNA, ruptura da membrana externa mitocondrial, oxidação de lipídios de membrana e formação de prolongamentos citoplasmáticos e de corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

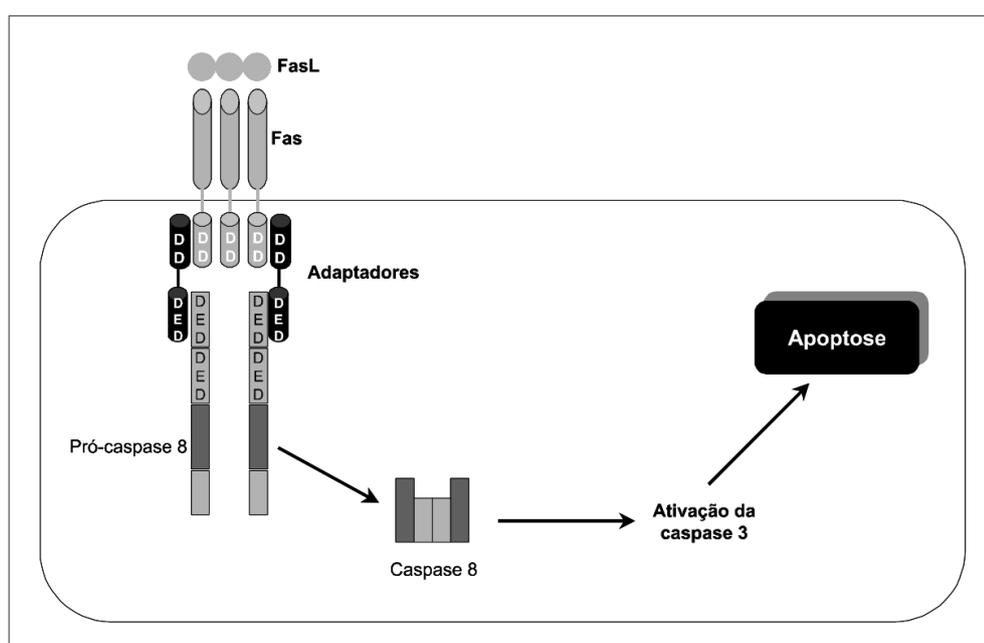
Dentre as moléculas sinalizadoras da apoptose destaca-se a participação das caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*), pertencentes à família das cisteínas proteases, as quais reconhecem e clivam substratos, mediando a externalização de lipídios de membrana chamados de resíduos de fosfatidilserina, que sinalizam a fagocitose de células apoptóticas (ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011).

Ademais, outras moléculas também estão envolvidas com o controle e modulação da apoptose. Visto que a homeostasia é mantida quando há o equilíbrio entre proteínas

promotoras e inibidoras da apoptose, as proteínas da família Bcl-2 são inibidoras da apoptose pois previnem a liberação das enzimas do citocromo c, inibindo a formação de ERO e estabilizando o potencial da membrana mitocondrial. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (MAGNELLI et al., 2010).

Diversos fatores podem ser capazes de estimular a apoptose. Este mecanismo acontece a partir de duas vias, a extrínseca (citoplasmática) e a intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca (Figura 1) corresponde a uma interação mediada por ligantes ao grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), que inclui o TNF, ligantes Fas (Fas-l) e ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (LIU *et al.*, 2017; SHLYAKHTINA *et al.*, 2017).

Figura 1. Ativação da apoptose pela via citoplasmática.

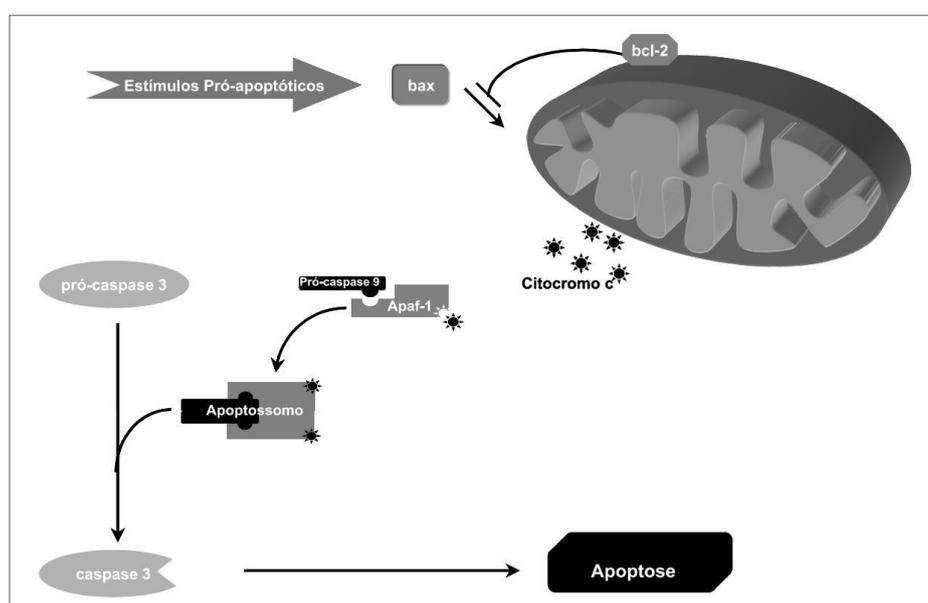


Fonte: GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA (2007).

A via intrínseca (Figura 2) envolve uma série de eventos intracelulares que ocorrem dentro da mitocôndria. Vários fatores hormonais, fatores de crescimento, radiação, toxinas, hipóxia, infecções virais e hipertermia que levam à permeabilidade intermembranar da mitocôndria, podem desencadear essa via. Nestas condições de estresse, onde há a diminuição de fatores de crescimento, danos ao DNA e hipóxia,

ocasionando uma disfunção e uma despolarização no potencial elétrico negativo da membrana mitocondrial, comprometendo a respiração celular. Quando ativada, esta via gera a ruptura osmótica da membrana mitocondrial, liberando proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, principalmente o citocromo c. Além disso, há um comprometimento da síntese de ATP, produção excessiva de ERO, os quais oxidam material genético, proteínas e lipídios; adicionalmente, as ERO induzem a ativação das caspases -9 e -3 (MAGNELLI *et al.*, 2010; CHEUNG; LUDWIG; VOUSDEN, 2012).

Figura 2. Via intrínseca de ativação da apoptose.



Fonte: GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA (2007).

1.4 Polifenóis

Várias estratégias são descritas para prevenir, ou reverter os danos teciduais estabelecidos pelo estresse oxidativo e estado inflamatório nos rins após a ocorrência de I/R. Estratégias hemodinâmicas como a prescrição de vasodilatadores e hidratação, além da administração de esteroides e outros anti-inflamatórios, bem como o uso de antioxidantes que melhoram o metabolismo mitocondrial têm sido destacados em pesquisas clínicas (LAAR *et al.*, 2012; TAI *et al.*, 2015). Nesse contexto, substâncias de origem natural, principalmente compostos fenólicos, têm sido objeto de estudo na

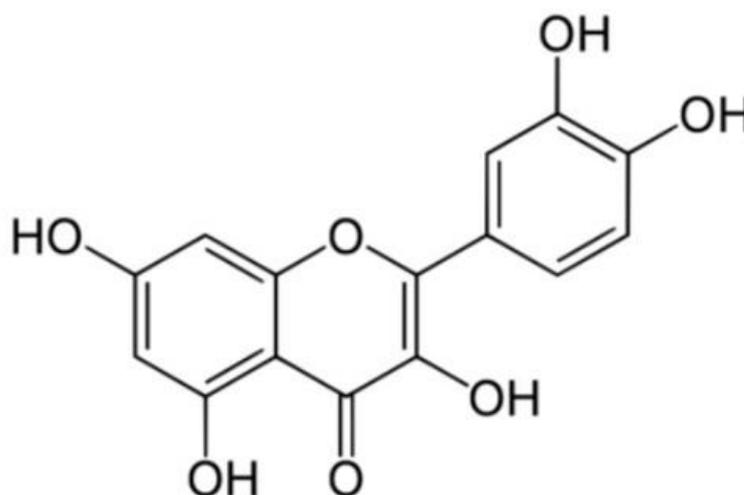
prevenção e tratamento de danos oxidativos relacionados à I/R, especialmente no tecido tubular (SAMPAIO *et al.*, 2019).

No grupo dos polifenóis, os flavonoides correspondem a um subgrupo de metabólitos secundários vegetais, que possuem a função de defesa às possíveis infecções e condições de estresse por agentes externos, tais como a luz ultravioleta, patógenos e danos físicos (SIMITZIS *et al.*, 2018). Em meio a esse amplo grupo de substâncias, encontra-se a Quercetina.

1.4.1 Quercetina

O nome quercetina vem sendo utilizado desde 1857 e tem sua origem na palavra “querceto” (floresta de carvalhos). Apresenta fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$ e seu nome, segundo a União Internacional e Química Pura e Aplicada (IUPAC) é 3,3', 4', 5,7-pentahidroxi-flavona. É um flavonoide (*flavus* significa amarelo, sua cor comum), do tipo flavonol, e tem dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um oxigênio heterocíclico (anel C) (LI *et al.*, 2018). Sua estrutura química está representada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química da Quercetina



Fonte: PEREIRA, 2014.

Apresenta-se como um pó amarelo-alaranjado, com peso molecular de 302,24 g/mol para a forma anidra e de 338,27 g/mol para a forma diidratada. Ela torna-se anidra na faixa de temperatura de 93 a 97°C e decompõe-se a 314°C. A Quercetina é

praticamente insolúvel em água (cerca de 0,30-0,70 µg/mL) e possui um pKa de 6,74 (BUDAVARI, 1996).

Representa, dentre os flavonoides, o mais abundante da dieta humana, pois está extensivamente presente em frutas e vagens, folhas, legumes, chá e vinho tinto (RAUF *et al.*, 2018). Os vegetais que carregam as mais altas concentrações de Quercetina são a cebola (*Allium cepa L.*), aspargos (*Asparagus officinalis L.*) e alface vermelha (*Lactuca sativa L.*), com níveis mais baixos em brócolis, pimentão verde, ervilha e tomates. Dentre as frutas, as maçãs apresentam o maior conteúdo, juntamente com as cerejas (COSTA, 2016).

A Quercetina tem sido bastante conhecida, principalmente, por suas ações biológicas como antioxidante, anti-inflamatório, como protetor hepático e renal, cardioprotetor, como vasodilatadora, anti-hipertensivo, antiviral, neuroprotetor, psicoestimulante, além da sua ação sobre a microbiota intestinal, potencializando as funções probióticas de bifidobactérias (GRZELAK-BŁASZCZYK *et al.*, 2018; LESJAK *et al.*, 2018; SALVAMANI *et al.*, 2014; DAVID; ARULMOLI; PARASUARAMAN, 2016; RAUF *et al.*, 2018; SUNDARAM *et al.*, 2019). Diversos estudos têm também se mostrado promissores na utilização da Quercetina como um tratamento aliado à terapêutica do câncer, especialmente em câncer de ovário, onde apresentou um alto impacto citotóxico nas células (ASMA *et al.*, 2020). Bem como um quimiopreventivo para diversas neoplasias (GIBELLINI *et al.*, 2011).

No passado, com evidências da influência da quercetina sobre a pressão arterial, pensava-se que este efeito era devido ao seu efeito sobre o estresse oxidativo (ABIGAIL; SYMONS; JALILI, 2010). No entanto, a investigação não conseguiu provar de forma clara e consistente. Assim, uma das hipóteses para o seu efeito sobre a pressão arterial (PA), é a inibição do Sistema Renina-Angiotensina (SRAA) podendo ainda justificar os demais efeitos na proteção celular (BAHEM *et al.*, 2015).

1.5 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

O SRAA exerce uma importante função na regulação da pressão arterial, da homeostase hidroeletrólítica, em processos metabólicos e no crescimento e proliferação celular (SANTOS *et al.*, 2013). Quando é estimulado por hipotensão, aumento da

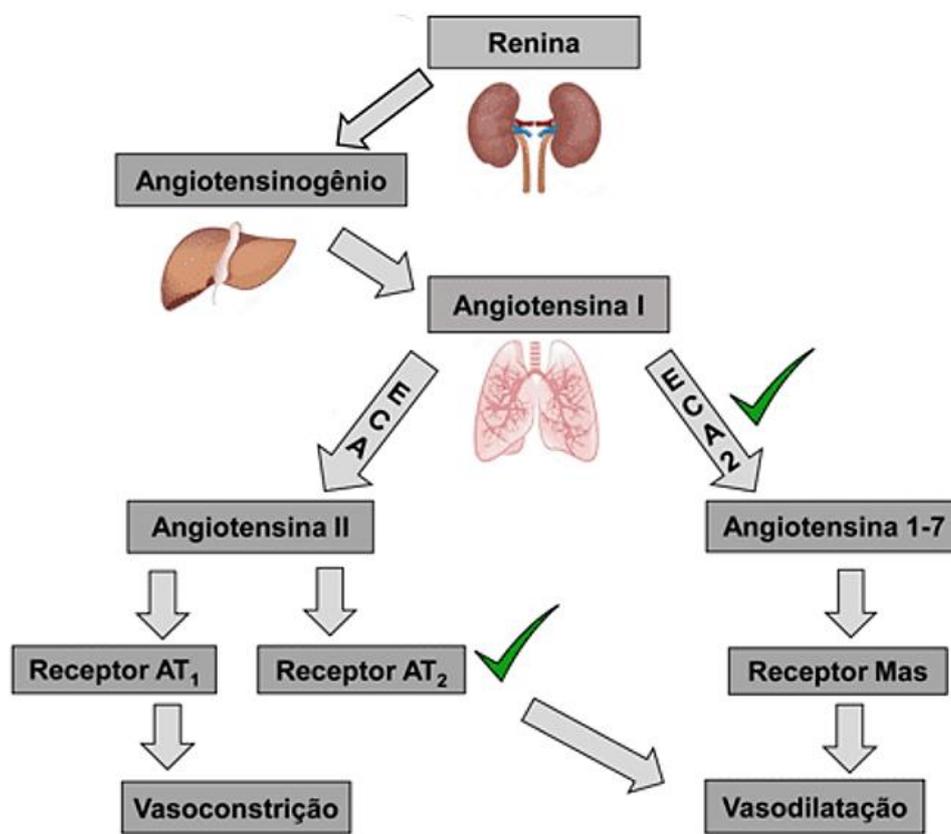
atividade simpática, ou alterações nas concentrações vasculares de eletrólitos, o SRAA é ativado, desencadeando uma sequência de ações consistentes (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2011). A hiperativação do SRAA em longo prazo está associada a diversos eventos deletérios como hipertensão, isquemia miocárdica, arritmias, hipertrofia ventricular e também problemas na função renal, ou desordens metabólicas como o desenvolvimento de Diabetes *Mellitus* e aumento do estresse oxidativo a nível celular, gerando danos mitocondriais e morte celular (ANDERSEN *et al.*, 2016).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) catalisa uma reação determinante neste sistema, convertendo a angiotensina I em angiotensina II, um octapeptídeo fisiologicamente ativo, capaz de atuar em diversos sistemas. Estas ações são intermediadas, principalmente, pela ativação dos receptores de Angiotensina II, do tipo 1 (AT1), promovendo vasoconstrição, respostas pró-oxidantes e pró-inflamatórias, ou, receptores do tipo 2 (AT2), desempenhando ações antagônicas ao AT1, gerando assim um mecanismo de contrabalanço entre ações danosas e ações protetoras no organismo (HACKL *et al.*, 2002).

Estudos realizados nas últimas décadas indicam a descoberta de novos componentes do SRAA como diferentes tipos de angiotensinas, vias de sinalização e enzimas de conversão envolvidas em processos fisiológicos de proteção desconhecidos até então. A descoberta de uma segunda enzima de conversão da Angiotensina (ECA2), originando um peptídeo diferente (Angiotensina 1-7) com afinidade maior para um receptor diferente, o receptor Mas, foi um avanço no entendimento dos processos de controle fisiológico deste sistema (FYHRQUIST *et al.*, 2008).

Este eixo, conhecido como ECA2/Ang (1-7)/Mas (Fig 4), exerce importantes funções ligadas a respostas vasodilatadoras e anti-hipertensivas, capazes de contrabalancear a atividade do eixo Angiotensina II/Receptor AT1. Estudos posteriores demonstraram que a ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas estimula a liberação de óxido nítrico, promovendo efeitos protetores anti-fibróticos, antitrombóticos, anti-hipertroficantes e vasodilatadores, com extrema importância para o sistema cardiovascular e renal. Assim, o eixo ECA2/Ang (1-7)/Mas tem motivado diversas investigações farmacológicas, sendo um potencial alvo terapêutico (PASSOS-SILVA *et al.*, 2013; RAMIREZ-SANCHEZ, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Figura 4. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.



Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2019).

Estudos demonstraram que o bloqueio farmacológico do SRAA pela inibição da ECA, ou antagonismo dos receptores AT1, pode prevenir a diminuição da função renal em condições como nefropatia diabética, pré-eclâmpsia e desidratação (SPARKS M.A *et al.*, 2014). Os avanços nos estudos sobre o SRAA apontam ainda que fármacos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e bloqueadores do receptor de angiotensina II (ARAI), além de tiazolidinedionas e ibuprofeno promovem níveis elevados da isoenzima ECA2. Embora a ECA e a ECA2 sejam duas enzimas estruturalmente relacionadas, a ECA2 converte a angiotensina II em angiotensina (1-7), um hormônio peptídico com propriedades antagonistas às da angiotensina II (SAMPAIO, TL; MENEZES RRPPB, 2020).

Em oposição aos efeitos apresentados pela angiotensina (1-7), a angiotensina II ativa diversas vias de sinalização vascular, podendo levar à inflamação, contração, disfunção endotelial, crescimento e migração de células do músculo liso, fatores que

juntos podem promover a progressão do dano vascular. Além disso, a angiotensina II desencadeia a expressão excessiva de EROs gerando danos ao DNA, disfunção mitocondrial e morte celular. Dessa maneira, torna-se essencial a busca por agentes eficazes para o antagonismo destes efeitos deletérios da angiotensina II, decorrentes da ativação do SRAA a nível celular (ZHENG *et al.*, 2014; MIKOLACJCZYK *et al.*, 2016).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As estimativas sugerem que, anualmente, 13,3 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por lesão renal aguda; 85% das quais vivem em países em desenvolvimento (HOSTE *et al.*, 2018). Além disso, estima-se que até 1,7 milhões de mortes ocorrem a cada ano causadas por LRA (MEHTA, 2015). Em estudos de meta-análise no âmbito hospitalar, foi possível estimar que a cada cinco pacientes internados, um deles irá experimentar a LRA. Este número é ainda maior para a população pediátrica, estando presente em, aproximadamente, 33% dos pacientes hospitalizados e pacientes pós-cirúrgicos cardíacos, até 92,2% (SUSANTITAPHONG *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2019). Quando pacientes de unidades de terapia intensiva foram analisados isoladamente quanto a ocorrência deste evento, demonstrou-se que 74% são afetados (PIRES *et al.*, 2020).

Assim, o aumento na incidência da LRA representa um problema de saúde pública global, com alta morbidade e mortalidade, sobretudo, nos pacientes hospitalizados. Tal fato gera ainda o aumento da progressão para a doença renal crônica, e os custos em saúde (HORKAN *et al.*, 2015).

Diante desse contexto, faz-se necessário buscar substâncias bioativas com atividade nefroprotetora. Dentre a ampla variedade de compostos, destacam-se o grupo dos flavonoides, especialmente a quercetina (PIMENTEL-MORAL *et al.*, 2018).

Previamente, os benefícios atribuídos à quercetina se deviam unicamente ao seu efeito sobre o estresse oxidativo (ABIGAIL; SYMONS; JALILI, 2010). No presente trabalho, foi estudada a ligação da quercetina com vários alvos enzimáticos e não enzimáticos, sendo a inibição do Sistema Renina-Angiotensina (SRAA) um dos mais importantes.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito citoprotetor renal da quercetina na lesão de isquemia seguida de reoxigenação (I/R) e analisar teoricamente a capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) ou antagonizar os receptores AT1 da angiotensina.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito protetor da quercetina sobre células tubulares renais submetidas a isquemia e reoxigenação e o envolvimento do eixo renina-angiotensina-aldosterona.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeitos protetore da quercetina sobre células tubulares renais submetidas à I/R.
- Avaliar os efeitos da quercetina sobre a morte celular após injúria por I/R.
- Estudar a participação da quercetina sobre o estresse oxidativo relacionado ao processo de I/R.
- Estudar o envolvimento do eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona no efeito protetor da quercetina em modelo de I/R.

MATERIAL E
MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção e cultivo de células LLC-MK2

As células LLC-MK2 (ATCC CCL-7) são uma linhagem imortalizada de células tubulares renais, obtidas de macaco (*Macaca mullata*), foram gentilmente doadas pelo laboratório de Química do Instituto de Bioquímica da Universidade de São Paulo. Foram cultivadas em garrafas de cultura celular (25cm² ou 75cm²), em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL), 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas em estufa incubadora de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ (figura 4).

Para manutenção das células, o meio de cultura das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7.4. A garrafa foi incubada com 1 mL de solução de tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) por 5-10 minutos, a 37°C para desprendimento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1mL de DMEM, e alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas.

4.2 Modelo *in vitro* de isquemia/reperfusão

Para a avaliação *in vitro* da lesão por isquemia/reperfusão, foi utilizado o método da câmara anaeróbica, o qual mimetiza as condições de I/R (GINO & BRINDA, 2014). Assim, as células LLC-MK2 (1x10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas *overnight* para adesão e proliferação celular. O meio de cultura utilizado para indução da isquemia foi DMEM, privado de glicose, piruvato e SBF. As placas foram então incubadas em uma câmara anaeróbica, por 12 horas a 37°C sob condição de hipóxia (saturação de oxigênio < 5%). Após 12h, o meio de cultura foi retirado, um novo meio completo foi adicionado e a cultura foi retornada à atmosfera de 5% de CO₂ por 3h.

4.3 Tratamento

Após 3h de reoxigenação, as células foram tratadas com quercetina, losartana, ou lisinopril. A Quercetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluída previamente em Dimetil sulfóxido (DMSO), nunca excedendo a concentração máxima de 0,5% de DMSO. Então, a Quercetina foi diluída em PBS e as células foram tratadas sob diferentes concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 μ g/mL correspondendo a $6,62 \times 10^{-1}$, $3,1 \times 10^{-1}$, $1,65 \times 10^{-1}$, $8,27 \times 10^{-2}$, $4,13 \times 10^{-2}$ e $2,07 \times 10^{-2}$ μ M). A solução de DMSO 0,5% foi utilizada como controle negativo. Losartana (422,91 g/mol) e Lisinopril (405.49 g/mol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram diluídos em PBS sob diferentes concentrações (1×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1×10^0 , 1×10^1 , e 1×10^2 μ M) e as placas foram tratadas e incubadas em condições aeróbias por 12h. Estes fármacos foram utilizados por serem, respectivamente, antagonistas do receptor de angiotensina II (ARA II) e inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA).

4.4 Ensaio de viabilidade celular

Com o propósito de avaliar a citotoxicidade de quercetina sobre as células LLC-MK2, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT. O MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) é um sal de tetrazólio de cor amarela que, quando em contato com células viáveis, é internalizado por endocitose e clivado por desidrogenases do citoplasmáticas e mitocondriais, produzindo um sal de cor arroxeada chamado formazan (MOSMANN, 1983). Posteriormente, os cristais de formazan são excitados e podem ser solubilizados pela presença do reagente dodecilsulfato de sódio (SDS). Assim, as células não-viáveis perdem a capacidade metabólica de internalizar e clivar o MTT. A concentração de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e é medida pela leitura da absorbância a 570 nm.

Após 12h de tratamento, o MTT foi adicionado aos poços das placas em uma contração final de 2,5 mg/mL, sendo, então, incubadas a 37°C no escuro por 4 horas e, em seguida, 90 μ L de uma solução de SDS (10 % p/v em HCL 0,1 N) foram adicionados. As placas ficaram em repouso por 17 horas para completa solubilização dos cristais de

formazan e, por fim, foi realizada leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas. Como critério de correção foi usada a média do branco, formado por poços contendo apenas DMEM que receberam MTT e SDS semelhantemente aos grupos experimentais.

Para o cálculo da viabilidade celular, inicialmente foi subtraída a média das absorbâncias do branco de todos os poços. A viabilidade foi calculada em percentual levando em consideração as absorbâncias dentro dos grupos experimentais. Para o cálculo, a média das absorbâncias do grupo controle foi considerada como sendo 100% de viabilidade, os demais grupos receberam valor proporcional calculado por regra de três simples.

4.5 Determinação dos níveis de KIM-1

A molécula Kim-1 é uma glicoproteína transmembranar (38,7 KDa) de adesão epitelial tubular proximal. Possui dois domínios: um mucina e o outro, um ectodomínio imunoglobulina-like composto por seis cisteínas (MCWILLIAM *et al.*, 2014). É um biomarcador de sinalização da lesão no epitélio renal com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da lesão renal aguda em estágios precoces (WASUNG; CHAWLA; MADERO, 2015; MOLEDINA; PARIKH, 2018).

A determinação dos níveis de KIM-1 foi realizada no sobrenadante ou homogenato de células LLC-MK2 com o uso do ensaio imuno absorvente ligado à enzima (ELISA) comercial (R&D Systems, INC – Cat. DY1750, Minneapolis, MNN). Poços de placa de ELISA foram revestidos com a diluição do anticorpo de captura (72 µg/mL) para uma concentração de trabalho de 0,4 µg/mL em PBS, com o volume final de 100µL em cada poço. A placa foi selada e incubada overnight à temperatura ambiente. Cada placa foi lavada duas vezes com 400µL de tampão de lavagem (Tween-20 a 0,05% em PBS). As placas foram bloqueadas pela adição de 300 µL de BSA a 1% em PBS durante 2 horas.

Para análise, 100µL de padrão de KIM-1 recombinante humano (nas concentrações de 0 a 20 ng/mL) e sobrenadante do cultivo das células LLC-MK2 foram adicionados aos seus respectivos poços e colocados à temperatura ambiente por 2h. A placa foi lavada novamente e 100µL de anticorpo biotilado caprino anti-KIM-1 (400 ng/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 2 horas, a etapa de lavagem foi repetida e, após, 100µL de estreptavidina-HRP

foram adicionados a cada poço e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após lavagem, 100µL da solução de substrato foram adicionados a todos os poços e incubados à temperatura ambiente durante 7 minutos. A reação foi parada adicionando 50µL de solução de paragem a todos os poços. A absorbância foi medida a 450nm com uma correção de absorbância a 540 nm. A concentração de KIM-1 foi calculada com base na curva padrão e expressa em termos absolutos em ng/mg de proteína.

As mensurações da liberação de KIM-1 foram realizadas no sobrenadante das células tratadas com losartana, lisinopril e quercetina 100 µg/mL. Para o grupo controle foram utilizadas células tratadas com PBS e um grupo submetido à I/R foi analisado para realizar as comparações. Em seguida, a análise do KIM-1 foi realizada no homogenato de células analisando grupo controle, I/R e células tratadas com quercetina 200, 100 e 50 µg/mL.

4.6 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células LLC-MK2

A fim de se avaliar o efeito da quercetina sobre o metabolismo óxido-redutor no modelo de lesão renal *in vitro*, foi utilizado o ensaio de mensuração das substâncias relativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS e a determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).

Para a realização dos ensaios, foi extraído um lisado celular. As células LLC-MK2 em cultivo foram coletadas, lavadas com PBS gelado e suspensas em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M, com a adição de EDTA 5 mL, Triton x-100 0,1% e 0,6% de ácido sulfossalicílico (pH 7,5); a suspensão foi, então, sonicada em água gelada durante 3 minutos e, posteriormente, congelada em freezer -80 °C e descongelada, posteriormente, a fim de garantir o rompimento das membranas. A suspensão obtida foi centrifugada a 3000 g por 4 minutos e o sobrenadante foi armazenado em freezer a -80 °C. Previamente às análises, o conteúdo proteico do lisado foi mensurado, utilizando-se a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.6.1 Ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) são representadas, principalmente, pelo Malondialdeído (MDA) e formadas como um subproduto da peroxidação lipídica (KIL et al., 2014).

Para a determinação do TBARS, 100 µL do sobrenadante foi misturado a 100 µL de ácido tricloroacético 40% e 400 µL de ácido tiobarbitúrico 60%. A mistura foi incubada a 96 °C por 30 minutos e, em seguida, mantida em banho de gelo. Para parar a reação, adicionou-se 200 µL de ácido acético glacial à suspensão que foi centrifugada (1700 g, 30 minutos). O sobrenadante obtido foi lido em espectrofotômetro (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido) em leitor de 530 nm. As concentrações de TBARS foram então calculadas usando uma curva de calibração usando malondialdeído (MDA) como padrão e expressas em ng de TBARS/ µg de proteínas das células (MIHARA et al., 1980).

4.6.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH).

O ensaio de determinação da concentração da GSH, uma enzima antioxidante hidrossolúvel, baseia-se na reação do reagente de Ellman, 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita pela leitura da absorbância a 412 nm, conforme descrito por Sedlak & Lindsay (1968).

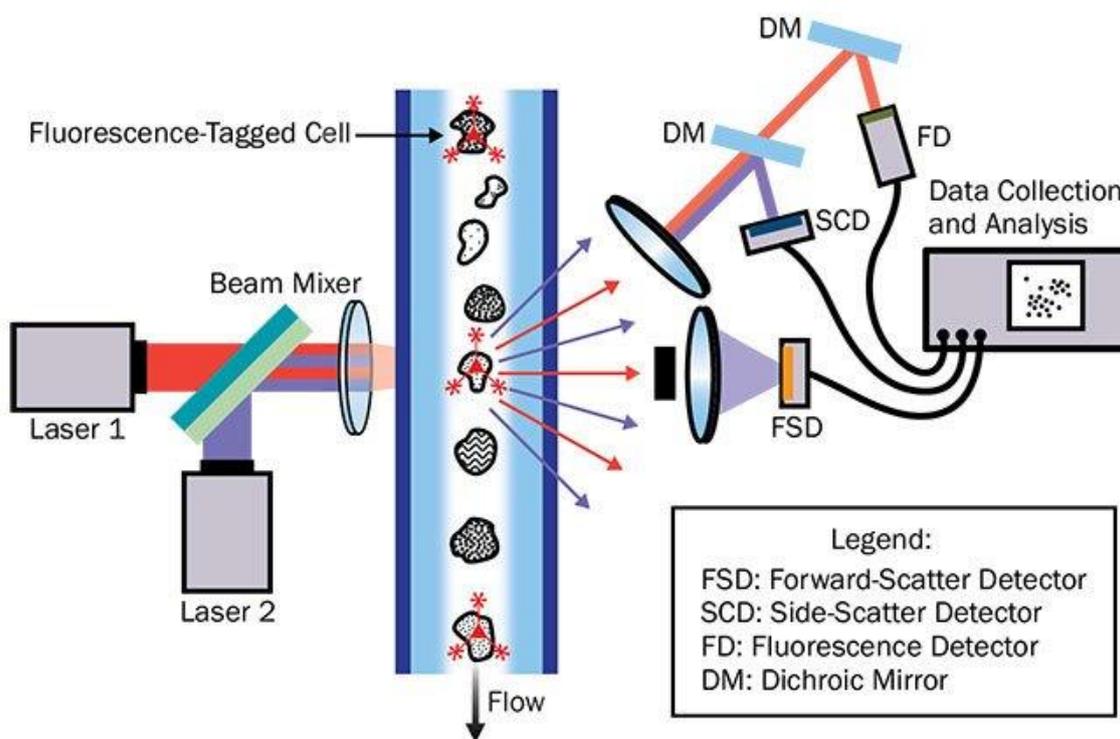
Para a determinação da glutathiona reduzida (γ -glutamyl-L-cisteinilglicina, GSH), 400 uL das amostras da suspensão de lisado celular foram adicionados a 800 uL de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 uL do cromógeno DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)), também chamado reagente de Ellman. Por fim, a absorbância foi medida por espectrofotometria a 412 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido), usando como curva de calibração um padrão de GSH. Os resultados foram expressos em nmol GSH/ mg de proteínas (SHARMA et al., 1997).

4.7 Ensaios de Citometria de Fluxo

A Citometria de fluxo é uma metodologia usada para o estudo de diversas características celulares, uma vez que um dos princípios deste método é a manutenção das condições vitais da célula após sua manipulação, permitindo investigações mais aprofundadas do comportamento biológico da população celular em estudo, inclusive de avaliação funcional. Para realização das análises, as células são conduzidas por um fluxo de líquido unidirecional e forçadas a passar individualmente por um canal, onde são interceptadas por feixes de luz provenientes de lasers específicos. Cada partícula é analisada através de uma dispersão de luz visível e um ou mais parâmetros de fluorescência. A dispersão de luz visível é mensurada em duas diferentes direções (Figura 5), sendo a direção frontal (FSC – Forward Scatter) indicativa do tamanho celular, e a lateral (SSC – Side Scatter), de sua complexidade interna e granulosidade (McKINNON, 2019).

Além disso, quando células ou outras partículas são marcadas com fluorocromos, o feixe luminoso provoca a excitação dessas moléculas e consequente emissão de luz detectada em leitores de fluorescência (FL1, FL2, FL3 e FL4), sendo assim utilizados com o intuito de rastrear estados fisiológicos ou patológicos das células em estudo (HAN *et al*, 2015).

Figura 5. Princípio do ensaio em Citometria de Fluxo



Fonte: https://www.photonics.com/Articles/Photodetectors_in_Flow_Cytometers/a64058

Acesso em 03/05/2021.

4.7.1 Preparação da análise

As células LLC-MK2 foram cultivadas em placas de 24 poços, em condições normais de oxigenação e/ou submetidas ao procedimento de I/R tratadas ou não com quercetina foram lavadas com PBS, tripsinizadas e deslocadas. A fim de permitir a marcação fluorescente, o sobrenadante foi substituído por tampão de ligação (Hepes 10mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4). Então, as células foram analisadas no equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, New Jersey, USA) utilizando o *CellQuest ProTM software*. Em cada tubo foram contadas 10⁴ células detectadas pelo laser de argônio.

4.7.2 Avaliação do mecanismo de morte celular

Para a análise, foi utilizado o 7-amino-actinomicina D (7AAD), um marcador fluorescente de DNA, impermeável à membrana celular intacta, capaz de complexar-se com o DNA, excitando-se com o laser de 488 nm e possuindo emissão máxima de 647 nm, sendo, dessa forma, um marcador importante de aumento de permeabilidade de membrana, um evento característico nas células necróticas. Concomitantemente, foi utilizado o marcador Anexina V-Ficoeritrina (Anexina V-PE) que se liga à fosfatidilserina na presença de íons cálcio, uma proteína de membrana (36 KDa), externalizada durante processo de morte celular programada por apoptose.

Para a análise, as células LLC-MK2 de cada poço foram suspensas em 100 μ L do tampão de ligação; nos tubos foram adicionados 5 μ L de 7AAD e 5 μ L de Anexina V-PE (0,5 mg/mL cada). O procedimento foi realizado com a utilização do kit comercial Annexin V PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences em observação às orientações do fabricante. Após 15 minutos de incubação no escuro, foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no FACSCalibur (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em percentual de células não marcadas; células marcadas por 7AAD, indicativo de necrose; células marcadas por Anexina-V, indicativo de apoptose; e células duplamente marcadas, indicativo de apoptose tardia.

4.7.3 Avaliação do Potencial Transmembrânico Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para a análise do efeito de quercetina sobre o potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Trata-se de um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permitindo que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas, onde emite fluorescência. Assim, alterações ao nível da membrana mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectadas em ensaios de citometria de fluxo por meio da diminuição da emissão de fluorescência vermelha

mitocondrial, indicando a redução do acúmulo de Rh-123 nessa organela (JOHNSON *et al.*, 1980).

As células LLC-MK2, após serem submetidas ao procedimento de Isquemia/Reperusão pelo método da câmara anaeróbica, foram tratadas com Quercetina, como descrito previamente. Após 12 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o “pellet” de células marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 µg/mL) por meia-hora para, em seguida, ser processado em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm.

Os resultados foram expressos como intensidade relativa de fluorescência dos quais foi calculada uma média geométrica e atribuído valor 1,0 para o controle. As médias dos demais grupos receberam valores proporcionais calculados por regra de três simples, conforme previamente descrito (JOHNSON *et al.*, 1980; POKORNÝ *et al.*, 2014).

4.8 Docking molecular

4.8.1 Obtenção e otimização de estruturas moleculares.

A estrutura molecular da Quercetina (PUBCHEM CID 5280343) e dos seguintes ligantes controle: Inibidor da ECA Enalaprilate (PUBCHEM CID 5388962); Inibidor do receptor AT1 Losartana (PUBCHEM CID 3961) foram projetados usando o software de licença acadêmica MarvinSketch® versão 20.13 (CSIZMADIA, 2019) do pacote de software ChemAxon © Marvin (<https://chemaxon.com/products/marvin>). A estrutura tridimensional dos compostos selecionados foi otimizada usando o método clássico de campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94) (HALGREN, 1996) implantado no software Avogadro® livre, programado para realizar um ciclo de 4 interações do Steepest Algoritmo de descida, onde a estrutura mais estável é obtida minimizando a energia potencial (E) de uma molécula em seu estado estacionário, com a contribuição de uma força (kb) exercida em uma ligação entre dois átomos ($r - r_0$) e a soma inclui todas as ligações do espaço tridimensional da molécula (CURTIS DE *et al.*, 2012; SANT'ANNA CMR *et al.*, 2009).

4.8.2 Análise de docking molecular

A estrutura cristalográfica da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA – PDB ID: 1O86) e do receptor AT1 da angiotensina (PDB ID: 4YAY) foram obtidos do Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). As simulações de acoplamento molecular foram realizadas usando o AutoDockVina Versão 1.1.2. Para cada análise, 100 ciclos de 10 simulações independentes foram realizados aplicando o algoritmo Lamarkian Genetic (Förster & Shityakov, 2014). Moléculas não proteicas foram removidas e hidrogênio polar foi adicionado usando o software AutoDock Tools 1.5.6 (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). Os resultados do ajuste foram agrupados com Desvio Quadrático Médio da Raiz (RMSD) menor que 2,0Å. As conformações foram analisadas usando o pacote UCSF Chimera 1.8 (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (PETTERSEN, *et al.*, 2004) e Discovery visualizer. As ligações de hidrogênio foram classificadas quando a distância entre os átomos foi <3.1 Å, como fortes, entre 3.1 e 3.5 Å, como intermediárias e >3.5 Å como fracas (BIOVIA, 2017).

4.9 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido pelo post-test de Bonferroni. Como critério de significância foi aceito $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism5.0 (EUA).

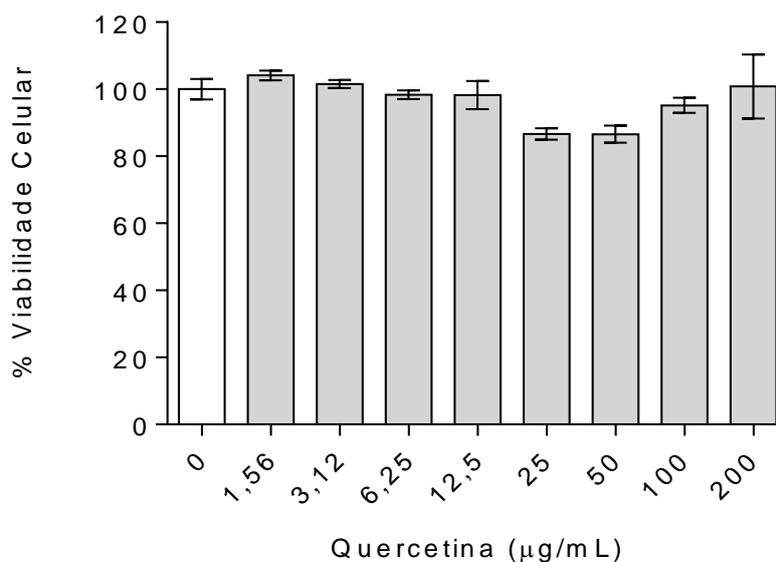
RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Ensaios de viabilidade celular

A citotoxicidade da Quercetina sobre as células LLC-MK2, foi avaliada pelo ensaio MTT com o intuito de determinar a faixa de concentrações a ser utilizada nos ensaios posteriores. Nas concentrações testadas, a Quercetina não diminuiu a viabilidade celular (Figura 6).

Figura 6. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade da Quercetina sobre células renais LLC-MK2.

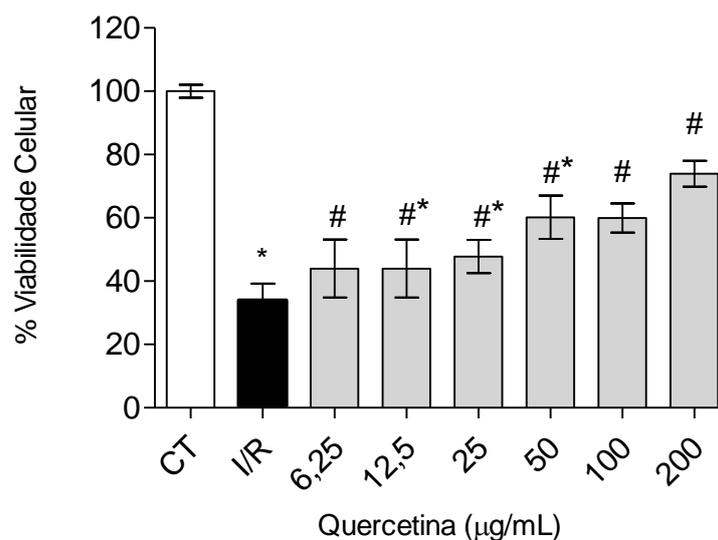


Fonte: Elaborado pelo autor.

As lesões por isquemia/reperfusão têm como característica a hipóxia associada à rápida oxigenação e consequente desequilíbrio redox. Dessa maneira, é possível observar na figura 7 que o protocolo padronizado de I/R reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 50% em comparação ao controle. Entretanto, as células que foram submetidas a I/R e foram subsequentemente tratadas com Quercetina apresentaram um efeito de proteção celular, indicado pela manutenção ou aumento na viabilidade celular. Especialmente, nas três maiores concentrações (200, 100 e 50 µg/mL), apresentando 73,9;

63,9; e 60,2% de viabilidade celular, respectivamente, quando comparadas ao controle após 12h.

Figura 7. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células renais LLC-MK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após tratamento com Quercetina.

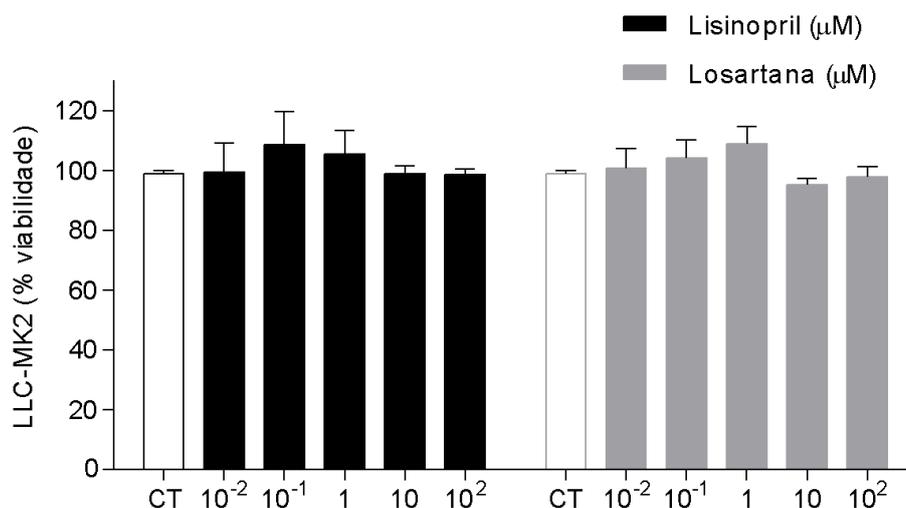


Os resultados são mostrados como média ± SEM. $p < 0,05$ comparado aos grupos de controle de veículo (CT). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, CT = Controle negativo; I/R = isquemia/reperfusão; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

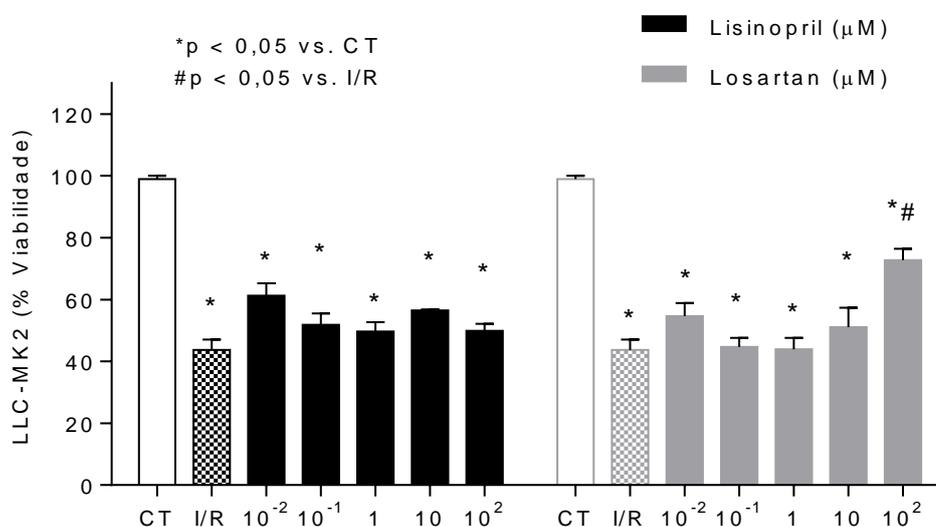
A citotoxicidade dos fármacos utilizados para comparações posteriores, Losartana e Lisinopril, também foi acessada pelo método do MTT. Nas análises, não foi demonstrada toxicidade sobre células LLC-MK2 nas concentrações testadas (Figura 8). Ademais, quando as células expostas ao procedimento de I/R foram tratadas com lisinopril, este não foi capaz de aumentar a viabilidade celular. Já o tratamento com losartana resultou em um acréscimo na viabilidade celular apenas na maior concentração ($1 \times 10^2 \mu\text{M}$) (Figura 9).

Figura 8. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade de Losartana e Lisinopril sobre células renais LLC-MK2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células renais LLC-MK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após tratamento com Quercetina.



Os resultados são mostrados como média ± SEM. $p < 0,05$ comparado aos grupos de controle de veículo. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, C- = Controle negativo; I/R = isquemia/reperfusão; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo I/R.

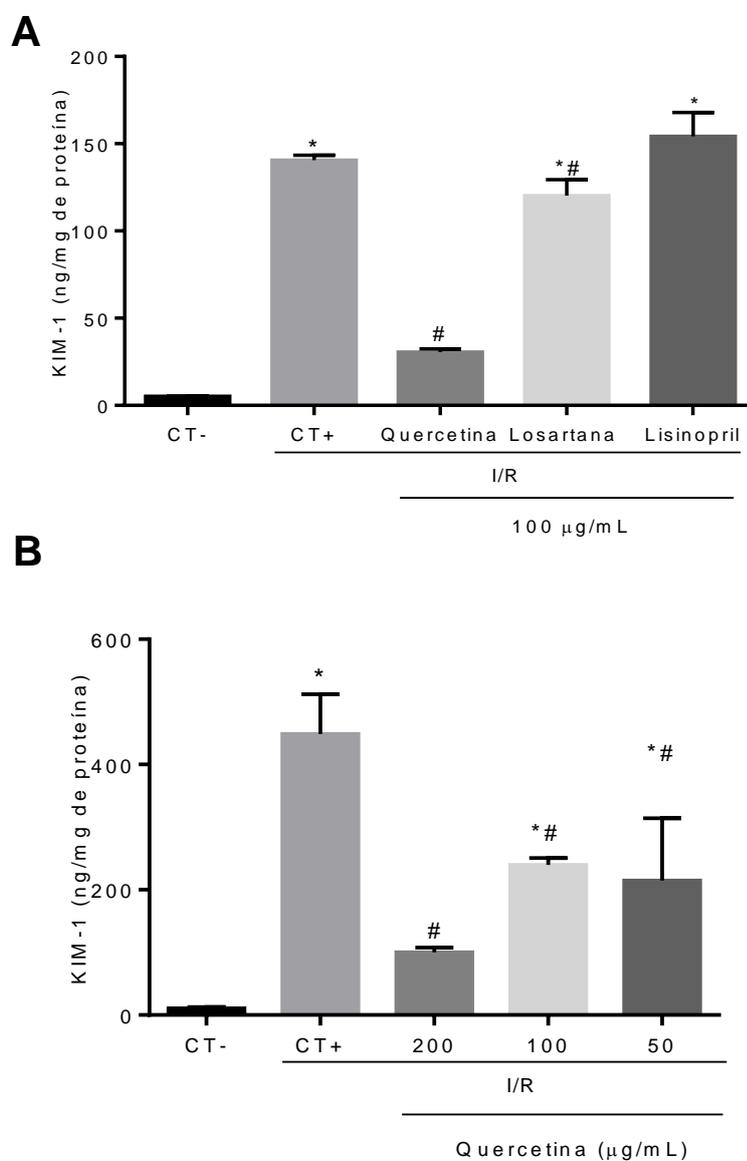
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Mensuração dos níveis de KIM-1

Para a avaliação do dano específico nas células tubulares renais, foram mensurados os níveis de liberação de KIM-1 no sobrenadante da cultura celular. Na figura 11, é evidenciado que o protocolo I/R foi capaz de aumentar os níveis de KIM-1 em comparação ao grupo controle ($140,5 \pm 1,2$ vs. $5,2 \pm 0,1$ ng/mg de proteína). Adicionalmente, losartana ($120,2 \pm 3,7$ ng/mg de proteína) e quercetina ($30,5 \pm 0,7$ ng/mg de proteína) se mostraram capazes de reduzir os danos celulares inerentes ao processo de I/R. Comparativamente, a quercetina apresentou resultados superiores, pois, na mesma concentração ($100\mu\text{g/mL}$), foi capaz de reduzir a liberação de KIM-1 de maneira mais acentuada (Figura 10A).

A fim de melhor compreender o efeito protetor de quercetina nas células tubulares LLC-MK2, foi realizada a determinação de KIM-1 no homogenato de células tratadas com diferentes concentrações de quercetina. No homogenato, os níveis de KIM-1 após o procedimento de I/R foram elevados para $448,6 \pm 25,9$ ng/mg de proteína, enquanto o controle apresentou $10,6 \pm 0,7$ ng/mg de proteína. No teste, a presença de quercetina foi capaz de reduzir a liberação de KIM-1 em todas as concentrações testadas, especialmente em $200\mu\text{g/mL}$, apresentando o valor de $100,1 \pm 3,1$ ng/mg de proteína (Figura 10B).

Figura 10. Níveis de Molécula de Lesão Renal (KIM-1) no sobrenadante de células renais LLC-MK2.



Os dados são expressos como média \pm SEM. I/R = Isquemia/reperfusão. Os dados analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. I/R.

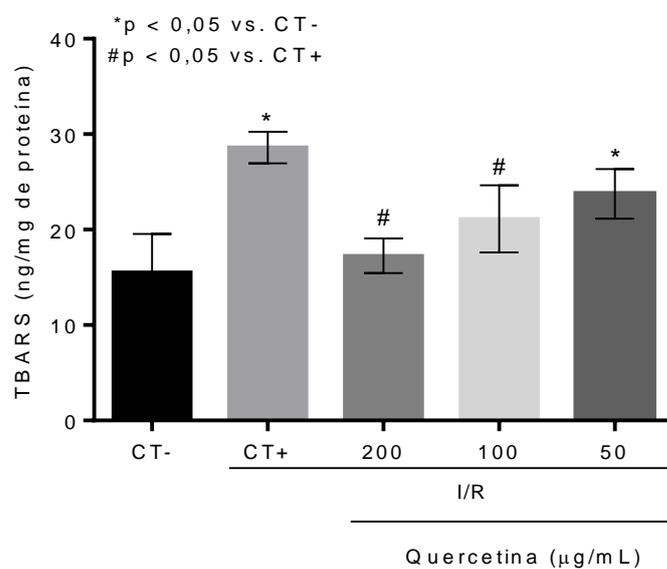
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células LLC-MK2

A fim de avaliar a presença de ERO e os danos causados pelo estresse oxidativo nas células, os níveis de TBARS e GSH foram mensurados. Após o procedimento I/R, os níveis de TBARS apresentaram um aumento em comparação com o controle ($28,6 \pm 0,6$ vs. $15,5 \pm 1,6$ ng/mg de proteína), evidenciando a ocorrência da peroxidação lipídica no processo (Figura 11). O tratamento com quercetina (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de diminuir o acúmulo de TBARS.

Ademais, o protocolo I/R foi também capaz de estimular a oxidação da glutatona, diminuindo os níveis de GSH reduzida ($12,5 \pm 0,6$ nmol/mg de proteína) em comparação ao controle ($43,1 \pm 1,2$ nmol/mg de proteína). Em todas as concentrações, a quercetina foi capaz de aumentar os níveis de GSH, especialmente na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ ($23,1 \pm 0,8$ nmol/mg de proteína) (Figura 12), sugerindo que a quercetina exerce um efeito antioxidante nas células LLC-MK2, aumentando as defesas antioxidantes das células e impedindo a oxidação de lipídios, especialmente os fosfolipídios de membrana.

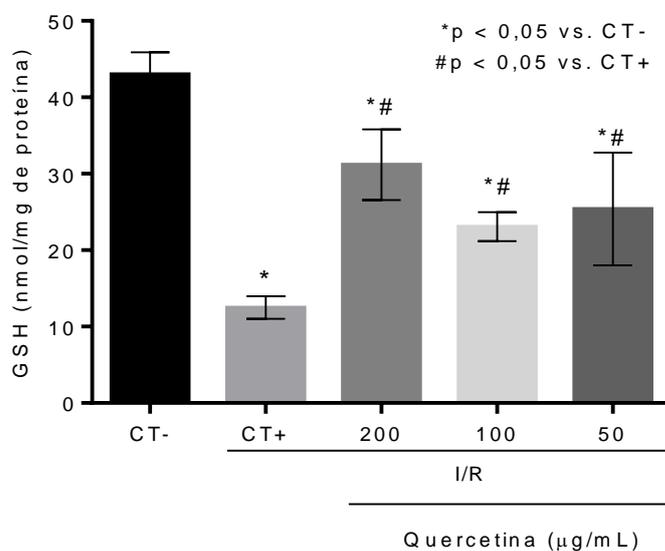
Figura 11. Avaliação do estresse oxidativo através da medida das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células renais LLC-MK2.



Os dados são expressos como média \pm SEM. CT- = Controle negativo; CT+ = Controle positivo; I/R = isquemia/reperfusão. Os dados analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs. I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12. Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em células renais LLC-MK2.



Os dados são expressos como média \pm SEM. C- = Controle negativo; I/R = isquemia/reperfusão. Os dados analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs. I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Ensaios de Citometria de Fluxo

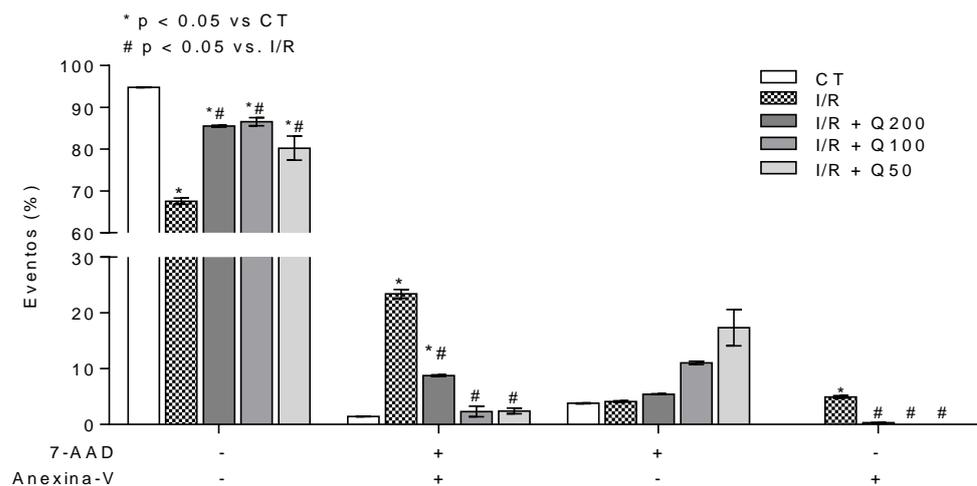
5.4.1 Avaliação do mecanismo de morte celular

Com o objetivo de avaliar o mecanismo de morte celular envolvido no modelo de I/R, realizou-se o ensaio de citometria de fluxo com a marcação das células por 7AAD/Anexina V-PE.

Quando submetidas a I/R, as células mostraram marcação significativa por ambos os marcadores (7AAD+/Anx+), correspondendo a 23,4% dos eventos, comparados ao controle, sugerindo que o mecanismo de morte celular dessas células pode ter ocorrido por apoptose tardia, ou necrose secundária (Figura 13). Os gráficos de densidade comparativa são mostrados na figura 14. Nos grupos tratados, a quercetina foi capaz de reduzir a morte celular em todas as concentrações (200, 100 e 50 μ g/mL), pela redução

da marcação pelos dois fluorocromos. Destacando-se a concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que reduziu a população duplo-marcada para 8,7% dos eventos.

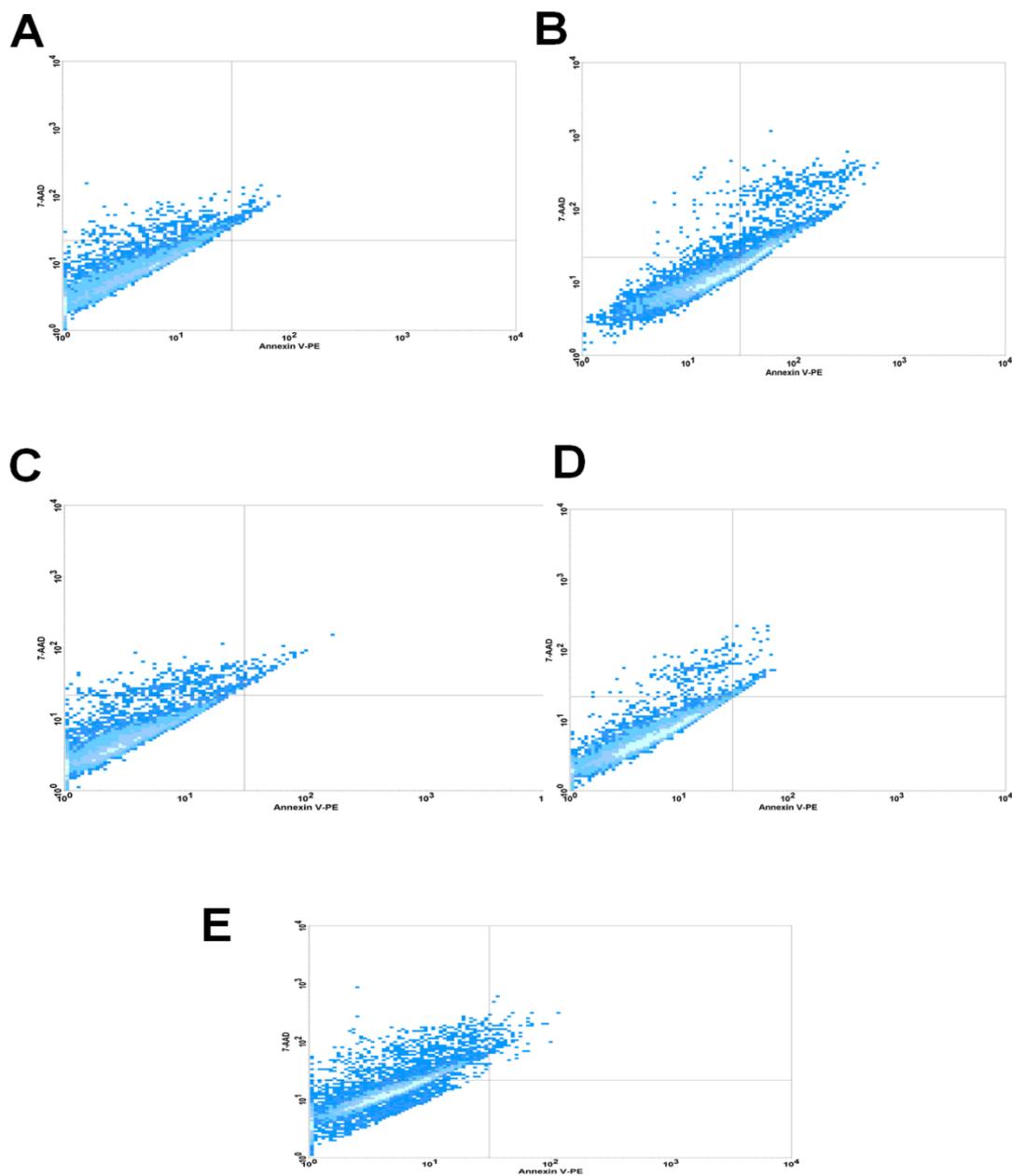
Figura 13. Representação do ensaio de avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por Anx (anexina V).



Os dados foram expressos em média da percentagem de distribuição de eventos (células) \pm SEM. I/R = isquemia/reperfusão; *p < 0,05 vs. grupo controle; #p < 0,05 vs. I/R. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14. Gráficos *density plot* representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V.



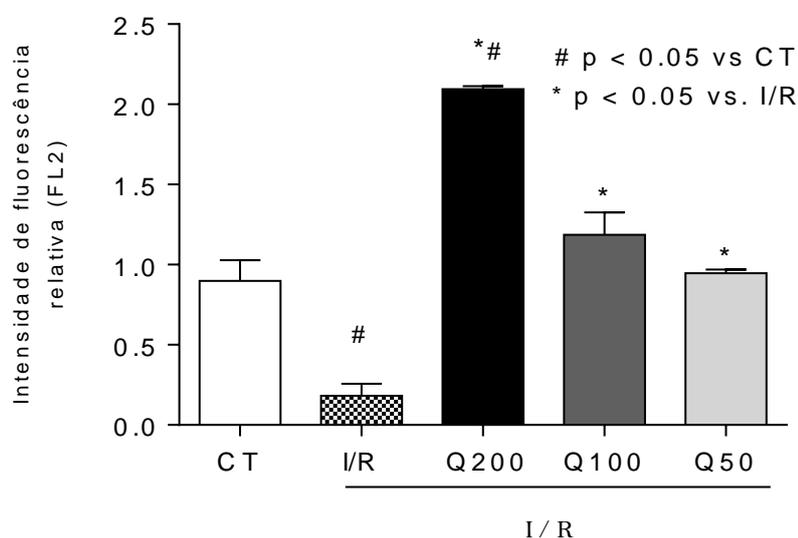
(A) Grupo controle; (B) grupo Isquemia/Reperusão (I/R); (C) células tratadas com Quercetina a 200µg/mL; (D) células tratadas com Quercetina a 100µg/mL; (E) células tratadas com Quercetina a 50µg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Situações de hipóxia, ou de acúmulo de espécies reativas de oxigênio como no procedimento de I/R, podem levar à disfunção mitocondrial, com alteração do potencial elétrico transmembrana, essencial para a respiração celular. Para isso, foi utilizado o marcador Rodamina 123. A figura 15 mostra os resultados em termos de intensidade de fluorescência relativa. É possível observar que, após I/R, as células apresentaram um decréscimo do potencial transmembrânico mitocondrial pela redução da intensidade de fluorescência, com aproximadamente 20% da intensidade mostrada no grupo controle. Após o tratamento com a quercetina, houve um aumento no $\Delta\psi_m$, destacando-se a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ que foi capaz de elevar os valores para mais do que o dobro do controle. Histogramas representativos das populações celulares são mostrados nas Figuras 16.

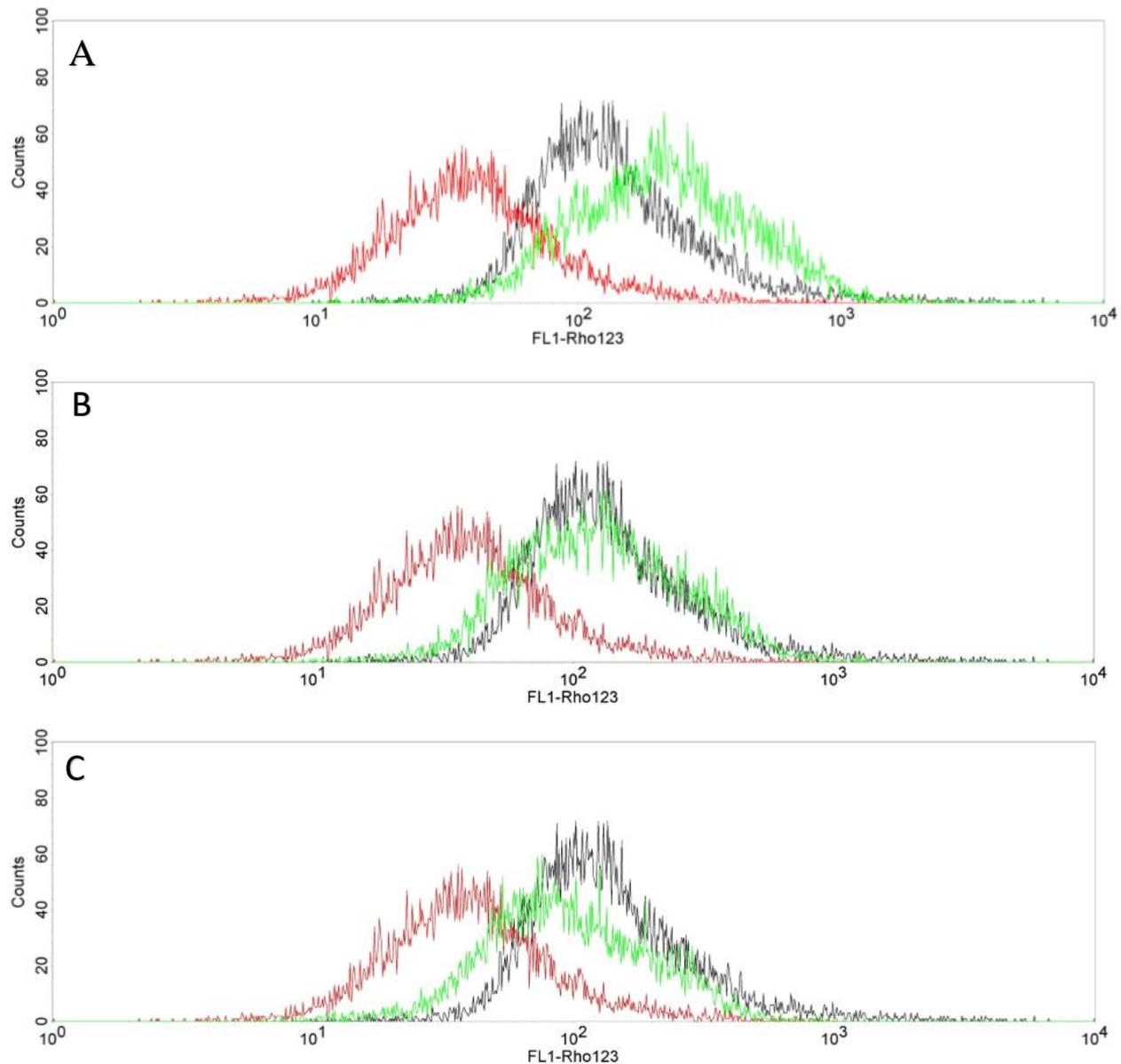
Figura 15. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células renais LLC-MK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.



Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle \pm SEM. $p < 0,05$. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. I/R. I/R = Isquemia/reperfusão.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com Quercetina na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (A), 100 $\mu\text{g/mL}$ (B) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (C).



Estão apresentados o grupo controle (linha preta), I/R (isquemia/reperfusão - linha vermelha) e tratado com Quercetina (linha verde). Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Ensaio de Docking molecular

5.5.1 Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA)

Após a realização das simulações de docking molecular, foram obtidos os resultados referentes às regiões de interação, energias de afinidade e distâncias ajustadas pelo *Root Mean Square Deviation* (RMSD) da quercetina com a ECA e o receptor de Angiotensina AT1, bem como seus respectivos inibidores conhecidos: enalaprilate e losartana.

Com o objetivo de avaliar a qualidade das interações como satisfatória, foram considerados resultados com maior entalpia de ligação; ou seja, uma energia de interação satisfatória seria aquela que resultaria em uma maior perda de energia. O valor de referência para uma energia de interação satisfatória é de -6,0 Kcal / mol. Já para o RMSD, valores <2,0 Å foram adotados como critérios de aceitação.

Quando as simulações de docking molecular com a ECA foram realizadas, observou-se que a quercetina apresentou potencial para se ligar ao mesmo alvo que o enalaprilate e o lisinopril (Fig. 17 A-C), mas interagindo com diferentes aminoácidos. Assim, foi possível observar que as interações entre quercetina e enalaprilate ocorrem com a mesma energia de afinidade (-7,4 Kcal / mol), diferindo apenas nos valores de RMSD, em que a quercetina foi de 1,884 Å, enquanto o RMSD para o enalaprilate foi de 1,078 Å, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Energia de afinidade dos ligantes com a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

Inibidor	ΔG (Kcal/mol)	RMSD (Å)
Enalaprilate	-7,4	1,078
Quercetina	-7,4	1,884
Lisinopril (redock)	-7,2	1,915

Legenda: ΔG – Energia livre de Gibbs. RMSD – Desvio padrão quadrático da média.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao analisar as interações específicas dos compostos com os resíduos de aminoácidos, a quercetina demonstrou formar interações com ECA, principalmente ligações de hidrogênio fortes com histidina (HIS) 353 e 513, serina (SER) 355 e glutamato (GLU) 403, e interações hidrofóbicas com resíduo de fenilalanina (PHE) 391 (Tabela 2). Existem ainda outras interações em forma de pi-pi T com o resíduo de histidina 410 e uma pi-alkil com o resíduo de valina (VAL) 518, como mostrado nos mapas 2D na Figura 17 (D-E).

Tabela 2. Tipos de interações e distância (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da Enzima Conversora de Angiotensina

Resíduo de Aa	Quercetina/ECA		Enalaprilate/ECA	
	Distância (Å)	Tipo de interação	Distância (Å)	Tipo de interação
ALA1	-	-	3.70	Interação hidrofóbica
HIS353	1.92	Ligação de hidrogênio	-	-
SER355	3.67	Ligação de hidrogênio	-	-
SER355	3.38	Ligação de hidrogênio	-	-
TRP357	-	-	3.68	Interação hidrofóbica
TRP357	-	-	3.92	Interação hidrofóbica
TYR360	-	-	3.89	Interação hidrofóbica
PHE391	3.62	Interação hidrofóbica	-	-
GLU403	2.38	Ligação de hidrogênio	-	-
HIS513	2.44	Ligação de hidrogênio	-	-
VAL518	-	-	3.80	Interação hidrofóbica

Fonte: Elaborado pelo autor.

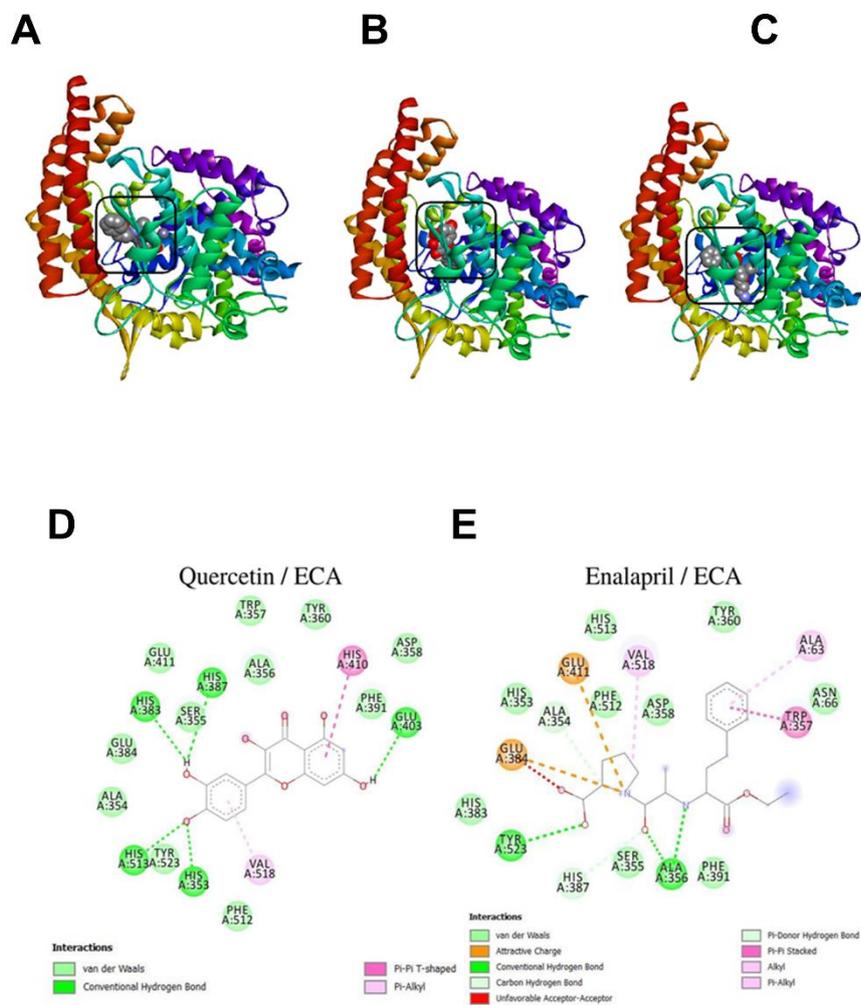
Tabela 3. Classificação das ligações de hidrogênio e distância (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da Enzima Conversora de Angiotensina.

Resíduo de Aa	Quercetina/ECA		Enalaprilate/ECA	
	Distância (Å)	Classificação da ligação de hidrogênio	Distância (Å)	Classificação da ligação de hidrogênio
HIS353	1.92	Forte	-	-
SER355	3.67	Fraca	-	-
SER355	3.38	Intermediária	-	-
GLU403	2.38	Forte	-	-
HIS513	2.44	Forte	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

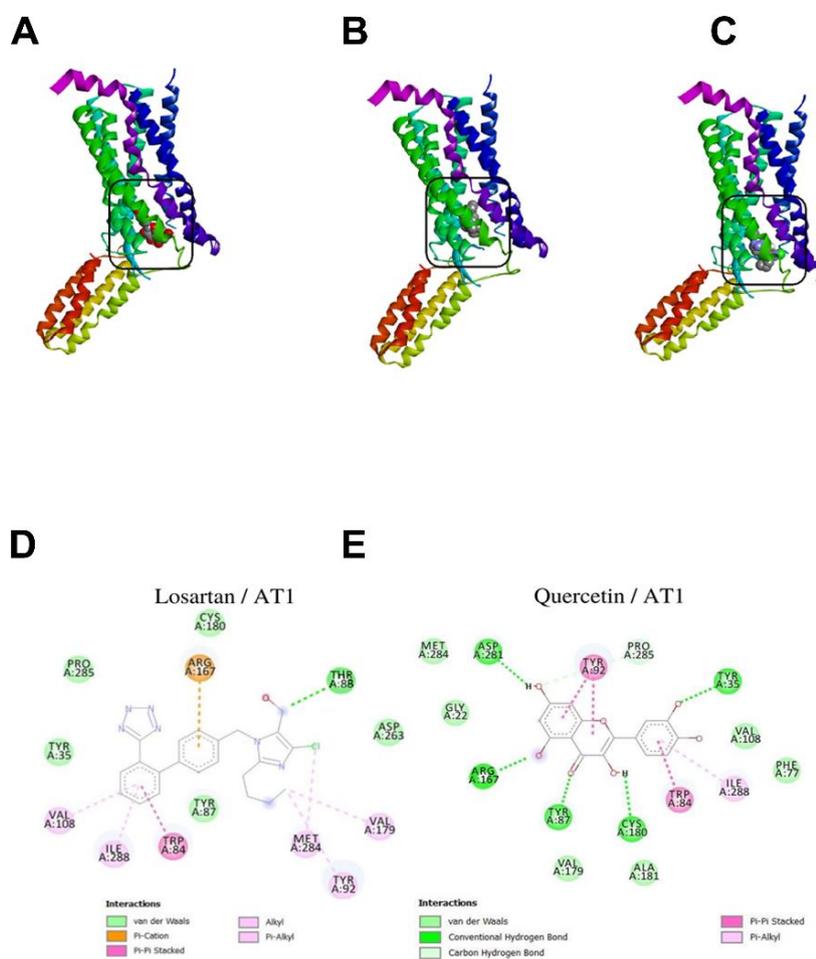
O enalaprilate apresenta interações hidrofóbicas principalmente com resíduos de alanina (ALA) 1, triptofano (357), tirosina (TYR) 360 e valina (VAL) 518. Além disso, outras interações de atração de carga com resíduos de glutamato 384 e 411, empilhamento pi-pi com o resíduo de triptofano (357) e pi-alquil com os resíduos de alanina (ALA) 63 e valina (VAL) 518 que não contribuem significativamente para a afinidade da molécula com o receptor, conforme Figura 18.

Figura 17. Representação da interação de ligantes com a Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA) por docking molecular. (A) Enalaprilate; (B) Quercetina e (C) Lisinopril. Mapas 2-D que representam as interações de (D) Quercetina e (E) Enalaprilate com o ACE.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18. Representação da interação de ligantes com o receptor de Angiotensina AT1 por docking molecular. (A) Quercetina; (B) ZD7 e (C) Losartana. Mapas 2-D que representam as interações de (D) Losartan e (E) Quercetina com o ACE.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando as energias das interações e os valores de RMSD conforme Tabela 4, a quercetina apresentou energia de afinidade satisfatória, assim como o losartan de -8,1 Kcal / mol, indicando estabilidade na interação. Em comparação, o inibidor teórico ZD7 apresentou uma energia superior, -10,4 Kcal / mol. Já para RMSD, a quercetina apresentou valor inferior em relação às demais (1,524 Å), indicando uma interação mais específica.

Tabela 4. Afinidade energética dos ligantes com o receptor de Angiotensina AT1.

Inibidor	ΔG (Kcal/mol)	RMSD (Å)
ZD7 (redock)	-10,4	1,843
Losartana	-8,1	1,900
Quercetina	-8,1	1,524

Legenda: ΔG – Energia livre de Gibbs. RMSD – Desvio padrão quadrático da média.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 18 (D-E) mostra os mapas 2-D representando o sítio de ligação da quercetina com a enzima, mostrando os principais resíduos envolvidos. A quercetina mostrou dois tipos principais de interação, a maioria das quais são ligações de hidrogênio fortes com resíduos de tirosina (TYR) 35; 87, arginina (ARG) 167, cisteína (CYS) 180 e aspartato (ASP) 281 e interações de empilhamento pi-pi com resíduos de triptofano (TRP) 84 e tirosina (TYR) 92 (Tabela 5).

Tabela 5. Tipos de interação e distâncias (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do receptor AT1.

Resíduo de Aa	Quercetina/AT1		Losartana/AT1	
	Distância (Å)	Tipo de interação	Distância (Å)	Tipo de interação
Tyr35	2.02	Ligação de Hidrogênio	-	-
Trp84	-	-	3.76	Interação hidrofóbica
Trp84	-	-	3.45	Interação hidrofóbica
Trp84	-	-	4.13	π -Stacking
Trp84	4.07	π -Stacking	4.16	π -Stacking
Tyr87	1.98	Ligação de Hidrogênio	3.63	Interação hidrofóbica
Thr88	-	-	2.50	Ligação de Hidrogênio
Tyr92	4.06	π -Stacking	3.64	Interação hidrofóbica
Tyr92	-	-	3.86	Interação hidrofóbica
Tyr92	-	-	3.70	Interação hidrofóbica
Val108	-	-	3.51	Interação hidrofóbica
Arg167	2.97	Ligação de Hidrogênio	5.07	π -Cátion
Val179	-	-	3.85	Interação hidrofóbica
Cys180	2.40	Ligação de Hidrogênio	-	-
Asp263	-	-	3.41	Interação halogênica
Asp281	2.19	Ligação de Hidrogênio	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6. Classificação das ligações de hidrogênio e distância (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos receptor AT1.

Resíduo de Aa	Quercetina/AT1		Losartana/AT1	
	Distância (Å)	Classificação da ligação de hidrogênio	Distância (Å)	Classificação da ligação de hidrogênio
Tyr35	2.02	Forte	-	-
Tyr87	1.98	Forte	-	-
Arg167	2.97	Forte	-	-
Cys180	2.40	Forte	-	-
Asp281	2.19	Forte	-	-
Thr88	-	-	2.50	Forte

Fonte: Elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

6. Discussão

O presente trabalho mostrou que a quercetina foi capaz de prevenir o dano oxidativo induzido em células renais tubulares após eventos isquêmicos, com aumento da viabilidade celular, diminuição da oxidação de lipídios e da glutatona, além de prevenir a morte celular após o procedimento de I/R. Esse potencial pode estar relacionado à capacidade de prevenir a morte celular, principalmente pela proteção às mitocôndrias contra a despolarização, dados corroborados pela redução do número de células marcadas com anexina V e 7AAD, indicando uma redução no processo de morte celular. Esses achados são importantes porque a isquemia diminui a oferta de oxigênio. Como o oxigênio é o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória celular, a reperfusão, conseqüentemente, leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo (MARTIN *et al.*, 2019).

A isquemia se caracteriza pela diminuição da oferta de oxigênio e substratos energéticos aos tecidos. Já a reperfusão, ou seja, a reposição da oxigenação tecidual deve acontecer em ambiente controlado, evitando o acúmulo de ERO e, até mesmo, danos aos lipídios celulares, ácidos nucléicos e proteínas funcionais e estruturais. Portanto, várias estratégias têm sido estudadas com o objetivo de promover uma reperfusão segura; as substâncias antioxidantes são os principais candidatos a esta abordagem farmacológica. Contudo, é necessário prevenir a formação de ERO e, posteriormente, os eventos diretos, bioquímicos e vasculares, a ela associados, ao invés de remover as ERO pré-formadas. Assim, os alvos enzimáticos extensamente estudados, a fim de estabelecer ferramentas nefroprotetoras (El-DESOUKY *et al.*, 2019).

Em conseqüência da I/R, a disfunção mitocondrial é um fenômeno chave que desempenha um papel essencial na progressão da lesão renal aguda, sendo considerada um evento inicial em diversas formas de injúria renal aguda, principalmente porque estas organelas são responsáveis por mais de 90% da produção energética por fosforilação oxidativa, respondendo aos estímulos com processos ordenados, incluindo as dinâmicas mitocondriais de fissão e fusão, além de mitofagia (BHATIA *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o uso de substâncias antioxidantes, sobretudo as de origem natural, têm sido aplicadas amplamente na prevenção e reversão das disfunções celulares decorrentes de danos oxidativos. Flavonoides como a quercetina e outros compostos

fenólicos são amplamente utilizados na literatura como moléculas antioxidantes e, conseqüentemente, se destacam pelo potencial de proteção frente a danos oxidativos e inflamatórios. Em um estudo recente, foi demonstrado que o ácido gálico exibiu efeito protetor contra disfunção mitocondrial e inflamação no rim de ratos, levando a diminuição da formação mitocondrial de ERO, peroxidação lipídica, representada pelo TBARS, além do aumento de glutathione superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, resultando na melhora do potencial mitocondrial transmembrânico e diminuição dos níveis de fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (DEHGHANI *et al.*, 2020).

A Quercetina, especificamente, é uma molécula bastante estudada que, além de antioxidante, apresenta potencial preventivo contra lesões hemodinâmicas e cardiovasculares. Em pesquisas anteriores, foi demonstrado que a quercetina inibiu a disfunção endotelial e aterosclerose devido à inibição enzimática da NADPH oxidase e diminuição da expressão de siRNA de heme oxigenase-1 (LUO *et al.*, 2020). Entre os eventos vasculares, a lesão direta às células tubulares e a conseqüente apoptose são eventos-chave das alterações fisiopatológicas que ocorrem na I/R. O estresse oxidativo desempenha papel fundamental no processo de apoptose renal. Estudos mostraram que, seja por moléculas de transdução de sinal ou por causar dano celular, as ERO podem ativar o processo de apoptose (PRIANTE *et al.*, 2019).

Sabe-se que a Quercetina alivia a fibrose renal ao reduzir o processo de senescência das células tubulares epiteliais por inibição da mitofagia. Vários autores associam esses efeitos ao fato de compostos fenólicos, como os flavonoides poderem inibir a transição epitelial-mesenquimal, evitando a ocorrência de disfunções irreversíveis decorrentes do estabelecimento de lesão renal aguda (MONTES *et al.*, 2018; VARGAS *et al.*, 2018). Foi demonstrado anteriormente que a quercetina apresentou efeitos protetores contra a toxicidade oxidativa em células embrionárias de rim humano (HEK-293), prevenindo o estresse oxidativo (ABARIKWU *et al.*, 2020). Portanto, é necessário encontrar ferramentas farmacológicas que permitam associar melhorias hemodinâmicas com efeitos protetores diretos sobre os túbulos renais, os tecidos mais afetados por lesões isquêmicas, com foco principal em alvos enzimáticos e eventos hemodinâmicos relacionados à hipóxia e estresse oxidativo.

De fato, a quercetina tem sido bastante estudada, principalmente devido à sua compatibilidade com receptores e transportadores biológicos animais, principalmente

humanos, interferindo no processo de estabelecimento de várias patologias. Por exemplo, este flavonóide demonstrou um potencial inibitório na transição epitelial para mesenquimal do sistema tubular renal estimulado por TGF- β 1, um evento importante no estabelecimento da fibrose renal, indicando uma alternativa na prevenção de dano tecidual irreversível associado à lesão renal. Assim, esses eventos resultam na inibição da transcrição da caderina-E, que inibe os processos de proliferação e invasão associados à fibrose renal (LIU *et al.*, 2019).

Esses fatos são relevantes porque a quercetina demonstrou potencial nefroprotetor em modelos de lesão renal obstrutiva. Essa proteção se deve ao seu potencial antioxidante e, conseqüentemente, antiinflamatório, atuando de forma imunomoduladora. Por exemplo, a quercetina demonstrou melhorar os danos renais tubulointersticiais ao modular a polarização dos macrófagos M1 / M2, além de reduzir os níveis de iNOS e IL-12. Evidências indicam que o mecanismo farmacológico envolvido nessa cascata de eventos envolve mudanças significativas na tradução de proteínas, uma vez que os efeitos da quercetina foram associados a atividades reguladas negativamente do NF- κ B p65 (XU *et al.*, 2017).

Nesse sentido, no presente trabalho, a quercetina foi capaz de diminuir a liberação de KIM-1 para o sobrenadante celular. KIM-1 é uma proteína transmembrana presente nas células tubulares proximais, que é clivada por metaloproteinases após lesão. O ectodomínio é detectável na urina, enquanto o domínio transmembrana atua como um receptor de fosfatidilserina, sinalizando morte celular, promovendo fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados. Trabalhos anteriores mostraram que a quercetina diminuiu a nefrotoxicidade induzida por HgCl₂ em ratos Sprague-Dawley, diminuindo o KIM-1 urinário e o inibidor tecidual das metaloproteinases 1 (TIMP-1). A quercetina também reduziu a ativação vascular, diminuindo o fator de crescimento endotelial vascular urinário (VEGF); e inibiu a fagocitose, diminuindo a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) na urina (SHIN *et al.*, 2015).

Em estudo experimental realizado em ratos Wistar, foi observado que a quercetina reduziu a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina devido aos seus efeitos antioxidantes, vasculares, antiinflamatórios e antiapoptóticos. Os níveis de caspase-3 clivada no tecido renal foram reduzidos após o tratamento com quercetina, todos associados à inibição da ativação do NF- κ B, inibição da apoptose e conseqüente redução dos níveis de TNF- α , iNOS e inibição da infiltração de neutrófilos no tecido renal. Ademais, esses efeitos são

teciduais e hemodinâmicos, pois a quercetina também tem potencial para aumentar o fluxo sanguíneo cortical, melhorando a perfusão nos néfrons (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). É um desafio constante retardar a progressão da fibrose renal e manter a funcionalidade do tecido, principalmente no caso de células epiteliais tubulares. Um estudo *in vitro* mostrou que a quercetina alivia a fibrose renal ao reduzir a senescência induzida por angiotensina II em células epiteliais tubulares renais. Essas conclusões foram associadas à inibição da fragmentação, acúmulo de massa mitocondrial e à modulação da mitofagia, um processo autofágico da mitocôndria (CHEN *et al.*, 2018).

Assim, ao observar uma cascata de eventos celulares envolvidos com o potencial nefroprotetor da quercetina, uma perspectiva promissora é traçada, uma vez que especialistas na área de nefroproteção farmacológica descrevem que substâncias antioxidantes de origem natural são candidatas a estudos experimentais e até clínicos. No entanto, resultados consistentes foram obtidos quando substâncias com um potencial inibidor de enzima ou antagonistas de vias bioquímicas que geram estresse oxidativo foram usadas. Substâncias antioxidantes do tipo “*scavenger*”, que reduzem as espécies reativas pré-formadas, ao invés de inibir sua formação, geralmente não geram efeito protetor significativo ou causam repercussões crônicas (SAMPAIO *et al.*, 2016).

No estudo atual, os efeitos nefroprotetores da quercetina foram comparados ao lisinopril e à losartana, inibidores do sistema renina-angiotensina (SRAA). O lisinopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), não apresentou efeito protetor contra I/R induzida no modelo utilizado. Adicionalmente, a losartana, um antagonista do receptor da angiotensina (ARA), apresentou efeito moderado quando comparado à quercetina. Um estudo mostrou que o irbesartan, um bloqueador do receptor da angiotensina (AT1), reduziu a inflamação intestinal e o acúmulo de ERO induzido pelo estresse em camundongos via sinalização de AT1 e mecanismo dependente de ECA em camundongos. Sabe-se que a inibição do receptor AT1 sobrecarrega a enzima conversora de angiotensina (ECA), que ativa a via antioxidante e antiinflamatória da Angiotensina (1-7), corroborando com os achados deste trabalho (YISIREYILI *et al.*, 2018).

Diversas substâncias antioxidantes já foram descritas como inibidoras da ECA. Esta enzima está relacionada com a função renal por coordenar a homeostase de água, eletrólitos e demais funções tubulares. No presente trabalho, a quercetina se mostrou mais efetiva em interagir com o receptor AT1 em comparação com a possível interação com a ECA. Este achado é interessante pois, ao possivelmente bloquear o eixo SRAA em sua

última etapa, reações adjacentes que possam ativar o eixo são neutralizadas (MARUNAKA *et al.*, 2017)

Nesse contexto, o presente trabalho utilizou simulações de docking molecular para correlacionar o potencial antioxidante da quercetina com seu possível efeito protetor nas células epiteliais tubulares renais. De acordo com as propriedades termodinâmicas das interações, observou-se que a quercetina tem potencial para interagir com o receptor AT1 da angiotensina com maior afinidade, apresentando uma ligação estável caracterizada por uma entalpia de -8,1 Kcal/mol. De fato, essa interação ocorre por meio da formação de cinco ligações de hidrogênio de forte intensidade, além de atrações não covalentes entre anéis aromáticos π - π que empilham, o que promove o empilhamento de estruturas moleculares e, conseqüentemente, maior estabilidade para a interação. Comparativamente, a simulação de interação com o receptor AT1 não apresentou interações hidrofóbicas, ao contrário do que ocorreu com a ECA, indicando possíveis interações de menor estabilidade entre essas enzimas.

Os dados da literatura indicam um possível efeito farmacológico da quercetina no eixo renina-angiotensina-aldosterona, gerando um efeito protetor. Foi observado que a quercetina atenua a deposição de ferro induzida pelo etanol e o conseqüente dano ao miocárdio causado pelo alcoolismo, regulando a voltagem dos canais de Ca^{2+} tipo L dependentes da angiotensina com efeitos comparáveis aos da nifedipina, um inibidor dos canais de Ca^{2+} , ou losartana, um ARA (GUO *et al.*, 2018).

Adicionalmente, foi também demonstrado que o excesso de angiotensina II intracelular induz apoptose pela via mitocondrial em uma variedade de células, incluindo células endoteliais e epiteliais. Um estudo realizado com células endoteliais da veia umbilical humana demonstrou que a Quercetina inibe a apoptose induzida pela angiotensina II através da via mitocondrial de forma concentrada e dependente do tempo. Além disso, a perda do potencial de membrana mitocondrial, a regulação positiva de citocromo C e Bax, a regulação negativa do Bcl-2 e a ativação de caspase-9 e caspase-3 causada pela angiotensina II também foram recuperadas após o tratamento com quercetina (LU *et al.*, 2016).

Assim, existem estudos suficientemente consistentes para afirmar que a quercetina melhora o desequilíbrio redox, especialmente com o envolvimento da angiotensina II. Dados da literatura demonstram que a quercetina tem efeito hipotensor, cardioprotetor e

nefroprotetor associado à redução da transcrição do mRNA para NADPH-oxidase e, posteriormente, aos níveis de óxido nítrico e superóxido induzidos pela angiotensina II (JONES *et al.*, 2016).

Esses achados são compatíveis com o fato de que flavonóides como a quercetina exercem modulação de genes apoptóticos e inflamatórios e, conseqüentemente, antagonismo da angiotensina II. Modelos de obstrução uretral justificam essas afirmações ao observar que a quercetina inibe a expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), assim como enalaprilate e losartana. No entanto, a expressão do gene do receptor de superfície Fas é inibida pela quercetina, mas não pelo enalaprilate ou losartana, indicando um potencial antiapoptótico da quercetina (JONES *et al.*, 2000). Bem como observado em nossa análise por citometria de fluxo. Onde a quercetina, em diversas concentrações, foi capaz de diminuir a marcação por annexina V.

A associação de estudos *in silico* com modelos experimentais práticos pode ajudar a entender melhor os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos já descritos para a quercetina. Os resultados deste estudo indicam o envolvimento do possível bloqueio do eixo renina-angiotensina-aldosterona na nefroproteção e efeito antioxidante associado à quercetina. Sobre o tema, um estudo realizado por meio de tratamento crônico com quercetina demonstrou que esse flavonóide não inibe a atividade da enzima conversora de angiotensina *in vivo* ou *in vitro*, apesar de apresentar efeito hipotensor mesmo após a administração de angiotensina I e II, indicando que a inibição poderia ocorrer por outra via do eixo (NETO-NEVES *et al.*, 2010). Assim, tais achados reforçam a hipótese de que a quercetina tem efeitos moduladores nos receptores AT1 e conseqüente sinalização cálcio-dependente, corroborando os achados do presente estudo.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nesse estudo, a quercetina apresentou efeito protetor sobre células renais LLC-MK2 submetidas ao processo de isquemia e reoxigenação, inibindo o estresse oxidativo celular a nível mitocondrial e reduzindo a morte celular com envolvimento do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, por meio do bloqueio dos receptores AT1. Assim, estudos mais específicos devem ser realizados para aprimorar as abordagens nesta questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARIKWU S, SIMPLE G, ONUOHA S, MOKWENYE I, AYOGU J. Evaluation of the protective effects of quercetin and gallic acid against oxidative toxicity in rat's kidney and HEK-293 cells. *Toxicology reports*. 2020; 7: 955–962. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.015>.

ABIGAIL L J., SYMONS, J. D., & JALILI, T. (2010). Quercetin: A Treatment for Hypertension?—A Review of Efficacy and Mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(1), 237–250. <https://doi.org/10.3390/ph3010237>

ALMATROODI, SALEH A *et al.* “Potential Therapeutic Targets of Quercetin, a Plant Flavonol, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer through the Modulation of Various Cell Signaling Pathways.” *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 26, 5 1315. 1 Mar. 2021, doi:10.3390/molecules26051315

ANDERSEN, S.; ANDERSEN, A.; NIELSEN-KUDSK, J.E. The renin-angiotensin-aldosterone-system and right heart failure in congenital heart disease. **International Journal of Cardiology: Heart & Vasculature**, v. 11, n. 2, p. 59-65, 2016.

ASMA, V., SHABANINEJAD, Z., MOVAHEDPOUR, A., FALLAHI, F., TAGHAVIPOUR, M., GHASEMI, Y., AKBARI, M., SHAFIEE, A., HAJIGHADIMI, S., MORADIZARMEHRI, S., RAZI, E., SAVARDASHTAKI, A., & MIRZAEI, H. (2020). Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell & bioscience*, 10, 32. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00397-0>

BAHEM, R.; HOFFMAN, A.; AZONPI, A.; CABALLERO-GEORGE C.; PATRICK VANDERHEYDEN. Modulation of Calcium Signaling of Angiotensin AT₁, Endothelin ET_A, and ET_B Receptors by Silibinin, Quercetin, Crocin, Diallyl Sulfides, and Ginsenoside Rb1. *Planta Med* 2015; 81(08): 670-678

BHATIA D, CAPILI A, CHOI M. Mitochondrial dysfunction in kidney injury, inflammation, and disease: Potential therapeutic approaches. *Kidney research and clinical practice*. 2020; 39: 244–258. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.20.082>.

BJORNSTAD, E.C., MURONYA, W., SMITH, Z.H. Incidence and epidemiology of acute kidney injury in a pediatric Malawian trauma cohort: a prospective observational study. *BMC Nephrol* 21, 98 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01755-3>

BONVENTRE JV, YANG L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011 Nov;121(11):4210-21. doi: 10.1172/JCI45161. Epub 2011 Nov 1.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BUDAVARI, S. (Ed.). *The Merck Index*. 12th ed. White House Station: Merck, 1996.

CHEN, K.; REKEP, M.; WEI, W.; WU, Q.; XUE, Q.; LI, S. Quercetin Prevents In Vivo and In Vitro Myocardial Hypertrophy Through the Proteasome-GSK-3 Pathway. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v. 32, n. 1, p. 5-21, 2018

CHEUNG, E. C.; LUDWIG, R. L.; VOUSDEN, K. H. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20491–20496, 2012.

CHOI, H.; JEONG, J. Y.; LEE, K. W.; CHOI, D. E. Nafamostat Mesilate Attenuates Ischemia-Reperfusion e Induced Renal Injury. v. 2199, p. 2192–2199, 2016.

COSTA, LUCIO G. “Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More.” *Oxidative medicine and cellular longevity* vol. 2016 (2016).

CURTIS C. SHAH S.P.; CHIN S.-F.; TURASHVILI G; RUEDA O.M.; DUNNING M.J.; SPEED D.; LYNCH A.G.; SAMARAJIWA S.; YUAN Y. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012; 486: 346-352

DA COSTA MF, LIBÓRIO AB, TELES F, MARTINS CS, SOARES PM, MENESES GC, RODRIGUES FA, LEAL LK, MIRON D, SILVA AH, M. A. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine*, v. 22, n. 9, p. 787–795, 2015.

DANTAS, R. T.; SAMPAIO, T. L.; LIMA, D. B.; RÓSEO, R.; PESSOA, P.; MENEZES, B. De; CANUTO, J. A.; TOYAMA, M. H.; SERRA, J.; MONTEIRO, A.; MARIA, A.; BUKMARTINS, C. Evaluation of KIM-1 as an early biomarker of snakebite-induced AKI in mice. *Toxicon*, v. 151, n. March, p. 24–28, 2018.

DAVID, A.V., ARULMOLI, R., & PARASURAMAN, S. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10, 84 - 89.

DE O. LEITE, G.; LEITE, L. H. I.; DE S. SAMPAIO, R.; ARARUNA, M. K. A.; DE MENEZES, I. R. A.; DA COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. (-)-a-Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. *Fitoterapia*, v. 82, n. 2, p. 208–211, 2011.

DEGHANI M, SHAKIBA MARAM N, MOGHIMIPOUR E, KHORSANDI L, KHAH A, MAHDAVINIA M. Protective effect of gallic acid and gallic acid-loaded Eudragit-RS 100 nanoparticles on cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and inflammation in rat kidney. *Biochimica et biophysica acta*. 2020; 1886: 165911. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165911>.

DEVARAJAN P. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol*. 2007 Nov;27(6):637-51. doi: 10.1016/j.semnephrol.2007.09.005.

DIAS, A. L. B.; BATISTA, H. R. F.; ESTEVAM, E.; ALVES, C.; FORIM, M.; NICOLELLA, H.; FURTADO, R.; TAVARES, D.; SILVA, T.; MARTINS, C.;

MIRANDA, M. Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtaoides* O. Berg (Myrtaceae). *Nat Prod Res*, v. 3, p. 1–5, 2018.

DUTTA, R. K.; KONDETI, V. K.; SHARMA, I.; CHANDEL, N. S.; QUAGGIN, S. E.; KANWAR, Y. S. Beneficial Effects of Myo -Inositol Oxygenase Deficiency in Cisplatin- Induced AKI. *J Am Soc Nephrol.*, v. 28, n. 5, p. 1421–1436, 2017.

EL-DESOUKY M, MAHMOUD M, RIAD B, TAHA Y. Nephroprotective effect of green tea, rosmarinic acid and rosemary on N-diethylnitrosamine initiated and ferric nitrilotriacetate promoted acute renal toxicity in Wistar rats. *Interdiscip Toxicol*. 2019; 12: 98–110. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0012>.

FYHRQUIST, F. e SAIJONMAA, O. (2008). Renin-Angiotensin system revisited. *Journal of internal Medicine.*,264, pp. 224-236.

GAIÃO, Sérgio Mina; PAIVA, José Artur Osório de Carvalho. Biomarkers of renal recovery after acute kidney injury. *Rev. bras. ter. intensiva*, São Paulo , v. 29, n. 3, p. 373-381, Sept. 2017 .

GANZERA, M.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L .) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sciences*, v. 78, p. 856–861, 2006.

GIBELLINI, L.; PINTI, M., NASI, M.; MONTAGNA, P. J.; DE BIASI, S., ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COOPER, L. E.; COSSARIZZA1, A.; Quercetin and Cancer Chemoprevention, Review Article 591356, p-15, 2011.

GINO, AK; BRINDA, P. Standardization of in vitro cell-based model for renal ischemia and reperfusion injury. *Indian J. Pharm. Sci.*, v. 76, n. 4, p. 348–353, 2014.

GRANATA, S.; DALLA GASSA, A.; TOMEI, P.; LUPO, A.; ZAZA, G. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease. *Nutrition & Metabolism*, v. 12, n. 1, p. 49, 2015. Disponível em: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/12/1/49>>.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf>.

GRZELAK-BŁASZCZYK, J. MILALA, M. KOSMALA . “Onionquercetin monoglycosides alter microbial activity and increase antioxidant capacity,” e *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 56, pp. 81–88, 2018.

GUO X, CHEN M, ZENG H, LIU P, ZHU X, ZHOU F, et al. Quercetin Attenuates Ethanol-Induced Iron Uptake and Myocardial Injury by Regulating the Angiotensin II-L-Type Calcium Channel. *Mol. Nutr. Food Res*. 2018; 62 (5). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700772>.

HÄCKL LP, CUTTLE G, DOVICH I SS, LIMA-LANDMAN MT, NICOLAU M. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by quercetin alters the vascular response to

brandykinin and angiotensin I. *Pharmacology*. 2002 Aug;65(4):182-6. doi: 10.1159/000064341. PMID: 12174832.

HALLIWELL, BARRY, AND MATTHEW WHITEMAN. "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?." *British journal of pharmacology* vol. 142,2 (2004): 231-55.

HARRIS ML, SCHILLER HJ, REILLY PM, DONOWITZ M, GRISHAM MB, BULKLEY GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmacol Ther*. 1992;53(3):375-408.

HERAULT, O.; COLOMBAT, P.; DOMENECH, J.; DEGENNE, M.; BREMOND, J. L.; SENSEBE, L.; BERNARD, M. C.; BINET, C. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. **British Journal of Haematology**, v. 104, n. 3, p. 530-537, 1999.

HORKAN, C. M.; PURTLE, S. W.; MENDU, M. L.; MOROMIZATO, T.; GIBBONS, F. K.; CHRISTOPHER, K. B. The association of acute kidney injury in the critically ill and postdischarge outcomes: a cohort study. *Crit Care Med*.v. 43, n. 2, p. 354-64, 2015.

HORKAN, C.M.; PURTLE, S.W.; MENDU, M.L.; MOROMIZATO, T.; GIBBONS, F.K.; CHRISTOPHER, K.B. The association of acute kidney injury in the critically ill and postdischarge outcomes: a cohort study. **Critical Care Medicine**, 43(2): 354-64, 2015.

HOSTE, E.A.J., KELLUM, J.A., SELBY, N.M. et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 14, 607-625 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41581-018-0052-0>

JEONG, B. Y.; PARK, S.; CHO, S.; YU, S.; LEE, H. Y.; PARK, C. G.; KANG, J.; JUNG, D.; PARK, M. H.; HWANG, W.; YUN, S.; JUNG, J.; YOON, S. TGF- β -mediated NADPH oxidase 4-dependent oxidative stress promotes colistin-induced acute kidney injury. *J Antimicrob Chemother*, v. 73, p. 962-972, 2018.

JOHNSON, L. V; WALSH, M. L.; CHEN, B.; BUCHANAN, J. M. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Froc. Natl. Acad. Sc. USA Cell Biology*, v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.

JOHNSON, L. V; WALSH, M. L.; CHEN, B.; BUCHANAN, J. M. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Froc. Natl. Acad. Sc. USA Cell Biology*, v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.

JONES, E; SHAHED, A; SHOSKES, D. Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction. *Urology*. 2000; 56: 346-351. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)00608-7](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00608-7).

JONES, H; GORDON, A; MAGWENZI, S; NASEEM, K; ATKIN, S; COURTS, F. The dietary flavonol quercetin ameliorates angiotensin II-induced redox signaling imbalance in a human umbilical vein endothelial cell model of endothelial dysfunction via ablation of p47phox expression. *Mol. Nutr. Food Res*. 2016; 60: 787-797.

KIKUCHI, H.; MIMURO, H.; KURIBAYASHI, F. Biochemical and Biophysical Research Communications Resveratrol strongly enhances the retinoic acid-induced superoxide generating activity via up-regulation of gp91-phox gene expression in. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 495, n. 1, p. 1195–1200, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.161>>.

KIL, H. N.; EOM, S. Y.; PARK, J. D.; KAWAMOTO, T.; KIM, Y. D.; KIM, H. A rapid method for estimating the levels of urinary thiobarbituric Acid reactive substances for environmental epidemiologic survey. *Toxicol Res.* v. 30, n. 1, p. 7-11, 2014.

LAAR RJ, STEHOUWER CD, VAN BUSSEL BC, TE VELDE SJ, PRINS MH, TWISK JW, FERREIRA I. Lower lifetime dietary fiber intake is associated with carotid artery stiffness: the Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *Am J Clin Nutr.* 2012 Jul;96(1):14-23.

LAMEIRE, NORBERT H; BAGGA A.; CRUZ, DINNA; MAESENEER, DE J; ENDRE, Z; KELLUM J. A., “Acute kidney injury: an increasing global concern.” *Lancet (London, England)* vol. 382,9887 (2013): 170-9.

LEE, K. H., TSENG, W. C., YANG, C. Y., & TARNG, D. C. (2019). The Anti-Inflammatory, Anti-Oxidative, and Anti-Apoptotic Benefits of Stem Cells in Acute Ischemic Kidney Injury. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3529.

LESJAK, M; BEARA, I; SIMIN, N; PINTAĆ, D; MAJKIĆ, T; BEKVALAC, K; ORČIĆ, D; MIMICA-DUKIĆ, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, 40 (2018) 68-75.

LI, D.; SUN-WATERHOUSE, D.; WANG, Y.; QIAO, X.; CHEN, Y.; LI, F. Interactions of Some Common Flavonoid Antioxidants. *Reference Module in Food Science*, p. 1-6, 2018.

LIU, X; SUN, N; MO, N; LU, S; SONG, E; REN, C; LI, Z. Quercetin inhibits kidney fibrosis and the epithelial to mesenchymal transition of the renal tubular system involving suppression of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Food Funct.* 2019; 10: 3782–3797. <https://doi.org/10.1039/c9fo00373h>.

LIU, GANG., “Beclin-1-mediated Autophagy Protects Against Cadmium-activated Apoptosis via the Fas/FasL Pathway in Primary Rat Proximal Tubular Cell Culture.” *Scientific reports* vol. 7,1 977. 20 Apr. 2017.

LU, Y; WANG, R; GUO, B; JIA, Y. Quercetin inhibits angiotensin II induced apoptosis via mitochondrial pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Eur Rav Med Pharmacol Sci.* 2016; 20: 1609–1616.

LUO, M; TIAN, R; LU, N. Quercetin inhibited endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: Critical roles for NADPH oxidase and heme oxygenase-1. *J. of agricultural and food chemistry.* 2020; 68: 10875–10883. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03907>.

- MARTIN, J.L., GRUSZCZYK, A.V., BEACH, T.E. *et al.* Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury. *Pediatr Nephrol* **34**, 1167–1174 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3984-5>
- MAGNELLI, L.; CALDINI, R.; SCHIAVONE, N.; SUZUKI, H.; CHEVANNE, M. Differentiating and apoptotic dose-dependent effects in (-)-alpha-bisabolol-treated human endothelial cells. *Journal of natural products*, v. 73, n. 4, p. 523–526, 2010.
- MAKRIS, K., & SPANO, L. (2016). Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *The Clinical biochemist. Reviews*, 37(2), 85–98.
- MARUNAKA, Y., MARUNAKA, R., SUN, H., YAMAMOTO, T., KANAMURA, N., INUI, T., & TARUNO, A. (2017). Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2), 209. <https://doi.org/10.3390/molecules22020209>
- MAXWELL PH, FERGUSON DJ, NICHOLLS LG, JOHNSON MH, RATCLIFFE PJ. The interstitial response to renal injury: fibroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression. *Kidney Int.* 1997 Sep;52(3):715-24.
- MCKINNON, KATHERINE M. “Flow Cytometry: An Overview.” *Current protocols in immunology* vol. 120 5.1.1-5.1.11. 21 Feb. 2018, doi:10.1002/cpim.40
- MEHTA RL, CERDÁ J, BURDMANN EA, TONELLI M, GARCÍA-GARCÍA G, JHA V, SUSANTITAPHONG P, ROCCO M, VANHOLDER R, SEVER MS, CRUZ D, JABER B, LAMEIRE NH, LOMBARDI R, LEWINGTON A, FEEHALLY J, FINKELSTEIN F, LEVIN N, PANNU N, THOMAS B, ARONOFF-SPENCER E, REMUZZI G. International Society of Nephrology's 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet.* 2015 Jun 27;385(9987):2616-43. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60126-X. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25777661.
- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochem Med.*, v. 23, n. 3, p. 302–311, 1980.
- Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, Sagan A, Wu J, Vinh A, Marvar PJ, Guzik B, Podolec J, Drummond G, Lob HE, Harrison DG, Guzik TJ. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* 2016 May;30(5):1987-99. doi: 10.1096/fj.201500088R.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NETO-NEVES, E. M., MONTENEGRO, M. F., DIAS-JUNIOR, C. A., SPILLER, F., KANASHIRO, A., & TANUS-SANTOS, J. E. (2010). Chronic treatment with quercetin

does not inhibit angiotensin-converting enzyme in vivo or in vitro. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 107(4), 825–829. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00583.x>

PALLER, M.S., HOLDAL, J.R., FERRIS, T.F. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest.*, vol.74, p.1156, 1984.

PARIKH, C. R.; MANSOUR, S. G. Perspective on Clinical Application of Biomarkers in AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, p. ASN.2016101127, 2017.

PASCUAL, M. E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 201-214, 2001.

PASSOS-SILVA, D. G., VERANO-BRAGA, T. E SANTOS, R. A. S. (2013). Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clinical Science*, 124, pp.443-456

PEDRAZA-CHAVERRI, J.; MALDONADO, P. D.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; OLIVARES-CORICHI, I. M.; GRANADOS-SILVESTRE, M. A.; HERNANDEZ-PANDO, R.; IBARRA-RUBIO, M. E. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med.* v. 29, n. 7, p. 602-11, 2000.

PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C., & FERRIN, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

PICKERING, J. W.; ENDRE, Z. H. Acute kidney injury urinary biomarker time-courses. *PLoS One.* v. 9, n. 7, 2014.

PIMENTEL-MORAL, S.; TEIXEIRA, M. C.; FERNANDES, A. R.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; MARTÍNEZ-FÉREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; SOUTO, E. B. Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 260, p. 85-94, 2018.

PIRES, BC; CARVALHO, NMS; LOPES, JR; AZEVEDO,GA; SILVA,KL. Acute kidney injury during severe sepsis in a hospital setting. *Braz. J. Hea. Rev.*, Curitiba, v. 3, n. 5, p. 13557-13564 set/out. 2020.

POKORNÝ, J.; POKORNÝ, J.; KOBILKOVÁ, J.; JANDOVÁ, A.; VRBA, J. Targeting mitochondria for cancer treatment - two types of mitochondrial dysfunction. *Prague medical report*, v. 115, n. 3–4, p. 104–19, 2014.

PRIANTE G, GIANESELO L, CEOL M, DEL PRETE D, ANGLANI F. Cell death in the kidney. *Int J. Mol. Sci.* 2019; 20: 3598. <https://doi.org/10.3390/ijms20143598>.

PRODJOSUDJADI, W.; GERRITSMAN, J. S.; VAN ES, L. A.; DAHA, M. R.; BRUIJN, J. A. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. *Clinical nephrology*, v. 44, n. 3, p. 148–55, set. 1995.

PUNTEL, G. O.; CARVALHO, N. R.; AMARAL, G. P.; LOBATO, L. D.; SILVEIRA, S. O.; DAUBERMANN, M. F.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. B. T.; SOARES, F. A. A. Therapeutic cold: an effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free Radical Research*. v. 45, n. 2, p. 133-146, 2011.

RADIŠIĆ BILJAK, V. et al. The role of laboratory testing in detection and classification of chronic kidney disease: National recommendations. *Biochemia Medica*, v. 27, n. 1, p. 153–176, 2017. 92

RAMIREZ-SANCHEZ, M.. (2013). The Renin-Angiotensin System: New Insights into Old Therapies. *Current Medical Chemistry*, 20, pp.1313-1322.

Rauf, A., Imran, M., Khan, I. A., Ur-Rehman, M., Gilani, S. A., Mehmood, Z., & Mubarak, M. S. (2018). Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytotherapy research : PTR*, 32(11), 2109–2130. <https://doi.org/10.1002/ptr.6155>

RAZVICKAS, C. V.; BORGES, F. T.; DE OLIVEIRA, A. S.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Efeito da hipóxia e reoxigenação na resposta à angiotensina II em células mesangiais in vitro. *J. Bras. Nefrol.* v. 35, n. 4, 2013.

RODRIGO, R.; RIVERA, G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med*, v. 33, p. 409-22, 2002.

RONCO, C. N-GAL: diagnosing AKI as soon as possible. *Crit Care.*; 11(6):173, 2007.

ROVIN, B. H.; DOE, N.; TAN, L. C. Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, v. 27, n. 5, p. 640–6, maio 1996.

RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; EGIDO, J. Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney international*, v. 57, n. 6, p. 2285–98, jun. 2000.

RYAN, M. J.; JOHNSON, G.; KIRK, J.; FUERSTENBERG SM, ZAGER RA, TOROK-STORB B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* 45: 48-57, 1994. PubMed: 8127021

SAID, M. The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Fundamental & clinical pharmacology*, v.25, p.708-16, 2011. 93

SAIKUMAR, P., VENKATACHALAM, M.A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin. Nephrol.*, vol.23, p.511–521, 2003.

SALVAMANI, SHAMALA *et al.* “Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids.” *BioMed research international* vol. 2014 (2014): 480258. doi:10.1155/2014/480258

SIMITZIS, P.; SPANOU, D.; GLASTRA, N.; GOLIOMYTIS, M. Impact of dietary quercetin on laying hen performance, egg quality and yolk oxidative stability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 239, p. 27-32, 2018.

SAMPAIO, TL; MENEZES, RRPPB; DA COSTA, MFB; MENESES, GC; ARRIETA, MCV; CHAVES FILHO, AJM; DE MORAIS, GB; LIBÓRIO, AB; ALVES, RS; EVANGELISTA, JSAM; MARTINS, A. Nephroprotective effects of (-)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine*, n. 14, p. Pages 1843-1852, 2016.

SAMPAIO TL, MENEZES RRPPB (2020) Cardiovascular Research at COVID-19. *Int J Cardiovasc Res* 9: 5. doi: 10.37532 / icrj.2020.9 (5) .412

Sampaio TL, Menezes RRPPB, Lima DB, Costa Silva RA, de Azevedo IEP, Magalhães EP, Marinho MM, Dos Santos RP, Martins AMC. Involvement of NADPH-oxidase enzyme in the nephroprotective effect of (-)- α -bisabolol on HK2 cells exposed to ischemia - Reoxygenation. *Eur J Pharmacol*. 2019 Jul 15;855:1-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.04.044. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31047876.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ P, LÓPEZ-HERNÁNDEZ F, DUEÑAS M, PRIETO M, SÁNCHEZ-LÓPEZ E, THOMALE J., Differential effect of quercetin on cisplatin-induced toxicity in kidney and tumor tissues. *Food Chem. Toxicol*. 2017; 107: 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.047>.

SANT'ANNA, C. M. R., Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. *Revista Virtual de Química*, 1, 49 - 57, 2009

SANTANGELO, F., WITKO-SARSAT, V., DRUEKE, T., DESCAMPS, B. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, v. 19, n.8, 2004.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*. v. 216, n. 2, p. R1-17, 2013.

SCHMIDT-OTT, K. M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury - Where do we stand today? *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 26, n. 3, p. 762–764, 2011.

SCHRIER, R. W., WANG, W., POOLE, B., MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.114, no.1, p.5–14, 2004.

SECIN, F.P. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. *Adv Urol.*, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. v.25, p.192- 205, 1968.

SHARFUDDIN AA, MOLITORIS BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011 Apr;7(4):189-200. doi: 10.1038/nrneph.2011.16. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21364518.

SHARFUDDIN, ASIF A, AND BRUCE A MOLITORIS. "Pathophysiology of ischemic acute kidney injury." *Nature reviews. Nephrology* vol. 7,4 (2011).

SHARMA S., NEMECZ S.K., ZHU S., S. V. Identification of chemopreventive agents by screening for identification of glutathione-S-transferase as a biomarker. **Methods Cell Sci.**, v. 19, p. 49–52, 1997.

SHIMO, T.; MOTO, M.; ASHIZAWA, N.; OBA, K.; NAGATA, O. Study on toxicological aspects of crystal-mediated nephrotoxicity induced by FYX-051, a xanthine oxidoreductase inhibitor, in rats. *Drug Chem Toxicol.* v. 34, n. 2, p. 192-8, 2011. 94

SHIN Y, KIM J, KIM Y, KIM W, PARK E, KIM I, et al. Protective Effects of Quercetin Against HgCl₂-Induced Nephrotoxicity in Sprague-Dawley Rats. *Journal of medicinal food.* 2015; 8: 524–534. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3242>.

SHLYAKHTINA Y, PAVET V, GRONEMEYER H (2017) Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells. *Cell Death Dis* 8: e3025 10.1038/cddis.2017.423

SIMITZIS, P., SPANOU, D., GLASTRA, N., GOLIOMYTIS, M., 2018. Impact of dietary quercetin on laying hen performance, egg quality and yolk oxidative stability. *Animal Feed Sci. Technol.* 239, 27–32

SINGH, A.P.; SINGH, N.; PATHAK, D.; BEDI, P.M.S. Estradiol attenuates ischemia reperfusion-induced acute kidney injury through PPAR- γ stimulated eNOS activation in rats. *Mol Cell Biochem.* 2018 Sep 7. doi: 10.1007/s11010-018-3427-4.

SOUTHARD, J.H., DEN BUTTER, B., MARSH, D.C., LINDELL, S., BELZER, F.O. The role of oxygen free radicals in organ preservation. *KlinWochenschr*, vol.69(21-23), p.1073-6, 1991.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Verbenaceae: Botânica sistemática.* Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 639 p.

SOUZA, W. M. A. et al. Avaliação in vitro do extrato hidroalcoólico (EHA) de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrointestinais (*Trichostrongylidae*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, n. 3, p. 278-281. 2011.

SPARKS MA, CROWLEY SD, GURLEY SB, MIROTSOU M, COFFMAN, TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol.* 2014 Jul;4(3):1201-28. doi: 10.1002/cphy.c130040. PMID: 24944035; PMCID: PMC4137912.

STANGOU, M.; ALEXOPOULOS, E.; PAPAGIANNI, A.; PANTZAKI, A.; BANTIS, C.; DOVAS, S.; ECONOMIDOU, D.; LEONTSINI, M.; MEMMOS, D. Urinary levels of epidermal growth factor, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 may act as predictor markers of renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, v. 14, n. 6, p. 613–20, set. 2009. 95

STEINBACH S1, WEIS J, SCHWEIGHAUSER A, FRANCEY T, NEIGER R. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* v. 28, n. 2, p. 264-9, 2014.

STEVENS, L. A.; CORESH, J.; GREENE, T.; LEVEY, A. S. Assessing kidney function-measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med.* v. 354, p. 2473-83, 2006.

SUCHOJAD, A.; TARKO, A.; SMERTKA, M.; MAJCHERCZYK, M.; BRZozowska, A.; WROBLEwska, J.; MARUNIAK-CHUDEK, I. Factors limiting usefulness of serum and urinary NGAL as a marker of acute kidney injury in preterm newborns. *Ren Fail.* v. 37, n. 3, p. 439-45, 2015.

SUNDARAM, M., RAINA, R., AFROZE, N., BAJBOUJ, K., HAMAD, M., HAQUE, S., & HUSSAIN, A. (2019). Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells. *Bioscience reports*, 39(8), BSR20190720. <https://doi.org/10.1042/BSR20190720>

SUSANTITAPHONG P, CRUZ DN, CERDA J, ABULFARAJ M, ALQAHTANI F, KOULOURIDIS I, JABER BL; Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013 Sep;8(9):1482-93. doi: 10.2215/CJN.00710113. Epub 2013 Jun 6. Erratum in: *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Jun 6;9(6):1148.

TAI, K., RAPPOLT, M., MAO, L., GAO, Y., LI, X. & YUAN, F. (2020). The stabilization and release performances of curcumin-loaded liposomes coated by high and low molecular weight chitosan. *Food Hydrocolloids*, 99.

TAN, F.; CHEN, Y.; YUAN, D.; GONG, C.; LI, X.; ZHOU S. Dexmedetomidine protects against acute kidney injury through downregulating inflammatory reactions in endotoxemia rats. *Biomed Rep.* v. 3, n. 3, p. 365-370, 2015.

TAO, D.; SHAOFEI, W.; XUYAO, Z.; WENJING, Z.; JIAJUN, F.; WEI, C.; QI, B. Kidney protection effects of dihydroquercetin on diabetic nephropathy through suppressing ROS and NLRP3 inflammasome. *Phytomedicine*, v. 41, p. 45–53, 2018.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. *Journal of Essential Oil Research*, v.8, p. 471-485, 1996.

TESCH, G. H. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 294, n. 4, p. F697-701, abr. 2008.

- TORRAS, J., CRUZADO, J.M., GRYNIO, J.M. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. *Transplant. Proc.*, vol.31, p.2217-8, 1999. 96
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, p. 4350–4354, 1979.
- ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? **Cell Biochem Funct**, v. 29, p. 468–480, 2011.
- VALENTIN, A. et al. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1439-1442, 1995.
- VARGAS, F., ROMECÍN, P., GARCÍA-GUILLÉN, A. I., WANGESTEEN, R., VARGAS-TENDERO, P., PAREDES, M. D., ATUCHA, N. M., & GARCÍA-ESTAÑ, J. (2018). Flavonoids in Kidney Health and Disease. *Frontiers in physiology*, 9, 394. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00394>
- VART, P.; GRAMS, M. E. Measuring and Assessing Kidney Function. *Seminars in Nephrology*, v. 36, n. 4, p. 262–272, 2016.
- VERAS, H. N. H. et al. Topical anti-inflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. *Phytotherapy Research*, v. 27, p. 179–185, 2013.
- VIJAYARAGHAVAN, K.; DEEDWANIA, P. Renin-Angiotensin-Aldosterone Blockade for Cardiovascular Disease Prevention. **Cardiology Clinics**, v. 29, n. 1, p. 137-156, 2011
- VIEDT, C.; ORTH, S. R. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrology, dialysis, transplantation* : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, v. 17, n. 12, p. 2043–7, dez. 2002.
- WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. **Environmental Health**, v. 134, n. December 2003, p. 489–492, 2004.
- Xu M, Wang M, Yang W. Gold-quercetin nanoparticles prevent metabolic endotoxemia-induced kidney injury by regulating TLR4/NF-κB signaling and Nrf2 pathway in high fat diet fed mice. *Int. J. Nanomedicine*. 2017; 12: 327–345. <https://doi.org/10.2147/IJN.S116010>.
- XUEZHU, L. I.; CIJIANG, H. E. J. An update : the role of Nephrin inside and outside the kidney. *Sci China Life Sci*, v. 58, n. 7, p. 649–657, 2015.

YANG, L.; FAWCETT, J. P.; ØSTERGAARD, J.; ZHANG, H.; TUCKER, I. G. Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. *Mol Pharm.*, v. 9, n. 1, p. 29-36, 2012.

YISIREYILI, M; UCHIDA, Y; YAMAMOTO, K; NAKAYAMA, T; CHENG, X; MATSUSHITA, T; et al. Angiotensin receptor blocker irbesartan reduces stress-induced intestinal inflammation via AT1a signaling and ACE2-dependent mechanism in mice, *Brain, behavior, and immunity*. 2018; 69: 167–179.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.010>.

YOON, Y. E.; LEE, K. S.; LEE, Y. J.; LEE, H. H.; HAN, W. K. Renoprotective Effects of Carbon Monoxide-Releasing Molecule 3 in Ischemia-Reperfusion Injury and 100 Cisplatin-Induced Toxicity. *Transplantation Proceedings*, v. 49, n. 5, p. 1175–1182, 2017.

YOSHIDA, W. B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cir Vasc Angiol.* v. 12, p. 82-95, 1996.

YOUSEF, J. M.; CHEN, G.; HILL, P. A.; NATION, R. L.; LI, J. Ascorbic acid protects against the nephrotoxicity and apoptosis caused by colistin and affects its pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother.*, v. 67, n. 2, p. 452–459, 2012.

YUEN, P. S. T. et al. Ischemic and nephrotoxic acute renal failure are distinguished by their broad transcriptomic responses. v. d, p. 375–386, 2006.

ZHAO, M.; ZHOU, Y.; LIU, S.; LI, L.; CHEN, Y.; CHENG, J.; LU, Y.; LIU, J. Control release of mitochondria-targeted antioxidant by injectable self-assembling peptide hydrogel ameliorated persistent mitochondrial dysfunction and inflammation after acute kidney injury. *Drug Delivery*, v. 25, n. 1, p. 546–554, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1440445>>.

ZHENG JL, LI GZ, CHEN SZ, WANG JJ, OLSON JE, XIA HJ, LAZARTIGUES E, ZHU YL, CHEN YF. Angiotensin converting enzyme 2/Ang-(1-7)/mas axis protects brain from ischemic injury with a tendency of age-dependence. *CNS Neurosci Ther.* 2014 May;20(5):452-9. doi: 10.1111/cns.12233. Epub 2014 Mar 2. PMID: 24581232; PMCID: PMC4840841.