



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

IGOR MOREIRA DE ALMEIDA

**EFEITO PROTETOR DE *p*-AMINOFENILCHALCONAS SINTÉTICAS EM
MODELO DE CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR GENTAMICINA EM CÉLULAS
TUBULARES**

FORTALEZA

2022

IGOR MOREIRA DE ALMEIDA

EFEITO PROTETOR DE *p*-AMINOFENILCHALCONAS SINTÉTICAS EM MODELO DE
CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR GENTAMICINA EM CÉLULAS TUBULARES

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.
Coorientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula
Pessoa Bezerra de Menezes.

FORTALEZA

2022

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)

- A447e Almeida, Igor Moreira de.
Efeito protetor de p-Aminofenilchalconas sintéticas em modelo de citotoxicidade induzida por Gentamicina em células tubulares / Igor Moreira de Almeida. – 2022.
60 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.
Coorientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.
1. Chalconas. 2. Estresse oxidativo. 3. Gentamicina. 4. Lesão Renal Aguda. 5. Screening farmacológico.
I. Título.

CDD 615

IGOR MOREIRA DE ALMEIDA

EFEITO PROTETOR DE *p*-AMINOFENILCHALCONAS SINTÉTICAS EM MODELO DE
CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR GENTAMICINA EM CÉLULAS TUBULARES

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Farmacêutico.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

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

Profª. Drª. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Emanuel Paula Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por iluminar o meu caminho até aqui.
À minha mãe, Alessandra, por dedicar a vida ao
filho. Ao meu “avôhai”, Zenilton, por todo o
carinho e cuidado. E à minha namorada,
Stephanie, por todo amor, paciência e apoio.

“Nós podemos ser heróis, apenas por um dia.”

(David Bowie)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado com força e saúde para trilhar o meu caminho.

À minha família, em especial minha mãe, **Alessandra Moreira de Almeida**, por sempre ter sido a mulher guerreira que cresci admirando, e meu avô, **Zenilton Rodrigues de Almeida**, por ser um dos homens mais amorosos que já conheci. Sem o amor, carinho, apoio e dedicação de ambos eu jamais teria chegado até onde cheguei.

À **Stephanie Alves Veloso**, minha parceira, minha melhor amiga e meu amor que tive a sorte de conhecer no primeiro semestre da faculdade e de quem não quero mais me separar. A sua companhia deixou a jornada muito mais fácil e fez a minha vida ser mais vida.

À Liga Acadêmica de Análises Clínicas (LAAC-UFC), mais do que um projeto da faculdade, do qual tive o prazer de contribuir em sua criação, uma família que me permitiram escolher. **Clarice, Isabelle, Livia** (“Livinha”), **Luana, Raissa, Samyia, Stephanie** (a mesma) e **Thais**, e todos os outros que vieram depois, ao lado de vocês pude crescer não apenas academicamente, mas também como ser humano.

A todos os meus mestres que tive o privilégio de conhecer ao longo de minha vida escolar e universitária, e aos meus orientadores, pelo suporte e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), por terem me acolhido e me dado a oportunidade de conhecer e me deslumbrar pela pesquisa e pela vida acadêmica.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), que se tornou a minha segunda casa nesses últimos cinco anos, por todas as portas que foram abertas para mim e por todas as que me ensinaram a abrir.

A todos que acreditaram em mim, é só o começo.

RESUMO

A Lesão Renal Aguda (LRA) induzida por fármacos é um sério problema de saúde no mundo inteiro, sobretudo no âmbito hospitalar, podendo levar o paciente a desenvolver doença renal crônica ou até mesmo a ir ao óbito. Antibióticos como a Gentamicina, da classe dos aminoglicosídeos, são amplamente utilizados na rotina clínica apesar de sabidamente nefrotóxicos. Estima-se que cerca de 10 a 20% dos pacientes que a utilizam sejam acometidos por lesão renal decorrente de desbalanço oxidante, que provoca morte celular e necrose tubular aguda. Nesse contexto, diversas substâncias, naturais e sintéticas, com propriedades antioxidantes, como as chalconas – cetonas aromáticas da família dos flavonoides –, vêm sendo estudadas como potenciais nefroprotetores. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citoprotetor e antioxidante das chalconas derivadas da *p*-aminoacetofenona (*p*-aminofenilchalconas) em modelo *in vitro* de lesão renal aguda induzida por Gentamicina em células tubulares renais. Para isso, realizou-se o cultivo de células HK-2, células tubulares renais humanas, as quais foram tratadas com sulfato de Gentamicina em diferentes concentrações (8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 mM) para definição da IC₅₀ (5,28 ± 0,57 mM). Em seguida, foram avaliados os procedimentos de pré e pós-tratamento com as *p*-aminofenilchalconas em concentrações de 125-7,81 µM. A avaliação da citotoxicidade e da viabilidade celular após tratamento foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT. O caráter oxidante da injúria induzida pela Gentamicina foi avaliado pela determinação do acúmulo de ânions superóxido (O₂⁻) e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas células HK-2. Aminochalconas com aumento da cadeia carbônica central e presença do átomo de flúor em sua estrutura foram tóxicas às células renais em todas as concentrações testadas. Somente as *p*-aminofenilchalconas contendo os grupos -NO₂ (nitro) e -N(CH₃)₂ (dimetil amino) ligados ao anel B na posição C-4 apresentaram efeito protetor após lesão induzida pela Gentamicina. O tratamento com o aminoglicosídeo reduziu o estoque celular de GSH e levou ao maior acúmulo de O₂⁻, efeitos parcialmente revertidos por meio do pós-tratamento com as *p*-aminofenilchalconas citadas nas concentrações de 31,25-7,81 µM. Ademais, foi observado que a *p*-aminofenilchalcona nitro substituída foi capaz de recuperar em até 11% a viabilidade celular após dano induzido pela Gentamicina. Dessa maneira, o presente estudo destaca as *p*-aminofenilchalconas como potenciais novas ferramentas farmacológicas antioxidantes e contribui com o desenvolvimento do conhecimento científico para modelagem de futuros novos fármacos para a terapia da LRA.

Palavras-chave: Chalconas. Gentamicina. Lesão Renal Aguda. Efeitos antioxidantes.

ABSTRACT

Drug-induced Acute Kidney Injury (AKI) is a serious health problem worldwide, especially in the hospital environment, and can lead the patient to develop chronic kidney disease or even to death. Antibiotics such as Gentamicin, from the class of aminoglycosides, are widely used in clinical routine despite being known to be nephrotoxic. It is estimated that about 10 to 20% of patients who use it are affected by kidney damage resulting from oxidoreductive imbalance, which causes cell death and acute tubular necrosis. In this context, several natural and synthetic substances with antioxidant properties, such as chalcones – aromatic ketones from the flavonoid family – have been studied as potential nephroprotectors. The present work aimed to evaluate the cytoprotective and antioxidant potential of *p*-aminoacetophenone-derived chalcones (*p*-aminophenylchalcones) in an *in vitro* model of gentamicin-induced acute kidney injury in renal tubular cells. For this, the cultivation of HK-2 cells, human renal tubular cells, which were treated with gentamicin sulfate at different concentrations (8.0; 4.0; 2.0; 1.0; 0.5 mM) to define the IC₅₀ (5,28 ± 0,57 mM). Then, the pre- and post-treatment procedures with *p*-aminophenylchalcones with concentrations of 125-7,81 μM were evaluated. The evaluation of cytotoxicity and cell viability after treatment was performed using the MTT reduction assay. The oxidant character of gentamicin-induced injury was evaluated by determining the accumulation of superoxide anions (O₂⁻) and the levels of reduced glutathione (GSH) in HK-2 cells. Aminochalcones with an increase in the central carbon chain and the presence of a fluorine atom in its structure were toxic to kidney cells at all concentrations tested. Only *p*-aminophenylchalcones containing -NO₂ (nitro) and -N(CH₃)₂ (dimethyl amino) groups attached to the B ring at the C-4 position showed a protective effect after injury induced by Gentamicin. The treatment with the aminoglycoside reduced the cellular stock of GSH and led to a greater accumulation of O₂⁻, effects partially reversed through post-treatment with the *p*-aminophenylchalcones at concentrations of 31.25-7.81 μM. Furthermore, it was observed that nitro substituted *p*-aminophenylchalcone was able to recover cell viability by up to 11% after damage induced by Gentamicin. Thus, the present study highlights *p*-aminophenylchalcones as potential new antioxidant pharmacological tools and contributes to the development of scientific knowledge for modeling future new drugs for AKI therapy.

Keywords: Chalconas. Gentamicin. Acute Kidney Injury. Antioxidant effects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fatores renais que aumentam o risco da nefrotoxicidade induzida por fármacos ...	17
Figura 2 – Mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade da Gentamicina	19
Figura 3 – Estrutura molecular da Gentamicina	20
Figura 4 – Estrutura molecular fundamental das chalconas	22
Figura 5 – Reação de condensação de Claisen-Schmidt	24
Figura 6 – Fotomicrografia de células HK-2	28
Figura 7 – Representação da área de contagem na Câmara de Neubauer, sendo as áreas de cor azul utilizadas para contagem e determinação da densidade de células HK-2	29
Figura 8 – Esquema representativo do procedimento de plaqueamento das células HK-2 para os ensaios de viabilidade celular	30
Figura 9 – Esquema representativo do procedimento de pré e pós-tratamento com as <i>p</i> -aminofenilchalconas na LRA induzida pela Gentamicina	31
Figura 10 – Princípio reacional do ensaio de redução do MTT	32
Figura 11 – Esquema representativo do procedimento do ensaio de redução do MTT	32
Figura 12 – Esquema representativo do procedimento para obtenção do lisado celular e da dosagem de proteínas	33
Figura 13 – Interconversão da glutatona entre as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	34
Figura 14 – Esquema representativo do procedimento para determinação dos níveis de glutatona (GSH)	35
Figura 15 – Princípio reacional do ensaio para determinação do acúmulo de superóxido	35
Figura 16 – Esquema representativo do procedimento do ensaio para determinação do acúmulo de superóxido	36
Figura 17 – Toxicidade da Gentamicina em células renais HK-2 verificada pelo método de redução do MTT	37
Figura 18 – Toxicidade das <i>p</i> -aminofenilchalconas em células renais HK-2 verificada pelo método de redução do MTT	39
Figura 19 – Efeito do pré-tratamento com <i>p</i> -aminofenilchalconas na lesão de células HK-2 induzida por Gentamicina verificado pelo método de redução do MTT	41
Figura 20 – Efeito do pós-tratamento com <i>p</i> -aminofenilchalconas na lesão de células HK-2 induzida por Gentamicina verificado pelo método de redução do MTT	42
Figura 21 – Avaliação do estresse oxidativo por meio da medida dos níveis de glutatona reduzida (GSH) em células HK-2	44

Figura 22 – Avaliação do estresse oxidativo por meio da determinação do acúmulo de ânions superóxido (O_2^-) em células renais HK-2 45

LISTA DE TABELAS E EQUAÇÕES

Tabela 1 – Chalconas derivadas da <i>p</i> -aminocetofenona	27
Tabela 2 – Viabilidade de células HK-2 tratadas com Gentamicina em diferentes concentrações verificado pelo método de redução do MTT	38
Tabela 3 – Percentual de viabilidade de células HK-2 tratadas com <i>p</i> -aminofenilchalconas em diferentes concentrações verificado pelo método de redução do MTT	40
Tabela 4 – Percentual de viabilidade de células HK-2 submetidas a citotoxicidade induzida por Gentamicina e pré/pós-tratadas com <i>p</i> -aminofenilchalconas verificado pelo método de redução do MTT	43
Tabela 5 – Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e do acúmulo de ânions superóxido (O_2^-) em células renais HK-2	45
Equação 1 – Cálculo da concentração celular em Câmara de Neubauer	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CPA4Et	(<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-etoxifenil)prop-2-en-1-ona
CPA4F	(<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-ona
CPA4NO ₂	(<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
CPAB	(<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona
CPAC	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona
CPADMA	(<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilssulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GM	Gentamicina
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
HK-2	Células <i>Human Kidney 2</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
LRA	Lesão Renal Aguda
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NIA	Nefrite Intersticial Aguda
NTA	Necrose Tubular Aguda
PBS	Solução de Tampão Fosfato
RPM	Rotações Por Minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
SOD	Superóxido dismutase
TFG	Taxa de Filtração Glomerular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Lesão renal aguda induzida por fármacos	16
2.2	Mecanismos de nefrotoxicidade induzida por fármacos	18
2.3	Gentamicina	20
2.3.1	<i>Classificação e indicações terapêuticas</i>	20
2.3.2	<i>Farmacocinética e efeitos adversos</i>	20
2.3.3	<i>Estresse oxidativo</i>	21
2.4	Chalconas	22
2.4.1	<i>Origem e estrutura</i>	22
2.4.2	<i>Propriedades farmacológicas</i>	23
2.4.3	<i>Síntese e substituições</i>	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo Geral	25
3.2	Objetivos Específicos	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Obtenção das substâncias de estudo e preparo das soluções de trabalho	26
4.2	Cultivo e tratamento das células HK-2	28
4.3	Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT	31
4.4	Ensaio de avaliação do estresse oxidativo	33
4.4.1	<i>Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)</i>	34
4.4.2	<i>Determinação do acúmulo de ânions superóxido (O_2^-)</i>	35
4.5	Análise estatística	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Avaliação da citotoxicidade da Gentamicina em células HK-2	37
5.2	Avaliação da citotoxicidade das <i>p</i>-aminofenilchalconas em células HK2	38
5.3	Avaliação do efeito das <i>p</i>-aminofenilchalconas sobre a citotoxicidade em células renais induzida por Gentamicina	41
5.4	Determinação dos níveis de GSH e do acúmulo de superóxido	43
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	52

REFERÊNCIAS	53
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos responsáveis pela depuração de diversas substâncias indesejáveis presentes na circulação sanguínea, tais como produtos de metabolismo celular e xenobióticos, incluindo fármacos e seus metabólitos, na urina. Devido a exposição contínua a essa variedade de substâncias, seja em altas concentrações ou em pequenas concentrações, a longo prazo, os compartimentos dos rins, principalmente os túbulos renais, são um alvo vulnerável aos seus efeitos tóxicos (HOSOHATA, 2016).

A lesão renal aguda (LRA) induzida por fármacos pode ser definida como a redução ou perda abrupta da função renal, resultando em acumulação de produtos nitrogenados no corpo, como ureia, creatinina, amônia e ácido úrico (KHAJAVI RAD; MOHEBBATI; HOSSEINIAN, 2017). Diversos fármacos são sabidamente nefrotóxicos, dentre os quais se destacam os antineoplásicos, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os antibióticos, como os aminoglicosídeos (AWDISHU; MEHTA, 2017).

O principal mecanismo de nefrotoxicidade induzida pelos aminoglicosídeos é a lesão tubular ocasionada por apoptose e necrose das células epiteliais dos túbulos proximais, bem como a disfunção dos componentes celulares responsáveis pelo transporte de água e solutos. Já foi mostrado que, na presença de Gentamicina, um dos principais representantes dessa família de antibióticos, ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e uma redução das defesas antioxidantes das células, o que promove uma condição de estresse oxidativo e uma reação inflamatória que amplifica o dano tecidual (KHAJAVI RAD; MOHEBBATI; HOSSEINIAN, 2017; WU; HUANG, 2018).

Aminoglicosídeos são sabidamente fármacos nefrotóxicos com alta morbimortalidade e acometem entre 40 e 60% dos pacientes em Unidade de Tratamento de Intensivo (UTI), que sofrem de LRA, aumentando os custos dos serviços de saúde. Apesar disso, estão entre os fármacos mais comumente prescritos na rotina clínica, principalmente entre a população infantil, mas seus usos são limitados por seus efeitos adversos (DOWNES *et al.*, 2020; QU *et al.*, 2018). Embora existam estratégias de suporte, incluindo hidratação e reposição de eletrólitos, e ajuste de dose com base na função renal, cerca de até 30% dos pacientes hospitalizados em tratamento são acometidos por nefropatia induzida por fármacos (KHAJAVI RAD; MOHEBBATI; HOSSEINIAN, 2017).

Em nível pré-clínico, diversas substâncias, de origem natural e sintética, já demonstraram possuir capacidade de prevenir parcialmente a nefrotoxicidade induzida pelos aminoglicosídeos (HAYWARD *et al.*, 2018). A coadministração de Gentamicina com

moléculas antioxidantes em culturas de células renais foi capaz de reduzir consideravelmente a nefrotoxicidade induzida pelo fármaco. Esses achados indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel-chave na fisiopatologia da lesão renal causada pelos aminoglicosídeos (CASANOVA; VICENTE-VICENTE; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2017; VICENTE-VICENTE *et al.*, 2017). Dessa forma, moléculas cujo efeito antioxidante é conhecido são potenciais candidatos para reduzir a nefrotoxicidade da Gentamicina.

Dentre as substâncias orgânicas com propriedades terapêuticas em estudo nos últimos anos, as chalconas são compostos aromáticos que têm se destacado devido a sua grande diversidade de atividades biológicas, dentre as quais, seu efeito antioxidante (DÍAZ-TIELAS *et al.*, 2016). Tratam-se de produtos do metabolismo secundário de plantas leguminosas com uma estrutura fundamental de dois anéis aromáticos interligados por um sistema de três carbonos α , β -insaturado, mas são facilmente sintetizadas em laboratório por reações químicas relativamente simples como a condensação de Claisen-Schmidt, capaz de produzir diversos derivados com estruturas e atividades distintas (BANDEIRA *et al.*, 2019; RANI *et al.*, 2019).

Devido a essa conjuntura de fatores de risco relacionados à LRA induzida por fármacos, torna-se importante e necessário o estudo e desenvolvimento de novas estratégias de intervenção farmacológica para prevenção e tratamento desse problema (MAGALHÃES *et al.*, 2021). Nesse contexto, as linhagens de células imortalizadas têm sido ferramentas comumente utilizadas em estudos de toxicidade tubular nos últimos anos devido à fácil acessibilidade e manipulação, destacando-se como o modelo mais econômico e popular para triagem ou *screening* farmacológico (WU; HUANG, 2018).

De acordo com a metanálise de VICENTE-VICENTE e colaboradores (2017), apesar de compostos orgânicos com diversas atividades biológicas distintas terem sido avaliados em estudos pré-clínicos com modelos *in vitro* e *in vivo*, apenas os antioxidantes demonstraram resultados mais robustos, até então, em relação à prevenção ou reversão da nefropatia induzida por aminoglicosídeos. Nesse contexto, destaca-se a vantagem em explorar o potencial antioxidante das chalconas, devido à diversidade de compostos com estruturas e atividades distintas possível de ser obtida pela condensação com diferentes derivados (RANI *et al.*, 2019).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lesão Renal Aguda induzida por fármacos

Os rins são órgãos multifuncionais de suma importância para a manutenção da homeostase. São perfundidos por cerca de um terço do débito cardíaco e são responsáveis pela produção de hormônios, como a eritropoietina e a forma ativa da vitamina D; pela detoxificação de xenobióticos e compostos endógenos; e pela manutenção do equilíbrio ácido-base e hidroeletrolítico, da osmolaridade e da pressão arterial. Entretanto, possuem como funções essenciais a filtração do plasma sanguíneo, a reabsorção de nutrientes e a depuração dos metabólitos indesejáveis (HOSOHATA, 2016; PERAZELLA, 2018; WU; HUANG, 2018).

Define-se Lesão Renal Aguda (LRA) a redução ou perda súbita da capacidade de filtração glomerular, o que também desencadeia danos tubulares que culminam em necrose celular (QU *et al.*, 2018). A LRA acomete mais de 13 milhões de pessoas mundialmente e se configura como um sério problema de saúde, com elevadas taxas de morbidade e de mortalidade, somando mais de 1,5 milhões de mortes por ano. Estima-se que cerca de 40 a 60% dos pacientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) sofra de LRA, e que 70% desses casos evoluem para Doença Renal Crônica (DOWNES *et al.*, 2020; LIABEUF *et al.*, 2017; QU *et al.*, 2018).

A LRA resulta na acumulação de substâncias nitrogenadas, como ureia e creatinina, que pode cursar com ou sem oligúria; na retenção de líquidos, que extravasam para o interstício formando edemas; na perda da capacidade de regular o equilíbrio ácido-base do sangue, de concentrar e diluir a urina nos túbulos renais, e de garantir a manutenção dos níveis plasmáticos de eletrólitos (HARRIS *et al.*, 2015; MENKE *et al.*, 2014).

Os principais fatores de risco conhecidos para LRA incluem doenças renais subclínicas, diabetes, doenças cardiovasculares e maus súbitos como desidratação, mas efeitos adversos de fármacos também são causas bastante comuns de LRA. O uso de diversos fármacos é limitado por induzirem ou agravarem esse quadro a partir de diferentes mecanismos, tais como antineoplásicos, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e antimicrobianos, dentre os quais se destaca a classe dos aminoglicosídeos (AWDISHU; MEHTA, 2017; QU *et al.*, 2018).

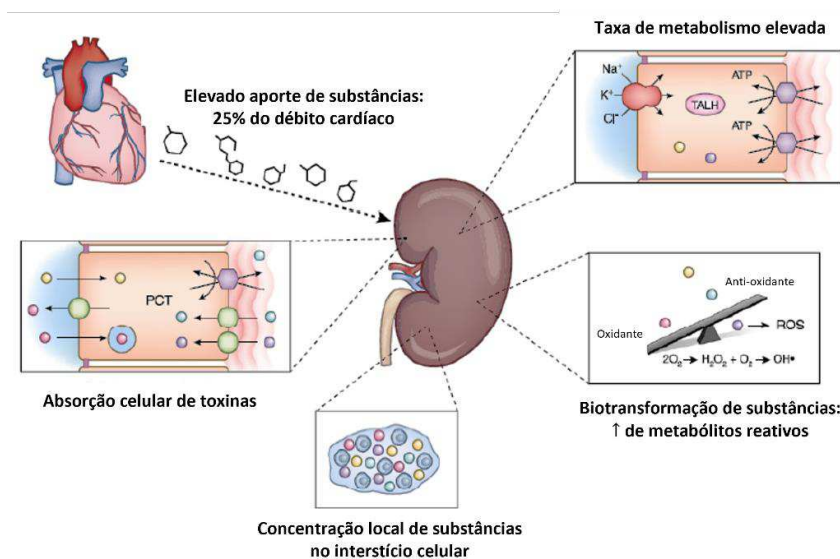
A nefrotoxicidade induzida por fármacos foi identificada em 25% dos casos de falência renal severa em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo esse também um dos fatores predominantes para a falha de desenvolvimento de fármacos, causando uma enorme perda de dinheiro e de tempo para a indústria farmacêutica (QU *et al.*, 2018; VICENTE-VICENTE *et al.*, 2017).

Entretanto, nem todos os pacientes submetidos a agentes nefrotóxicos são acometidos por lesão renal. A nefrotoxicidade induzida por fármacos depende de diferentes fatores de risco, relacionados tanto à substância – estrutura, dose, metabolismo e vias de eliminação, dentre outros –, quanto ao paciente – comorbidades, farmacogenética e atividade do sistema imunológico (CASANOVA; VICENTE-VICENTE; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2017; PERAZELLA, 2018).

2.2 Mecanismos de nefrotoxicidade induzida por fármacos

Diversos fármacos têm os rins como principal ou única via de excreção, sendo eliminados inalterados ou na forma de metabólitos através da urina. O processo de eliminação desses compostos compreende a filtração nos glomérulos, que remove de maneira rápida, embora parcialmente, os componentes indesejados do plasma; e a reabsorção e secreção ativa nos túbulos renais, onde nutrientes são seletivamente recuperados e toxinas são bombeadas por meio de transportadores expressos na membrana basolateral das células epiteliais diretamente na urina em formação. Assim, esses compartimentos são expostos a uma maior variedade e a altas concentrações de substâncias citotóxicas, em especial as células epiteliais do túbulo proximal, tornando-as mais vulneráveis, o que contribui para a nefrotoxicidade dos fármacos (DOWNES *et al.*, 2020; MORALES-ALVAREZ, 2019; WU; HUANG, 2018).

Figura 1 – Fatores renais que aumentam o risco da nefrotoxicidade induzida por fármacos.



Fonte: PERAZELLA, 2018 (adaptado).

Os mecanismos pelos quais os fármacos causam nefrotoxicidade são diversos e variam entre as classes farmacológicas dos agentes causadores, e o dano causado pode ser revertido com ajuste da posologia, mas pode ser irreversível para alguns fármacos a depender da dose, como é o caso dos antimicrobianos. Os antibióticos, como os beta-lactâmicos e os aminoglicosídeos, são fármacos sabidamente nefrotóxicos, estando entre os mais comumente administrados na população infantil, e apresentam a necrose tubular aguda (NTA), nefrite intersticial aguda (NIA) e obstrução tubular como principais causas de nefropatia (DOWNES *et al.*, 2020; LIABEUF *et al.*, 2017; QU *et al.*, 2018)

Nos glomérulos, os aminoglicosídeos aumentam a concentração intracelular de cálcio a partir de diversos mecanismos, acarretando a contração das células mesangiais, com consequente diminuição das fenestrações, o que resulta em redução da seletividade e da taxa de filtração glomerular (TFG) (LOPEZ-NOVOA *et al.*, 2011; WARGO; EDWARDS, 2014). Em paralelo, a queda da perfusão sanguínea nos rins é um mecanismo secundário decorrente do aumento da resistência do leito vascular renal devido a liberação de fatores inflamatórios, como fator de agregação plaquetária (PAF), endotelina-1 e tromboxano A₂, que promovem vasoconstrição (PERAZELLA, 2018; WU; HUANG, 2018).

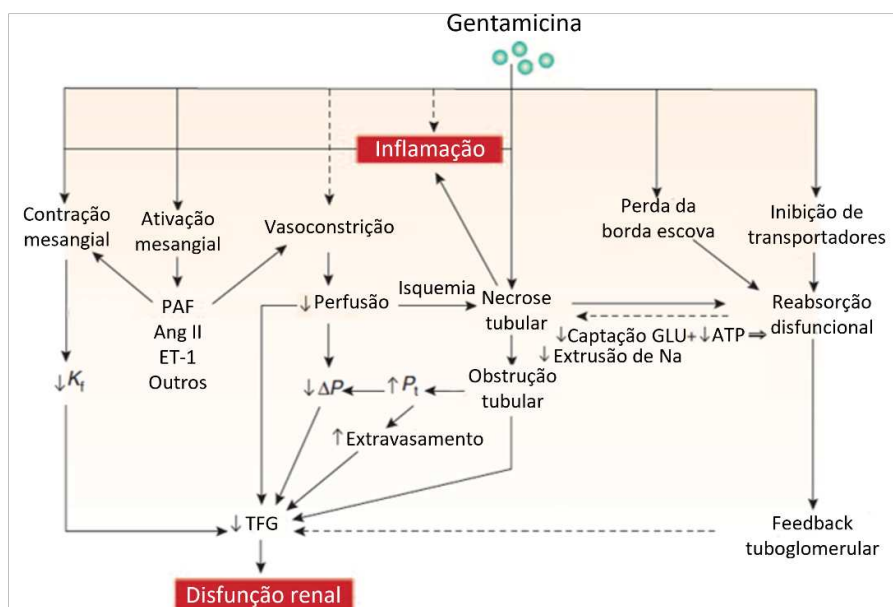
Todavia, o efeito direto sobre as células tubulares é o principal mecanismo de nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos (MORALES-ALVAREZ, 2019). Diversos estudos já demonstraram que essa toxicidade resulta em NTA, com alterações glomerulares, hemodinâmicas e renovasculares, as quais levam a uma redução da TFG, acúmulo de compostos nitrogenados na urina, como ureia e creatinina, e desequilíbrio hidroeletrólítico (HARRIS *et al.*, 2015; MENKE *et al.*, 2014; QU *et al.*, 2018).

Os danos tubulares desencadeiam a disfunção renal a partir do depósito de componentes celulares no túbulo proximal, incluindo o próprio fármaco cristalizado, prejudicando a absorção tubular e elevando a concentração de eletrólitos e a pressão hidrostática no túbulo distal, o que por sua vez promove os mecanismos vasoconstritores para evitar a perda de água e eletrólitos. A morte de células tubulares também ativa uma resposta inflamatória que eleva a migração de monócitos e macrófagos para o local, amplificando o dano tecidual e mantendo a TFG baixa (DOWNES *et al.*, 2020; VICENTE-VICENTE *et al.*, 2017).

Outro mecanismo envolvido na NTA é o estresse oxidativo, causado pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e pela depleção de substratos celulares antioxidantes, como a glutatona reduzida (GSH), o que também contribui com a acumulação de ERO. Aminoglicosídeos elevam a produção de ERO no interior da célula promovendo uma disfunção mitocondrial ao inibirem a cadeia respiratória, o que ativa vias apoptóticas de morte celular.

Além disso, a peroxidação dos lipídeos de membrana causada pelas ERO também contribui para a morte celular programada por apoptose e os danos de membrana promovem a necrose celular. Dentre estes agentes oxidantes produzidos pela mitocôndria na nefropatia induzida pelos aminoglicosídeos, destaca-se o ânion superóxido (HOSO₂HATA, 2016).

Figura 2 – Mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade da Gentamicina.



Ang-II, angiotensina-II; ATP, adenosina trifosfato; ET-1, endotelina-1; GLU, glicose; TFG, taxa de filtração glomerular; K_f, coeficiente de ultrafiltração; ΔP , pressão de filtração glomerular; PAF, fator ativador de plaquetas; P_t, pressão tubular.

Fonte: LOPEZ-NOVOA *et al.*, 2011 (adaptado).

Contudo, quando o estresse oxidativo causado pelos aminoglicosídeos é totalmente prevenido, sua nefrotoxicidade é minimizada ao máximo (CASANOVA; VICENTE-VICENTE; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2017). Isso indica que o estresse oxidativo tem um papel central nos mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade induzida por Gentamicina, sendo os compostos com propriedades antioxidantes, sobretudo os de origem natural e sintética, alternativas promissoras para a prevenção ou reversão da lesão renal induzida pelos aminoglicosídeos (KHAJAVI RAD; MOHEBBATI; HOSSEINIAN, 2017; VICENTE-VICENTE *et al.*, 2017).

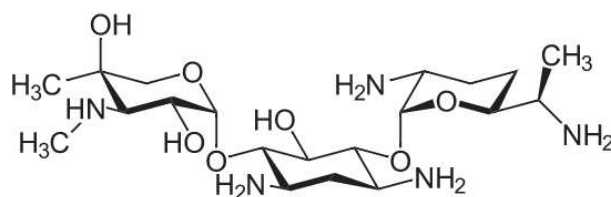
2.3 Gentamicina

2.3.1 Classificação e indicações terapêuticas

A Gentamicina é um antibiótico estruturalmente policatiônico pertencente à classe dos aminoglicosídeos, descoberto inicialmente em 1963 e bastante difundido atualmente na forma do sal sulfato de Gentamicina, que inibe *in vitro* muitas cepas de estafilococos, coliformes e outras bactérias Gram-negativas, mas tem uma eficácia limitada contra Gram-positivas e anaeróbios. É administrada principalmente por via intramuscular ou endovenosa em dose única diária, geralmente em combinação a um segundo agente, como beta-lactâmicos, para um efeito sinérgico (FREEMAN *et al.*, 1997; LIABEUF *et al.*, 2017).

Também pode ser encontrada, em concentrações menores, em diversas formulações de uso tópico, como cremes e pomadas, empregadas no tratamento de queimaduras, feridas ou lesões cutâneas com o intuito de prevenir infecções (JACKSON; CHEN; BUISING, 2013). Apesar de ser um dos aminoglicosídeos mais nefrotóxicos, a Gentamicina ainda é frequentemente utilizada como fármaco de primeira ou segunda escolha para diversas situações clínicas e tem sido amplamente empregada em estudos *in vitro* e *in vivo* de nefrotoxicidade (WU; HUANG, 2018).

Figura 3 – Estrutura molecular da Gentamicina.



Fonte: Lecturio. Disponível em: <<https://cdn.lecturio.com/assets/Chemical-structure-of-gentamicin.png>>. Acesso em: 10 de novembro de 2022.

2.3.2 Farmacocinética e efeitos adversos

A Gentamicina não é metabolizada, mas amplamente distribuída de forma inalterada pelo espaço extracelular antes de ser depurada essencialmente pelos rins. Apesar de

indicada para o tratamento de diversas infecções bacterianas, em especial por formas resistentes de bactérias Gram negativas, seu uso é limitado devido aos efeitos adversos potencialmente graves, mais comumente a ototoxicidade e a nefrotoxicidade, que acometem cerca de 10 a 20% dos pacientes em tratamento (HAYWARD *et al.*, 2018; WU; HUANG, 2018).

A citotoxicidade da Gentamicina ocorre nas células onde se acumula – sendo o grau das lesões provocadas dose-dependente –, e nos rins essas células correspondem às células corticais, principalmente as que compõem o epitélio do túbulo proximal. Além de provocar a morte de células tubulares, a Gentamicina prejudica a reabsorção tubular inibindo diversos transportadores de membrana, levando a uma condição clínica semelhante a síndrome de Fanconi (MORALES-ALVAREZ, 2019).

Ao ser livremente filtrada no glomérulo, uma porção do fármaco se liga ao complexo receptor megalina-cubilina, presente na membrana dessas células, e é endocitada, acumulando-se principalmente com lisossomos, no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático. Ao atingir determinado limiar, a Gentamicina acumulada extravasa para o citosol, onde interage com fosfolipídios de membrana, danificando-a e comprometendo sua integridade. A Gentamicina livre no citosol também age sobre a mitocôndria, induzindo apoptose, com liberação de citocromo c e ativação de caspase-3, e interrompendo a cadeia respiratória, resultando em estresse oxidativo em decorrência da produção de ânions hidroxila e superóxido (DOWNES *et al.*, 2020; MORALES-ALVAREZ, 2019; WU; HUANG, 2018).

2.3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem um papel significativo na fisiopatologia da LRA induzida pela Gentamicina, com alteração da função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (CASANOVA; VICENTE-VICENTE; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2017). O estresse oxidativo ocorre como resultado de uma relação produção/remoção de radicais livres aumentada, além da insuficiência de substâncias antioxidantes, sendo a mitocôndria o principal alvo das ERO, que comprometem a integridade da membrana mitocondrial e induzem a liberação de proteínas pró-aptóicas como o citocromo c (HOSOHATA, 2016).

As ERO produzidas por estímulo da Gentamicina, ao oxidarem diversas moléculas celulares importantes, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, contribuem para a disfunção e morte celular, contração do mesângio e do leito vascular, e inflamação. Radicais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio também ativam o fator nuclear $\kappa\beta$, um componente chave da modulação do processo inflamatório. Além disso, o óxido nítrico derivado da óxido

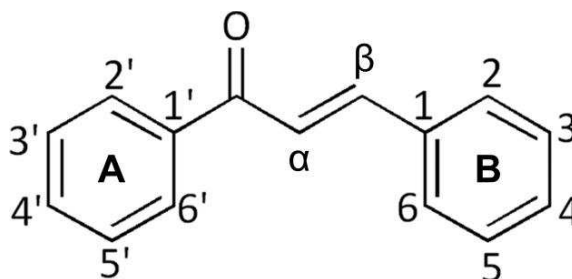
nítrico sintase induzida (iNOS) reage com o superóxido para produzir peroxinitrito, um radical que também contribui para o dano celular e para a contração vascular (CASANOVA; VICENTE-VICENTE; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2017).

2.4 Chalconas

2.4.1 Origem e estrutura

Chalconas são cetonas aromáticas derivadas do metabolismo secundário vegetal, sendo precursores dos flavonoides. Elas são pigmentos amarelados distribuídos em diversas partes de plantas leguminosas. Constituem um grupo de compostos de cadeia aberta que compartilham um núcleo estrutural fundamental, chamado chalconoide ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona, em que dois anéis aromáticos (A e B) são conectados por um sistema carbonílico α , β -insaturado (ADELUSI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 4 – Estrutura molecular fundamental das chalconas.



Fonte: BANDEIRA *et al.*, 2019 (adaptado).

Um amplo espectro de atividades biológicas tem sido atribuído às chalconas, incluindo propriedades analgésicas (ROCHA *et al.*, 2018) antifúngicas e antimicrobianas (BANDEIRA *et al.*, 2020), antitumorais (PRASAD; RANI; RAO, 2013), anti-inflamatórias (SAKATA *et al.*, 2020) e antioxidantes (SÖKMEN; AKRAM KHAN, 2016). Essa variedade de atividades se deve principalmente às numerosas substituições possíveis nos anéis aromáticos das chalconas. Além disso, a produção de derivados sintéticos das chalconas com base na reação de condensação de Claisen-Schmidt, por exemplo, permite que um vasto número de compostos seja obtido (ADELUSI *et al.*, 2021; BANDEIRA *et al.*, 2019).

A existência da insaturação e de um grupo carbonila entre dois anéis aromáticos

permite a deslocalização de elétrons π por toda a molécula, característica que confere às chalconas grande potencial de participar de reações com transferência de densidade eletrônica (USTABAŞ *et al.*, 2018). Dado a grande variedade de estruturas químicas desses compostos, foi observado que a funcionalização do anel A tende a potencializar as atividades biológicas da molécula e que o grupo amino teria relação com o efeito antioxidante (DIMMOCK *et al.*, 2003; ROMAGNOLI *et al.*, 2009).

2.4.2 Propriedades farmacológicas

Em adição a antioxidantes naturais como os compostos fenólicos, muitos estudos teóricos e experimentais têm resultado na identificação de chalconas como potentes antioxidantes por causa de sua habilidade de captura (*scavenging*) de ERO e radicais livres. A atividade scavenger desses compostos tem sido relacionada com a presença de grupos hidroxila (-OH) e amino (-NR₂) – ambos ativadores e constituídos por heteroátomos do mesmo período da tabela periódica –, nas posições *orto* e *para* dos anéis aromáticos (RANI *et al.*, 2019).

Devido ao seu pequeno tamanho molecular e a facilidade de alterar sua estrutura química, capaz de conter diferentes radicais, moléculas de chalconas podem apresentar múltiplas atividades biológicas, além do efeito antioxidante (GEORGE *et al.*, 2022). Chalconas e seus derivados já demonstraram ação antioxidante através de regulação da expressão gênica (ADELUSI *et al.*, 2021), modulação enzimática (MENEZES; DIDERICH, 2019) e atividade quelante (XIAO *et al.*, 2017). Ademais, as mesmas moléculas atuam como agentes multifuncionais por também apresentarem diferentes graus de atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antineoplásica.

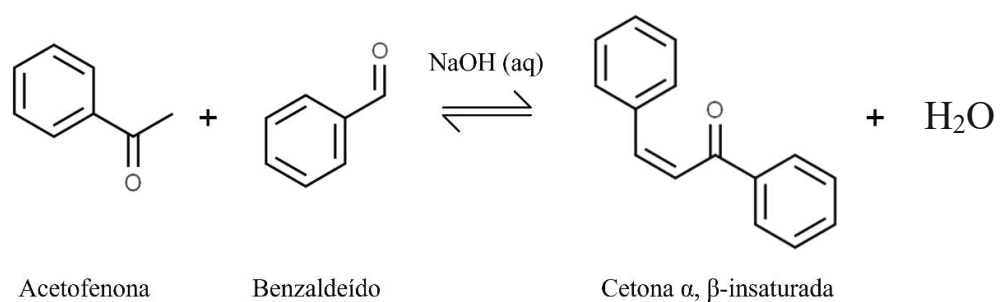
2.4.3 Síntese e substituições

A adição de diferentes grupos doadores ou receptores de elétrons aos anéis aromáticos do núcleo chalconoide tem permitido a obtenção de compostos estruturalmente semelhantes, mas com atividades vantajosas para diferentes casos clínicos (DÍAZ-TIELAS *et al.*, 2016). Não obstante, BANDEIRA e colaboradores (2019) já sintetizaram e caracterizaram a partir da 4'-aminoacetofenona produtos com atividades antimicrobiana, antineoplásica e anti-inflamatória, embora sua atividade antioxidante especificamente ainda não tenha sido descrita.

Para obtenção de derivados pela reação de Claisen-Schmidt, é adicionado a uma solução etanólica o composto de partida, como a 4'-aminoacetofenona, uma solução de

benzaldeído e outros conjugados, e uma solução de NaOH 50%. O sólido formado é filtrado sob pressão reduzida, lavado com água gelada e analisado por cromatografia de camada delgada (CCD). A partir da identificação de efeitos associados a determinada estrutura, novas modificações estruturais na molécula podem ser facilmente providenciadas a fim de potencializar ou amplificar a atividade do composto (BANDEIRA *et al.*, 2019).

Figura 5 – Reação de condensação de Claisen-Schmidt.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor de *p*-aminofenilchalconas em modelo de citotoxicidade em células tubulares humanas induzida por Gentamicina.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do pré e pós-tratamento com *p*-aminofenilchalconas sobre a citotoxicidade induzida por Gentamicina em células tubulares humanas;
- Investigar o efeito de *p*-aminofenilchalconas sobre os sistemas de defesa antioxidantes das células tubulares tratadas com Gentamicina;
- Relacionar os efeitos biológicos com as estruturas das chalconas sintéticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das substâncias de estudo e preparo das soluções de trabalho

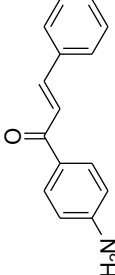
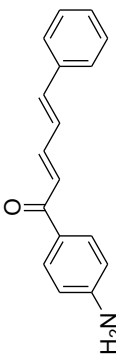
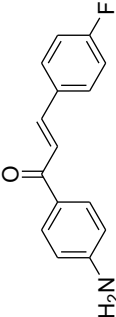
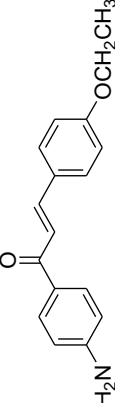
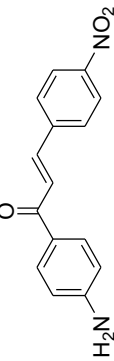
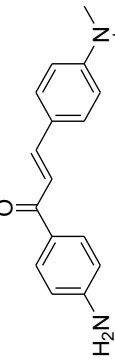
Como solução estoque para preparação das alíquotas de Gentamicina utilizadas nos ensaios de pré e pós-tratamento com as chalconas e para determinação da IC_{50} em células HK-2, foi utilizado uma solução injetável estéril de 250 mL de sulfato de Gentamicina ($477,56 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), que corresponde a, aproximadamente, 77 mM de Gentamicina. Durante os experimentos, alíquotas foram diluídas com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) até as concentrações desejadas (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mM).

As chalconas utilizadas no presente estudo foram sintetizadas e caracterizadas no Laboratório de Síntese Orgânica, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo professor Dr. Helcio da Silva Santos, e generosamente cedidas ao Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), da Universidade Federal do Ceará, para realização dos ensaios de avaliação da viabilidade celular e da atividade biológica.

As moléculas foram sintetizadas e caracterizadas conforme descritas anteriormente por BANDEIRA *et al.*, 2019. Para a síntese, foi empregada a reação de condensação de Claisen-Schmidt em meio alcalino (DUCKI *et al.*, 1998). Neste estudo foram analisadas, ao todo, seis 4'-aminofenilchalconas com diferentes substituintes em C-4, no anel B, cuja relação encontra-se descrita na Tabela 1. Todas as estruturas dos compostos estudados foram previamente verificadas por espectrometria de massa pela técnica de FTIR (infravermelho por transformada de Fourier).

Soluções-estoque a 200 mM de cada uma das chalconas foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e refrigeradas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a realização dos experimentos, soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções-estoque, utilizando solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS – NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,47 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; pH $7,40 \pm 0,5$). As concentrações das *p*-aminofenilchalconas utilizadas nesse trabalho foram 250; 125; 62,50; 31,25 e 15,62 μM . Todas as diluições foram realizadas de forma que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 0,5%.

Tabela 1 – Chalconas derivadas da *p*-aminocetofenona.

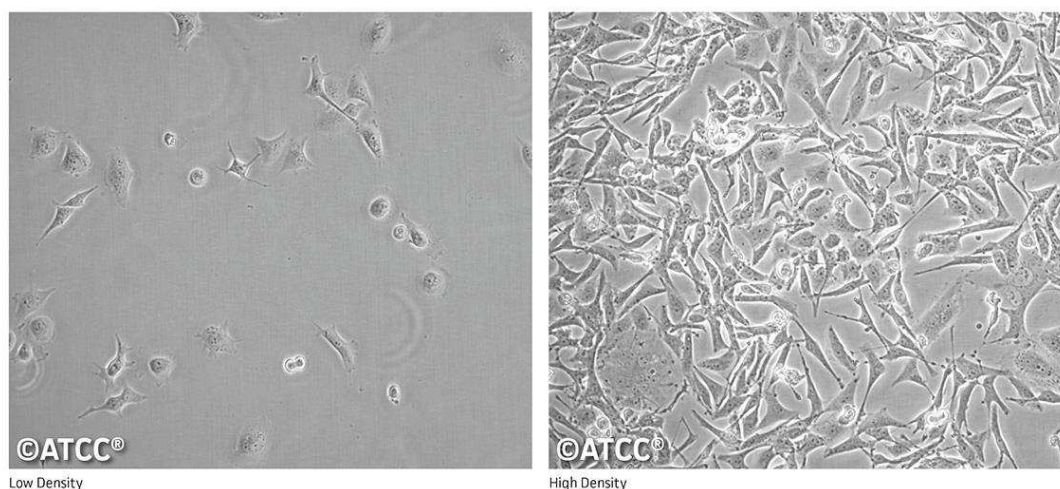
Estrutura química	Nomenclatura IUPAC	Sigla
	(<i>E</i>)-1-(4-amino fenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	CPAB
	(<i>2E,4E</i>)-1-(4-amino fenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona	CPAC
	(<i>E</i>)-1-(4-amino fenil)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-ona	CPA4F
	(<i>E</i>)-1-(4-amino fenil)-3-(4-etoxifenil)prop-2-en-1-ona	CPA4Et
	(<i>E</i>)-1-(4-amino fenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	CPA4NO ₂
	(<i>E</i>)-1-(4-amino fenil)-3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona	CPADMA

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Cultivo e tratamento das células HK-2

Todos os experimentos foram realizados com o emprego de células HK-2 (Figura 6), uma linhagem imortalizada de células epiteliais renais de túbulo proximal humano (RYAN et al., 1994), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas no Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará, em garrafas plásticas estéreis de 75 cm² com meio DMEM (pH 7,40 ± 0,05), suplementado com 10% de SBF, 200 UI · mL⁻¹ de penicilina e 50 mg · L⁻¹ de Gentamicina.

Figura 6 – Fotomicrografia de células HK-2.

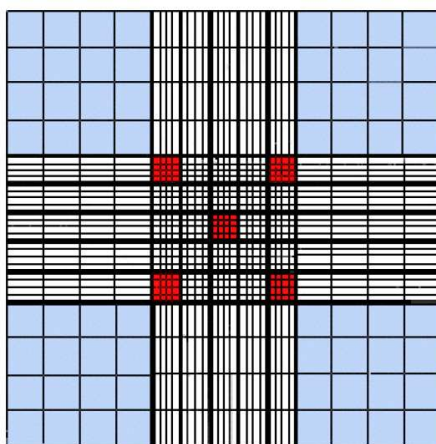


Fonte: Adaptado de ATCC. Disponível em: <<https://www.atcc.org/-/media/product-assets/images/micrographs/cell-biology/crl2190.jpg?rev=f4f5efc113b0412aac26f9b2d6fb1e05>>. Acesso em: 10 de novembro de 2022.

As células cultivadas foram mantidas em incubadora sob atmosfera controlada (37 ± 3 °C, 5% de CO₂), e o crescimento celular em monocamada foi acompanhado diariamente através da observação por microscópio óptico invertido até que o estado próximo à confluência fosse atingido. Então, as células foram recultivadas removendo-se o meio da garrafa e lavando-a com solução de PBS estéril. Em seguida, as células foram deslocadas com 0,5-1 mL de solução de tripsina/EDTA 0,25% por 5-10 minutos a 37 °C sob abrigo da luz. Por fim, a tripsina foi inativada adicionando 1-2 mL de DMEM a 10% SBF e alíquotas da suspensão de células foram transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM suplementado.

Na preparação dos experimentos, as garrafas de células foram lavadas com PBS e tratadas com tripsina (por 5-10 min, 37 °C) para deslocamento das células, que foram transferidas para tubo cônico e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. O pellet formado foi ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM e uma alíquota foi diluída em solução de azul de tripan (0,3% p/v em PBS), para contagem e determinação da concentração celular em câmara de Neubauer, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Representação da área de contagem na Câmara de Neubauer, sendo as áreas de cor azul utilizadas para contagem e determinação da densidade de células HK-2.



Fonte: MAGALHÃES, 2019.

Para mensuração da densidade celular, aplicou-se a Equação 1, considerando F_d como o fator da diluição utilizada para contagem. Dessa forma, suspensões de 1×10^5 células/mL foram distribuídas em placas de acrílico estéreis de 96 poços (200 μ L/poço) e, após o plaqueamento, as células foram incubadas *overnight* em condições ideais para que aderissem e fosse possível a realização dos tratamentos de acordo com os ensaios a serem executados.

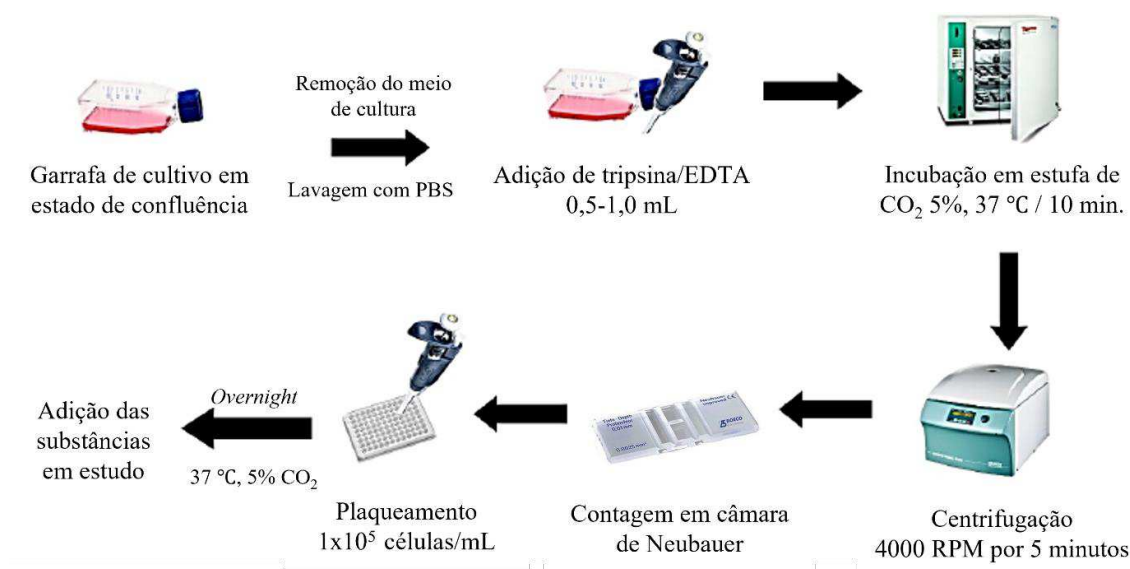
Equação 1 – Cálculo da concentração celular em Câmara de Neubauer.

$$\text{Concentração celular} = (\text{Número de células contadas na câmara} / 4) \times 10^4 \times F_d$$

Para os ensaios de citotoxicidade da Gentamicina, as células plaqueadas foram tratadas por 24 horas com cada uma das concentrações (8,0; 4,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mM.) em triplicata. Então, os resultados de viabilidade celular foram comparados aos de um grupo

controle de células não tratadas e os de um grupo tratado somente com veículo (DMSO 0,5%). Dessa maneira foi possível determinar a concentração necessária de Gentamicina para provocar uma redução da viabilidade celular em 50% (IC₅₀) por regressão não-linear, sendo essa concentração utilizada nos ensaios subsequentes.

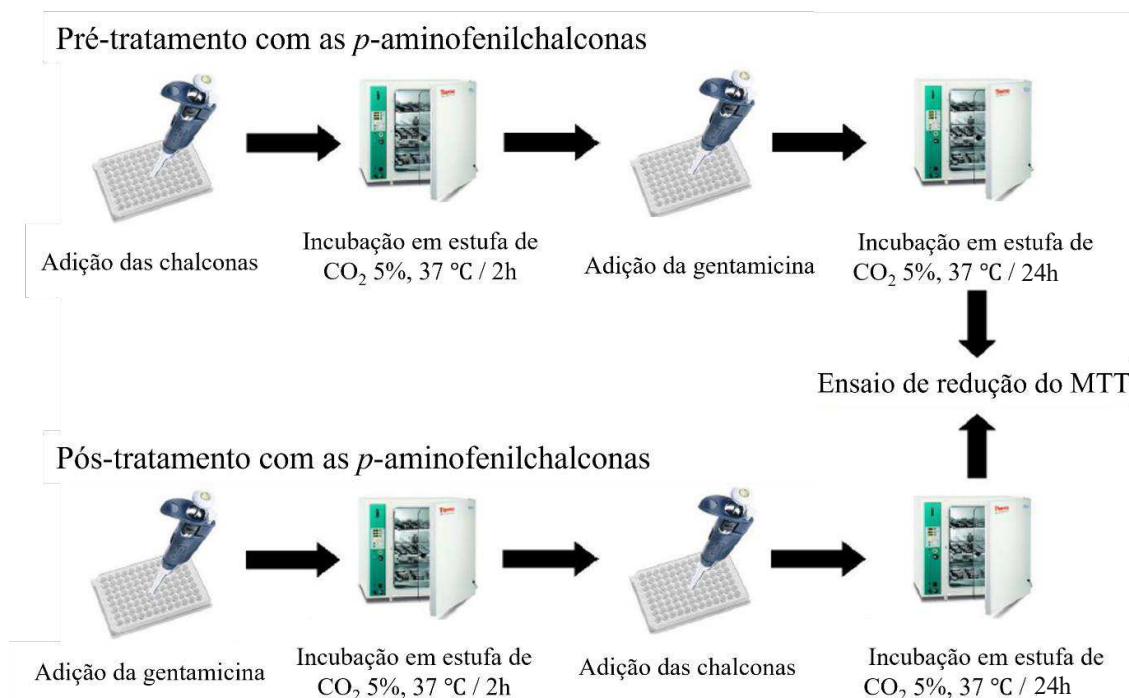
Figura 8 – Esquema representativo do procedimento de plaqueamento das células HK-2 para os ensaios de viabilidade celular.



Fonte: MENEZES, 2017 (adaptado).

Para avaliar o efeito protetor das substâncias em estudo, foi aplicado um protocolo de pré e pós-tratamento com as *p*-aminofenilchalconas e a Gentamicina. Para o protocolo de pré-tratamento, os poços das placas foram tratados previamente com diferentes concentrações de cada uma das drogas (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μ M) e após 2 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foi adicionado aos poços a solução IC₅₀ de Gentamicina. Para o pós-tratamento, foram utilizadas as mesmas concentrações de Gentamicina e de *p*-aminofenilchalconas, entretanto a solução de Gentamicina foi adicionada aos poços primeiro, e as chalconas, após 2 horas de incubação. Por fim, em ambos os protocolos, as placas foram incubadas por 24 horas a partir do momento da adição da Gentamicina.

Figura 9 – Esquema representativo do procedimento de pré e pós-tratamento com as *p*-aminofenilchalconas na LRA induzida pela Gentamicina.

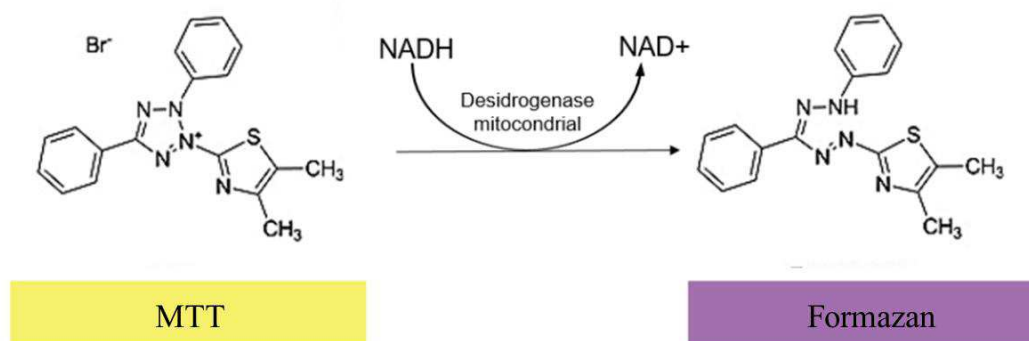


Fonte: MAGALHÃES, 2019 (adaptado).

4.3 Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT

Para avaliação da citotoxicidade da Gentamicina e das *p*-aminofenilchalconas na linhagem celular estudada, bem como o pré e o pós-tratamento com as chalconas, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo), um sal de tetrazólio de coloração amarela que é prontamente endocitado pelas células viáveis e metabolizado via desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em formazan, um sal insolúvel, de coloração arroxeadada, que é então liberado para o meio (MOSMANN, 1983).

Figura 10 – Princípio reacional do ensaio de redução do MTT.



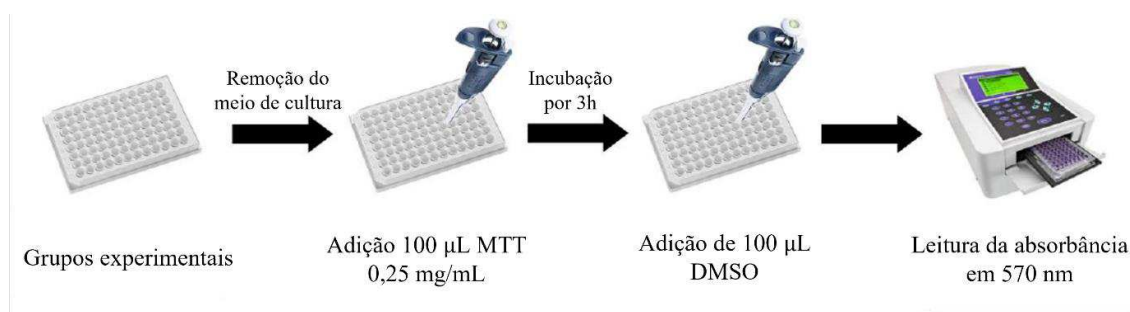
Fonte: Embrapa (adaptado). Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191253/1/CT-427-1572-final2.pdf>>.

Acesso em: 10 de novembro de 2022.

As placas com as células tratadas foram centrifugadas (4000 RPM, por 5 minutos) e o sobrenadante, removido, adicionando-se aos poços 100 μL de solução de MTT 0,25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Após incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 3-4 horas, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante, descartado. Em seguida, foi adicionado 100 μL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Células não-viáveis são incapazes de internalizar e reduzir o MTT, logo a concentração de sal de formazan produzido e a intensidade da coloração arroxeadada em cada poço são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, sendo medida pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm.

Figura 11 – Esquema representativo do procedimento do ensaio de redução do MTT.

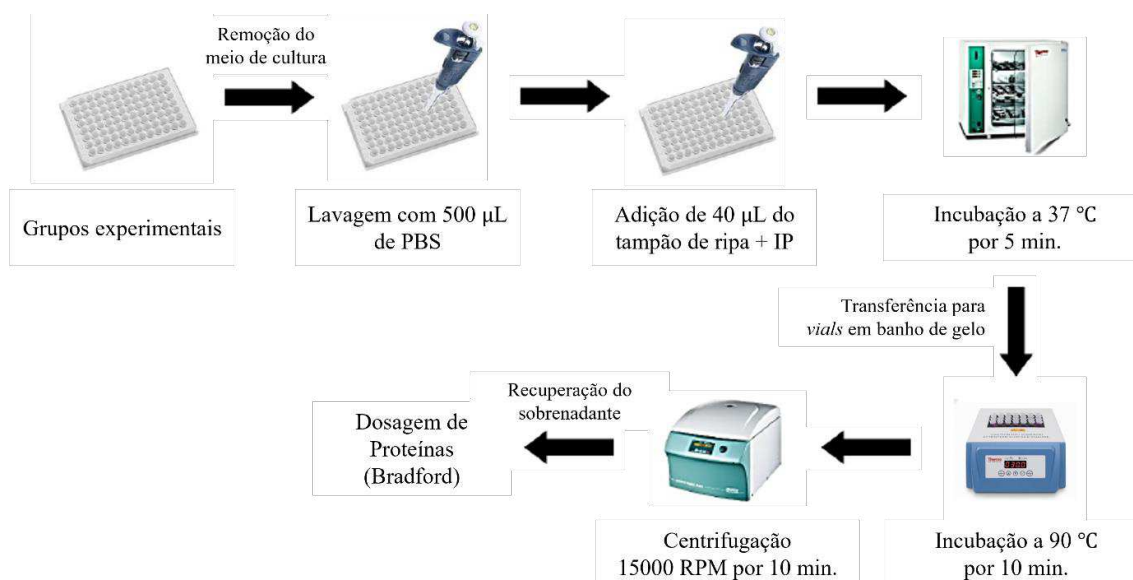


Fonte: MENEZES, 2017 (adaptado).

4.4 Ensaios de avaliação do estresse oxidativo

Para realização dos seguintes ensaios, foi obtido um lisado a partir das células em cultivo, utilizando-se uma solução de inibidor de protease (IP) em tampão de RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,40 \pm 0,05; NaCl 150 mM; deoxicolato de sódio 0,25%; NaF 10 μ g/mL e EDTA 1 mM) 1:100 para romper as membranas das células. Após os tratamentos, os poços das placas foram lavados com 500 μ L de PBS e em seguida as placas foram incubadas com 40 μ L da solução de tampão de RIPA por poço durante 5 minutos. Então os lisados foram recuperados transferidos em banho de gelo para os respectivos *vials* de cada grupo experimental. Por fim, os *vials* foram incubados em banho seco a 90 \pm 1 $^{\circ}$ C por 10 minutos e centrifugados a 15000 RPM por mais 10 minutos. O sobrenadante foi então recuperado e refrigerado a -20 $^{\circ}$ C até a realização dos experimentos. Previamente às análises, o conteúdo proteico do lisado de cada grupo experimental foi mensurado, utilizando-se a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976).

Figura 12 – Esquema representativo do procedimento para obtenção do lisado celular e da dosagem de proteínas.

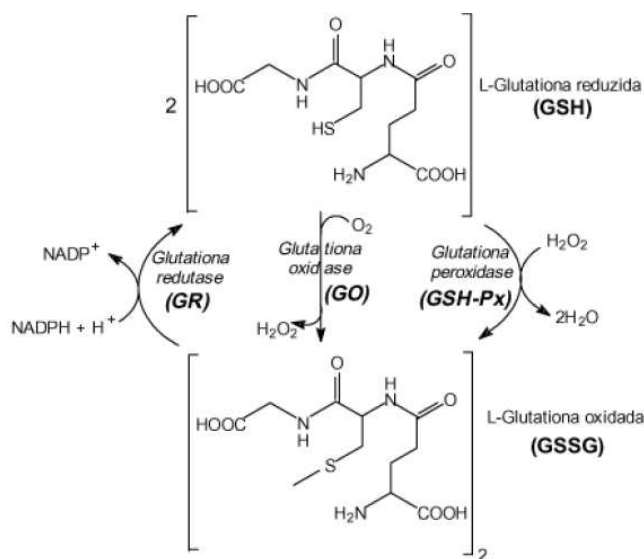


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.1 Determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH)

Sob condições oxidantes, em uma reação catalisada pela glutatona peroxidase (GSH-Px), duas moléculas de GSH são capazes de doar um elétron para cada molécula de GSSG, que pode ser reduzida novamente para GSH pela ação da enzima glutatona redutase (GR). Um decréscimo das concentrações de GSH e/ou alta concentração de GSSG e uma baixa relação das concentrações dessas moléculas, são interpretadas como prova de desequilíbrio redox (GIUSTARINI *et al.*, 2011).

Figura 13 – Interconversão da glutatona entre as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).



Fonte: BALLATORI *et al.*, 2009 (adaptado).

Para determinação da glutatona reduzida, 200 μ L do lisado celular de cada grupo experimental foi adicionado a 400 μ L de solução tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,90 \pm 0,05) em placa de 96 poços. Então, 20 μ L do cromógeno DTNB [5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobezóico)], ou Reagente de Ellman, foi adicionado para então a absorbância ser medida por espectrofotometria a 412 nm. Os resultados foram obtidos a partir de uma curva de calibração com padrão de GSH e expressos em nmol \cdot mg⁻¹ de proteína.

Figura 14 – Esquema representativo do procedimento para determinação dos níveis de glutathiona (GSH).

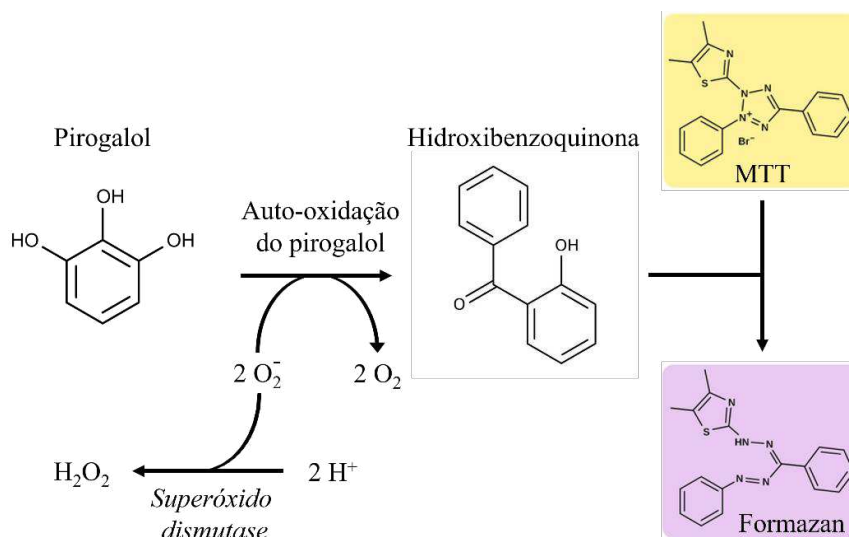


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Determinação do acúmulo de ânions superóxido

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada indiretamente pela observação do acúmulo de ânions superóxido através da adaptação do método de MARKLUND; MARKLUND (1974). O método tem como princípio a formação de hidroxibenzoquinona pela auto-oxidação do pirogalol e a inibição da redução do MTT. Quando não é neutralizado pela SOD, o ânion superóxido reage com o pirogalol produzindo a hidroxibenzoquinona, que por sua vez reage com o MTT. O formazan formado pode ser detectado por espectrofotometria pela absorbância da cor roxa a 570 nm.

Figura 15 – Princípio reacional do ensaio para determinação do acúmulo de superóxido.

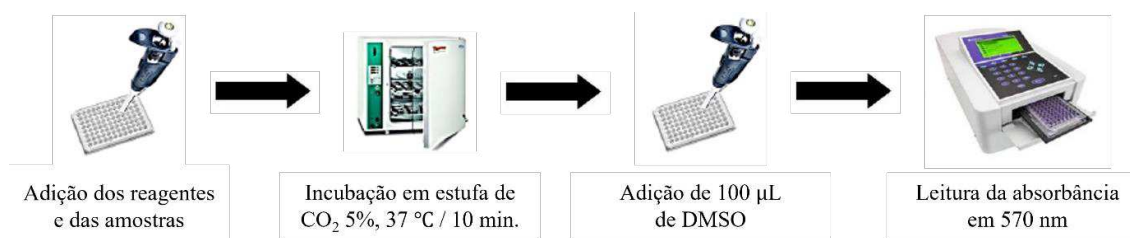


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a realização do ensaio, 30 μL do lisado celular de cada grupo experimental, 99 μL de PBS, 6 μL de 1,25 mmol/L de MTT e 15 μL de 100 $\mu\text{mol/L}$ de pirogalol foram dispostos em placa de 96 poços, onde o poço referente ao branco da reação continha apenas 144 μL de PBS e 6 μL de MTT. A placa foi incubada a 37 ° C por 10 min e, em seguida, 150 μL de DMSO foram adicionados à placa para promover a parada da reação.

Para mensuração do acúmulo de superóxido, foi subtraído o resultado obtido da amostra pelo valor encontrado do branco e, a seguir, esse valor foi dividido pelo encontrado na diferença do controle. A partir da correção pela concentração de proteínas totais no sobrenadante, a avaliação do acúmulo de superóxido foi expressa em percentual em relação ao grupo controle.

Figura 16 – Esquema representativo do procedimento do ensaio para determinação do acúmulo de superóxido.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Análise estatística

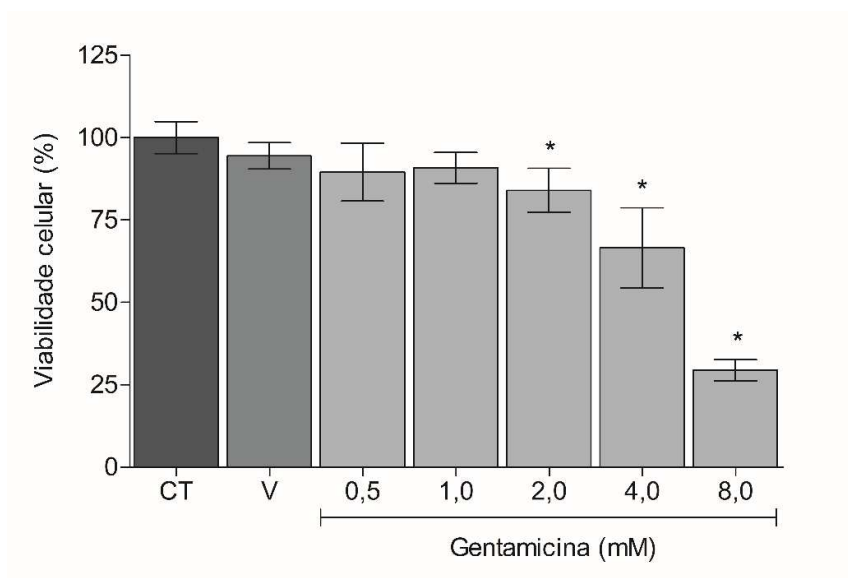
Para cada ensaio, foram realizados três experimentos independentes em triplicata ($n=3$) e os resultados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de IC_{50} foram determinados por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram expressos em planilhas com utilização do software Microsoft Office Excel[®] 2019 e, para a comparação dos grupos experimentais, utilizou-se o teste estatístico *one-way* ANOVA, com pós-teste de Dunnett, empregando-se $p<0,05$ como critério de significância, a partir do software GraphPad Prism[®], versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade da Gentamicina em células HK-2

Os resultados do ensaio de redução do MTT foram utilizados para avaliar a citotoxicidade da Gentamicina sobre a linhagem de células renais HK-2, a partir dos quais determinou-se a IC_{50} empregada nos ensaios posteriores. Logo, dentre as concentrações estudadas, observou-se que a Gentamicina foi capaz de reduzir a viabilidade celular a partir da concentração de 2 μ M (Figura 17 e Tabela 2). A IC_{50} foi, então, obtida a partir de uma regressão não-linear, tal que $IC_{50} = 5,28 \pm 0,57$ mM.

Figura 17 – Toxicidade da Gentamicina em células renais HK2 verificada pelo método de redução do MTT.



Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. Como veículo (V), foi utilizado DMSO (concentração final de 0,5%). * $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Viabilidade de células HK-2 tratadas com Gentamicina em diferentes concentrações verificado pelo método de redução do MTT.

Viabilidade celular (%)	
Controle (CT)	100,0 ± 1,61
Veículo (V)	94,39 ± 1,33
GM 0,5 mM	89,49 ± 2,91
GM 1,0 mM	90,77 ± 1,54
GM 2,0 mM	83,95 ± 2,23*
GM 4,0 mM	66,52 ± 4,04*
GM 8,0 mM	29,39 ± 3,22*
IC₅₀ = 5,28 ± 0,57 mM	

Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. Como veículo (V), foi utilizado DMSO (concentração final de 0,5%). A IC₅₀ é a concentração com a qual foi observada morte de aproximadamente 50% da população celular. *p<0,05 vs. grupo controle (CT).

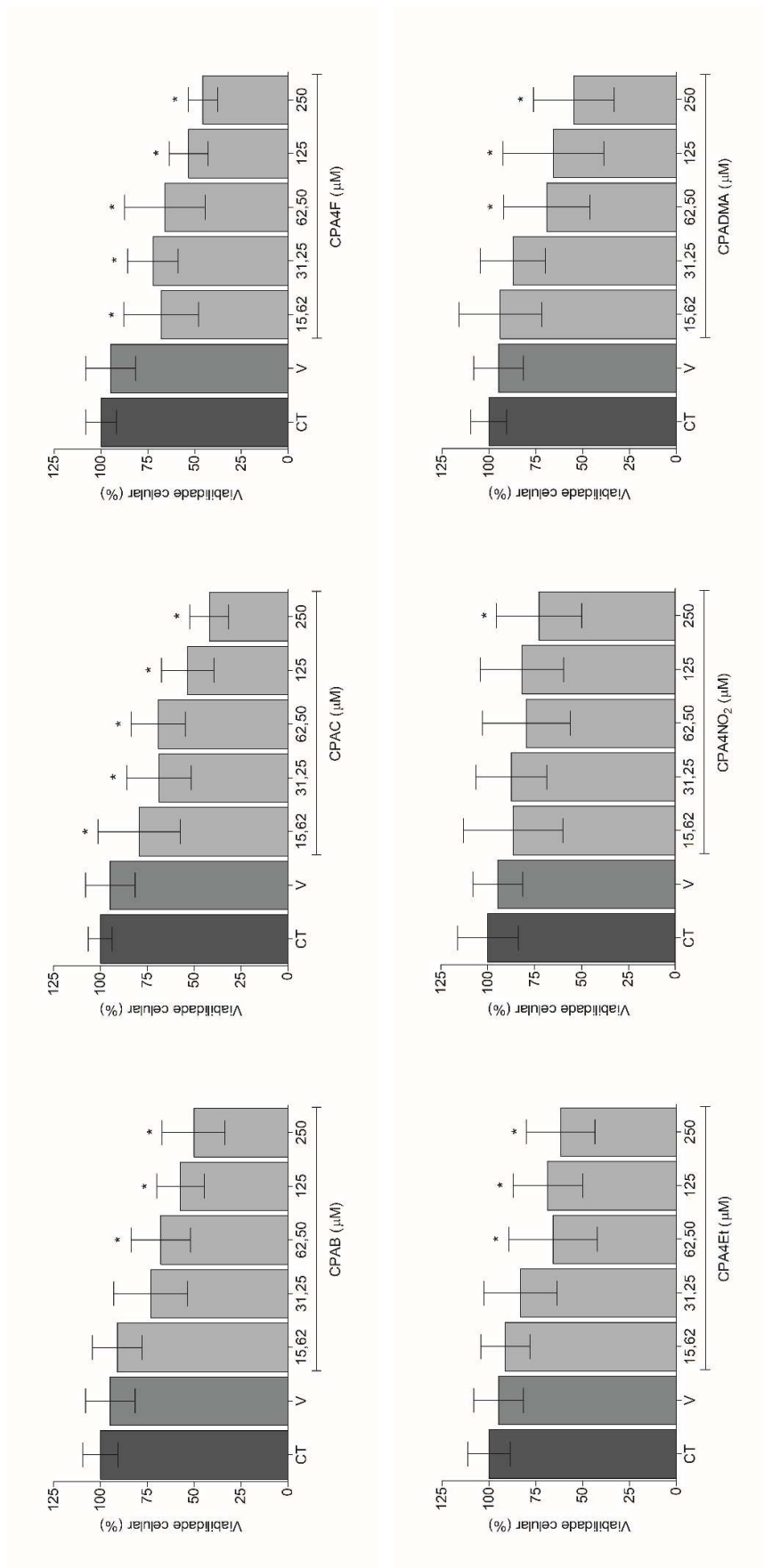
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Avaliação da citotoxicidade das *p*-aminofenilchalconas em células HK-2

A fim de avaliar o efeito das chalconas sobre a viabilidade das células renais HK-2 e determinar a faixa de trabalho adequada para os experimentos subsequentes, também foram utilizados os resultados percentuais do ensaio de redução do MTT. Dentre as moléculas estudadas, CPAC e CPA4F foram as únicas que apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, sendo, por isso, excluídas do estudo (Figura 18 e Tabela 3).

Por outro lado, foi observado que CPAB, CPA4Et e CPADMA apresentaram toxicidade nas concentrações mais elevadas (62,5; 125 e 250 µM). Já para a molécula CPA4NO₂, esse efeito ocorreu apenas na concentração de 250 µM. Dessa maneira, os ensaios seguintes foram realizados com concentrações iguais e inferiores a 31,25 µM para as três primeiras moléculas em questão, e iguais e inferiores a 125 µM para a última.

Figura 18 – Toxicidade das *p*-aminofenilchalconas em células renais HK-2 verificada pelo método de redução do MTT.



Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com *one-way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. Como veículo (V), foi utilizado DMSO (concentração final de 0,5%). * $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Percentual de viabilidade de células HK-2 tratadas com *p*-aminofenilchalconas em diferentes concentrações verificado pelo método de redução do MTT.

Viabilidade celular (%)			
CPAB		CPAC	
Controle (CT)	100,0 ± 2,70	Controle (CT)	100,0 ± 1,84
Veículo (V)	94,69 ± 3,81	Veículo (V)	94,69 ± 3,81
CPAB 15,62 µM	90,90 ± 3,99	CPAC 15,62 µM	79,37 ± 6,33*
CPAB 31,25 µM	73,08 ± 5,69	CPAC 31,25 µM	68,74 ± 4,96*
CPAB 62,50 µM	67,77 ± 4,60*	CPAC 62,50 µM	69,08 ± 4,18*
CPAB 125 µM	57,27 ± 3,65*	CPAC 125 µM	53,39 ± 4,02*
CPAB 250 µM	50,15 ± 4,83*	CPAC 250 µM	41,89 ± 2,96*
CPA4F		CPA4Et	
Controle (CT)	100,0 ± 2,35	Controle (CT)	100,0 ± 3,28
Veículo (V)	94,69 ± 3,81	Veículo (V)	94,69 ± 3,81
CPA4F 15,62 µM	67,80 ± 6,33*	CPA4Et 15,62 µM	91,27 ± 3,78
CPA4F 31,25 µM	72,24 ± 3,87*	CPA4Et 31,25 µM	83,04 ± 6,17
CPA4F 62,50 µM	65,71 ± 6,23*	CPA4Et 62,50 µM	65,76 ± 6,78*
CPA4F 125 µM	53,12 ± 2,99*	CPA4Et 125 µM	68,69 ± 5,34*
CPA4F 250 µM	45,68 ± 2,24*	CPA4Et 250 µM	61,59 ± 5,25*
CPA4NO₂		CPADMA	
Controle (CT)	100,0 ± 4,65	Controle (CT)	100,0 ± 2,75
Veículo (V)	94,69 ± 3,81	Veículo (V)	94,69 ± 3,81
CPA4NO ₂ 15,62 µM	86,52 ± 7,62	CPADMA 15,62 µM	93,89 ± 6,66
CPA4NO ₂ 31,25 µM	87,50 ± 5,42	CPADMA 31,25 µM	87,20 ± 5,02
CPA4NO ₂ 62,50 µM	79,44 ± 6,74	CPADMA 62,50 µM	69,03 ± 6,66*
CPA4NO ₂ 125 µM	81,72 ± 6,42	CPADMA 125 µM	65,52 ± 7,78*
CPA4NO ₂ 250 µM	72,68 ± 6,53*	CPADMA 250 µM	54,74 ± 6,20*

Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. Como veículo (V), foi utilizado DMSO (concentração final de 0,5%). *p<0,05 vs. grupo controle (CT).

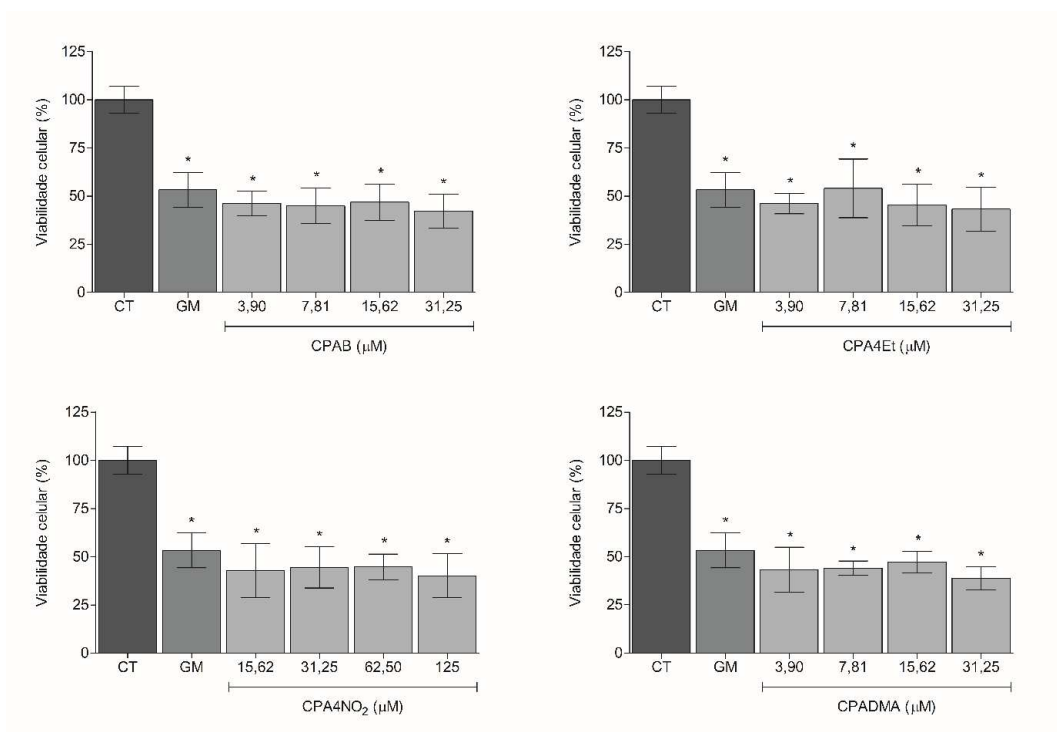
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Avaliação do efeito das *p*-aminofenilchalconas sobre a citotoxicidade em células renais induzida por Gentamicina

No estudo de pré e pós-tratamento das células HK-2 com as chalconas após lesão renal, o tratamento com Gentamicina na concentração de 5,28 mM reduziu a viabilidade celular para aproximadamente 50%, tanto no grupo tratado previamente com as chalconas, quanto no grupo tratado posteriormente ($53,26 \pm 3,00$ e $57,11 \pm 0,68\%$, respectivamente).

Como demonstrado nas Figuras 19 e 20 e na Tabela 4, o pré-tratamento com as chalconas não foi capaz de prevenir o efeito citotóxico da Gentamicina em nenhuma das concentrações testadas. Já no pós-tratamento, embora este efeito não tenha sido revertido, foi observado aumento significativo da viabilidade celular no grupos tratados com CPA4NO₂, nas menores concentrações (15,62 e 31,25 μ M), e com CPADMA, na concentração de 7,81 μ M.

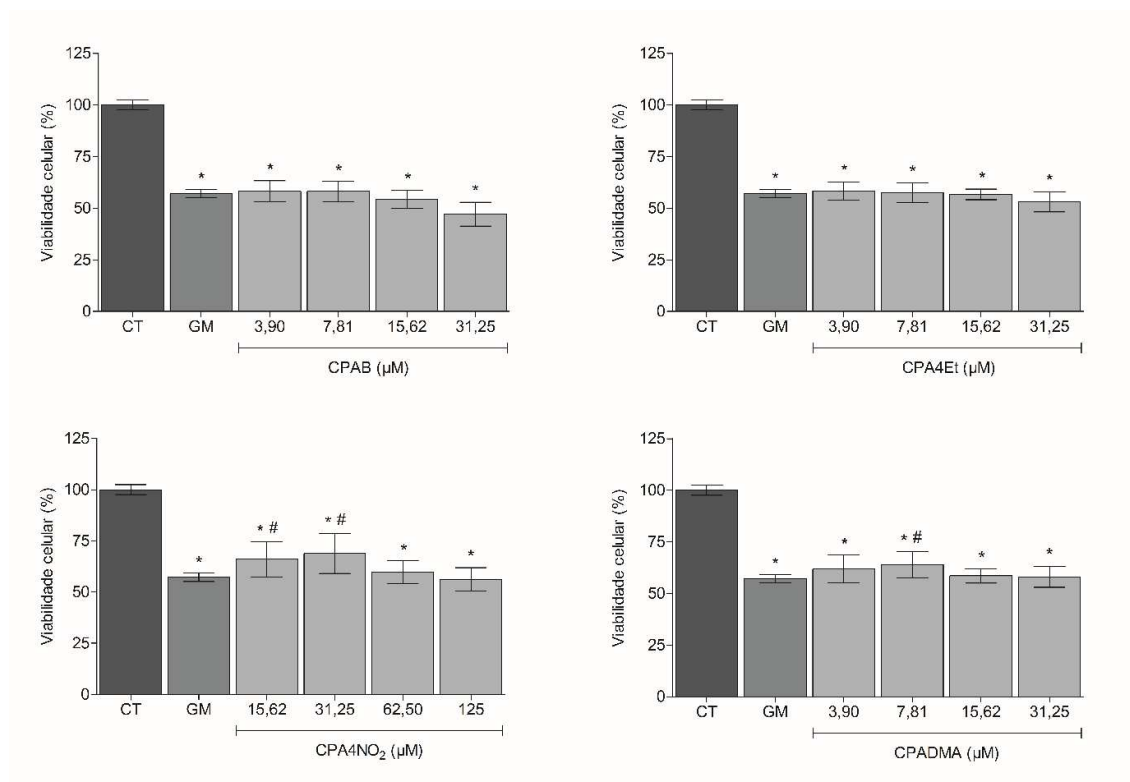
Figura 19 – Efeito do pré-tratamento com *p*-aminofenilchalconas na lesão de células HK-2 induzida por Gentamicina verificado pelo método de redução do MTT.



Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT); # $p < 0,05$ vs. grupo tratado com Gentamicina (GM), 5,28 mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 – Efeito do pós-tratamento com *p*-aminofenilchalconas na lesão de células HK-2 induzida por Gentamicina verificado pelo método de redução do MTT.



Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT); # $p < 0,05$ vs. grupo tratado com Gentamicina (GM) 5,28 mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesses grupos, a viabilidade celular teve um aumento de, aproximadamente, 6 a 11%, de modo que CPA4NO₂ demonstrou maior efeito protetor em ambas as concentrações destacadas. Frente aos resultados obtidos, somente o protocolo de pós-tratamento com as chalconas CPA4NO₂, nas concentrações de 31,25 e 15,62 μM, e CPADMA, na concentração de 7,81 μM, foi empregado durante os ensaios subsequentes.

Tabela 4 – Percentual de viabilidade de células HK-2 submetidas a citotoxicidade induzida por Gentamicina e pré/pós-tratadas com *p*-aminofenilchalconas verificado pelo método de redução do MTT.

Viabilidade celular (%)		
	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Controle (CT)	100,00 ± 0,81	100,00 ± 2,35
GM 5,28 mM	57,11 ± 0,68*	53,26 ± 3,00*
CPAB 3,90 µM	58,18 ± 1,70*	46,16 ± 2,10*
CPAB 7,81 µM	58,13 ± 1,63*	44,92 ± 3,09*
CPAB 15,62 µM	54,32 ± 1,47*	46,78 ± 3,11*
CPAB 31,25 µM	47,17 ± 1,92*	42,25 ± 2,95*
CPA4Et 3,90 µM	58,41 ± 1,44*	46,11 ± 1,78*
CPA4Et 7,81 µM	57,48 ± 1,59*	54,02 ± 5,06*
CPA4Et 15,62 µM	56,74 ± 0,85*	45,30 ± 3,59*
CPA4Et 31,25 µM	53,11 ± 1,62*	43,16 ± 3,80*
CPA4NO ₂ 15,62 µM	65,95 ± 2,85*	42,70 ± 4,69*#
CPA4NO ₂ 31,25 µM	68,82 ± 3,24*	44,50 ± 3,57*#
CPA4NO ₂ 62,50 µM	59,70 ± 1,82*	44,75 ± 2,23*
CPA4NO ₂ 125 µM	56,20 ± 1,90*	40,16 ± 3,81*
CPADMA 3,90 µM	61,93 ± 2,21*	43,25 ± 4,14*
CPADMA 7,81 µM	63,91 ± 2,16*	44,10 ± 1,31*#
CPADMA 15,62 µM	58,53 ± 1,17*	47,26 ± 1,88*
CPADMA 31,25 µM	58,04 ± 1,68*	38,86 ± 2,14*

Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. *p<0,05 vs. grupo controle (CT); #p<0,05 vs. grupo tratado com Gentamicina (GM) 5,28 mM.

Fonte: Elaborado pelo autor.

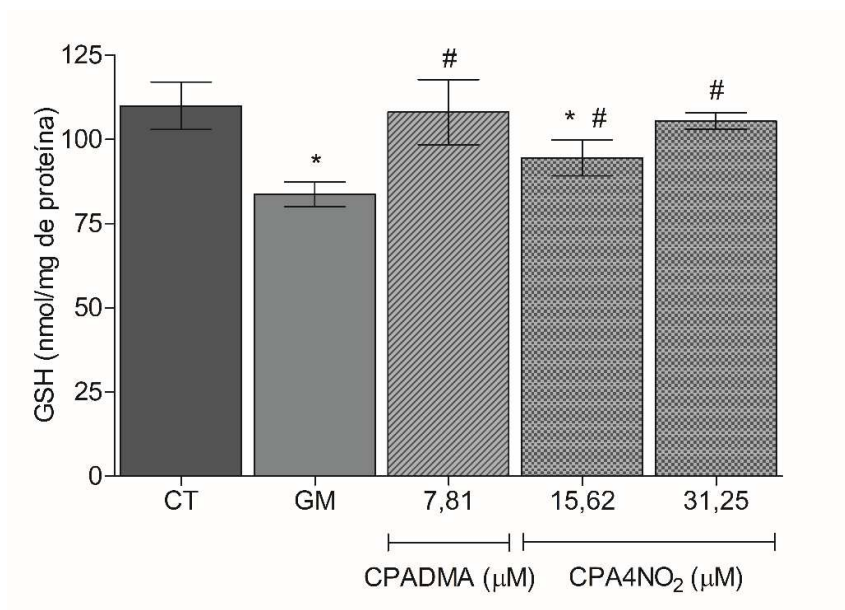
5.4 Determinação dos níveis de GSH e do acúmulo de superóxido

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e o acúmulo de ânions superóxido (O₂⁻), normalizados pela quantidade de proteína em cada um dos grupos tratados, foram verificados a fim de se avaliar a presença de ERO e o balanço redox das células HK-2. No grupo GM foi

observado uma redução significativa nos níveis de GSH (Figura 21), de aproximadamente 24%, e a elevação da quantidade de superóxido (Figura 22), de aproximadamente 26%, em relação ao grupo controle.

Adicionalmente, o pós-tratamento com CPA4NO₂ foi capaz de aumentar os níveis de GSH e de diminuir o acúmulo de O₂⁻ significativamente, indicando indiretamente um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD). Ademais, na concentração de 31,25 μM os níveis de GSH foram revertidos de volta aos valores do grupo controle, bem como a quantidade de superóxido. Já a CPADMA, na concentração de 7,81 μM, também foi capaz de reestabelecer apenas parcialmente os níveis de GSH e de aumentar a atividade da SOD, mantendo diferença significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com Gentamicina, conforme Tabela 5.

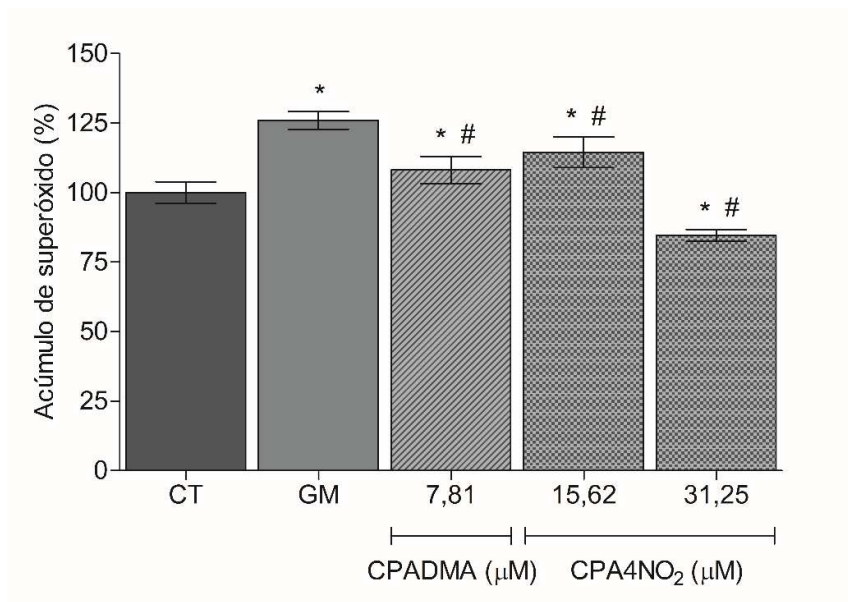
Figura 21 – Avaliação do estresse oxidativo por meio da medida dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em células HK-2.



Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. *p<0,05 vs. grupo controle (CT); #p<0,05 vs. grupo tratado com Gentamicina (GM) 5,28 mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 – Avaliação do estresse oxidativo por meio da determinação do acúmulo de ânions superóxido (O_2^-) em células renais HK-2.



Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT); # $p < 0,05$ vs. grupo tratado com Gentamicina (GM) 5,28 mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e do acúmulo de ânions superóxido (O_2^-) em células renais HK-2.

	GSH (nmol/mg)	Superóxido (%)
Controle (CT)	110,00 ± 2,89	100,00 ± 1,61
GM 5,28 mM	83,75 ± 1,49*	126,00 ± 1,30*
CPADMA 7,81 μM	108,10 ± 3,95	108,1 ± 1,98*#
CPA4NO ₂ 15,62 μM	94,48 ± 2,17*#	114,5 ± 2,26*#
CPA4NO ₂ 31,25 μM	105,50 ± 1,01	84,61 ± 0,89*#

Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT); # $p < 0,05$ vs. grupo tratado com Gentamicina (GM) 5,28 mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

ALRA induzida por fármacos é uma desordem multifatorial de grande preocupação principalmente no âmbito hospitalar, onde pode evoluir para insuficiência renal crônica – elevando o número de pacientes que necessitam de procedimentos de hemodiálise e/ou de transplante renal –, e até mesmo levar ao óbito (LIANGOS *et al.*, 2007; PERAZZELA, 2018; WU; HUANG, 2018). Apesar disso, não existe uma terapia específica e totalmente eficaz para essa condição, com procedimentos limitados a interrupção do uso do agente nefrotóxico e hidratação do paciente (PERAZZELA; ROSNER, 2022). Em relação aos aminoglicosídeos, sua citotoxicidade advém de sua afinidade pelos fosfolípidios de membrana, de modo que quanto mais catiônica for a molécula, tal como a Gentamicina, maiores os danos causados (SALES; FORESTO, 2020; SHARMA *et al.*, 2022).

O presente estudo buscou mimetizar *in vitro* o efeito nefrotóxico induzido por fármacos utilizando as células renais HK-2, e avaliou, pela primeira vez, o efeito de seis *p*-aminofenilchalconas semissintéticas na proteção e/ou recuperação das células após o dano causado pela Gentamicina. Essas moléculas foram sintetizadas e caracterizadas previamente, e os estudos de atividade biológica foram realizados a fim de verificar suas capacidades antioxidantes em células sob estresse oxidativo ocasionado por uma elevada concentração de Gentamicina.

Diante dos resultados do ensaio de redução do MTT para avaliação da toxicidade das *p*-aminofenilchalconas em células HK-2, observou-se que o grupo amino (-NH₂) ligado ao anel A na posição *para* promoveu a citotoxicidade apenas nas maiores concentrações (62,5-250 μM). Todas as chalconas em estudo demonstraram ser tóxicas para as células renais na concentração de 250 μM.

De acordo com a literatura, a presença de um grupo ativador como -NH₂ no anel A induz o aumento da eletropositividade do C-β, tornando-o um centro mais eletrofílico e reativo às cargas negativas de proteínas de células neoplásicas (IRFAN *et al.*, 2020; SULPIZIO *et al.*, 2016). Outros estudos mostraram que as *p*-aminofenilchalconas apresentaram maior atividade citotóxica em relação às aminochalconas *orto* e *meta* substituídas, mas que a inserção de um grupo desativador como o nitro (-NO₂) em C-4 reduziu esse efeito (KOZŁOWSKA *et al.*, 2019).

Todavia, para efeito de comparação, as modificações no sistema α, β-insaturado com o alongamento da cadeia carbônica central da CPAC, bem como a inserção de um átomo de flúor ligado à posição C-4 da CPA4F resultaram em uma drástica redução da viabilidade celular, de modo que todas as concentrações testadas de ambas as moléculas foram tóxicas para

as células HK-2.

Por outro lado, a presença do grupo $-NO_2$ ligado ao anel B foi capaz de diminuir parcialmente a citotoxicidade da *p*-aminofenilchalcona em até duas concentrações superiores (62,5 e 125 μM), conforme observado anteriormente por KOZŁOWSKA e colaboradores (2019). Isso indica que este grupo, de alguma maneira, torna a toxicidade da molécula mais seletiva às células neoplásicas em relação às saudáveis (IRFAN *et al.*, 2020).

Apesar de não ter sido encontrada relação entre o maior número de insaturações na cadeia central das chalconas e o aumento do efeito citotóxico, diversos estudos já demonstraram que grupos eletronegativos ligados ao anel B das chalconas tendem a elevar a atividade biológica e promover melhor viabilidade celular a essas moléculas: MAGALHÃES *et al.* (2022) descreveram que a inserção do átomo de cloro ao anel B resultou em reduzida citotoxicidade nas linhagens estudadas. ISAAC e colaboradores (2012), LAHSASNI; AL KORBI; ALJABER (2014) e PRASAD; RANI; RAO (2013) também demonstraram relação da atividade antioxidante das chalconas com o átomo de bromo.

Esses átomos (cloro, bromo e iodo) possuem tamanho superior ao do átomo de carbono e, conseqüentemente, os orbitais com pares de elétrons não-ligantes não são bem emparelhados com os orbitais dos carbonos aromáticos. A partir desses achados, é possível inferir que a presença de grupos desativadores ou retiradores de elétrons na posição *para* do anel B tende a aumentar a atividade biológica das chalconas. Em relação aos halogênios, o átomo de flúor destaca-se como exceção, visto que seu tamanho reduzido e elevada eletronegatividade pode interferir na ressonância eletrônica da molécula, tornando-a mais citotóxica.

Após o tratamento com a Gentamicina, foi observada significativa redução da viabilidade celular. A Gentamicina demonstrou ser tóxica para as células HK-2 em concentrações iguais ou superiores a 2 mM, sendo a $IC_{50} = 5,28$ mM ou aproximadamente 2,50 mg \cdot mL⁻¹. Estes resultados são condizentes com a literatura, visto que, por se tratar de um fármaco clinicamente em uso, é necessário submeter as células a altas concentrações para que seja observado efeito citotóxico (HAYWARD *et al.*, 2018; LOPEZ-NOVOA *et al.*, 2011).

Células tratadas previamente com as *p*-aminofenilchalconas e então submetidas ao tratamento com a Gentamicina não apresentaram melhoria significativa em relação à viabilidade celular. Em contrapartida, o pós-tratamento com CPA4NO₂ e CPADMA foi capaz de elevar o número de células viáveis, indicando que ambas as substâncias, apesar de não prevenirem, exercem algum efeito protetor sobre essa linhagem celular contra a lesão induzida pelo fármaco.

ROCHA e colaboradores (2018) descreveram a capacidade regulatória dessas chalconas sobre o processo inflamatório com efeito anti-hipersensitivo no controle da dor. BANDEIRA e colaboradores (2020) também demonstrou a atividade antifúngica dos derivados da *p*-aminocetofenona, destacando que a presença do grupo -NO₂ ligado ao anel B em C-4 aparentemente era responsável por potencializar a atividade biológica. Outras aminochalconas com estruturas similares também apresentaram efeitos protetores em modelos *in vitro* da doença de Alzheimer, e antiparasitário contra protozoários e platelmintos, com atividade quelante e antioxidante (BEZERRA *et al.*, 2022; DÍAZ-CARRILLO *et al.*, 2018; SAKATA *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2017).

Para avaliação do balanço redox das células tratadas e determinação do componente oxidativo na injúria causada pela Gentamicina, foram quantificados os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e o acúmulo de ânion superóxido (O₂⁻), importantes mecanismos celulares antioxidantes. A redução significativa dos níveis de GSH e a grande quantidade de O₂⁻ verificado nas células HK-2 após tratamento com Gentamicina indicam condições de estresse oxidativo promovidas pelo fármaco e o caráter antioxidante das *p*-aminofenilchalconas, frente aos resultados com o pós-tratamento.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas constantemente a partir do metabolismo celular, como resultado da cadeia respiratória no interior das mitocôndrias, por exemplo. Em condições não patológicas, vias antioxidantes endógenas enzimáticas e não enzimáticas como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona mantêm o equilíbrio redox da célula, neutralizando as ERO (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Todavia, sob a ação de algum agente externo, como exposição a agente físicos ou químicos, ou mesmo em caso de doenças, pode haver produção excessiva de ERO, situação na qual as defesas antioxidantes da célula são insuficientes e o acúmulo de compostos altamente reativos induzem a uma condição de estresse oxidativo, resultando na morte tecidual e apoptose (ALKADI *et al.*, 2020; SACK *et al.*, 2017).

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira e uma das mais importantes linhas de defesa celular contra o estresse oxidativo. É uma metaloenzima que utiliza íons metálicos (ferro, zinco, cobre ou manganês) como cofatores para catalisar a conversão de moléculas de ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que posteriormente é reduzido à água pela enzima catalase ou pela glutathiona peroxidase (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; ROSA *et al.*, 2021).

Acredita-se que a formação do radical superóxido desempenha papel central no estresse oxidativo induzido pela Gentamicina, destacando-se dentre as demais ERO

(CUZZOCREA *et al.*, 2002). Outros autores já demonstraram que esse aminoglicosídeo é capaz de inibir a atividade da SOD (BUSTOS *et al.*, 2016; CHASHMI; EMADI; KHASTAR, 2017; KANG *et al.*, 2022), levando ao acúmulo de superóxido no interior da célula e consequentemente à morte celular, corroborando com o observado no presente estudo.

Já a glutatona é o principal substrato endógeno antioxidante do organismo. Sob condições oxidantes, moléculas de GSH (glutaciona reduzida) doam um elétron para converter peróxidos orgânicos oriundos da transformação de demais ERO em água, formando GSSG (glutaciona oxidada), em uma reação catalisada pela enzima glutaciona peroxidase (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; ROSA *et al.*, 2021).

Essa molécula então pode ser reduzida de volta para GSH pela ação da enzima glutaciona redutase, utilizando NADPH como cofator (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Em células sob estresse oxidativo, os estoques de GSH tendem a ser consumidos e a relação GSSG/GSH se eleva. Agentes antioxidantes possuem a capacidade de reestabelecer os níveis de GSH, revertendo os danos causados à célula (WU *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2015), o que também foi verificado no tratamento com as *p*-aminofenilchalconas.

Todavia, este efeito observado não apresentou uma relação concentração-dependente. As concentrações mais elevadas podem não ter tido efeito protetor por serem muito próximas das concentrações tóxicas, verificadas pelo ensaio de redução do MTT. Células tratadas, uma vez submetidas à lesão induzida pela Gentamicina, tornam-se mais sensíveis a efeitos indiretos de outras substâncias tóxicas (SALES; FORESTO, 2020), como as próprias chalconas estudadas, de modo que seu potencial terapêutico possa ser sobreposto

O efeito antioxidante das chalconas costuma ser atribuído ao sistema α , β -insaturado conjugado à carbonila. As aminochalconas estudadas também compartilham aspectos eletrônicos e estéricos comuns à maioria dos antioxidantes: estrutura química planar, frações aromáticas e capacidade doadora de prótons (SULPIZIO *et al.*, 2016). Ademais, essa característica estrutural das chalconas confere a essas moléculas a capacidade de se comportarem como aceptores de Michael (OTERO *et al.*, 2014).

Aceptores de Michael são moléculas que contêm, em sua estrutura, um grupo carbonila alfa-beta insaturado, de modo que a dupla ligação confere um caráter eletrofílico ao C- β , com o potencial de capturar agentes nucleofílicos (OTERO *et al.*, 2014). Esse sistema seria o responsável pela reatividade intrínseca das chalconas frente a grupos eletronegativos, como aminas, tióis, cisteínas e radicais livres como os íons hidroxila e superóxido, através da formação de um carbocátion intermediário por meio da ressonância eletrônica (ADELUSI *et al.*, 2021; EGBUJOR *et al.*, 2021; MAYER; OFIAL, 2019; SANTOS; MOREIRA, 2007).

No presente estudo, as chalconas derivadas da *p*-aminocetofenona não apresentaram nenhum efeito inibitório ou preventivo às células renais contra a produção excessiva de ERO induzida pela Gentamicina. Entretanto, a recuperação da viabilidade celular quando os mesmos compostos foram empregados após a lesão sugere que essas moléculas possuam a capacidade de capturar as ERO e neutralizá-las, propriedade conhecida como *scavenging* (HAIDER *et al.*, 2020).

Scavengers, também conhecidos como antioxidantes primários, são compostos capazes de reagir diretamente com radicais livres, transformando-os em espécies menos reativas (GALANO; RAÚL ALVAREZ-IDABOY, 2019). Moléculas com potencial scavenger incluem melatonina, ácido úrico, tióis, algumas vitaminas, carotenoides e flavonoides (HAIDER *et al.*, 2020; NIMSE; PAL, 2015). Compostos aromáticos de maneira geral costumam apresentar alguma atividade antioxidante, o que se considera ser decorrente da capacidade scavenger dos anéis benzênicos substituídos (MAZZONE *et al.*, 2016).

Dentre os mecanismos propostos para a atividade scavenger desses antioxidantes, tem-se a formação de adutos radicalares, a transferência de elétron, a transferência um átomo de hidrogênio, e a perda de próton seguida da transferência de elétron, sendo este último considerado o mais recorrente entre os flavonoides, chalconas e curcuminoides (GALANO; RAÚL ALVAREZ-IDABOY, 2019; MAZZONE *et al.*, 2016). Aparentemente, o caráter eletrofílico de C- β regulado pela presença de grupos doadores ou retiradores de elétron ligados ao anel B tem influência sobre o efeito scavenger antioxidante das chalconas.

A presença de fortes grupos retiradores de elétrons, como o grupo -NO₂, ligados ao anel B, podem aumentar o caráter eletrofílico de C- β , tornando-o mais reativo e, conseqüentemente, potencializando sua atividade antioxidante em relação às chalconas não substituídas. A maior capacidade de capturar radicais livres justificaria o melhor desempenho da CPA4NO₂ na recuperação da viabilidade celular em relação à CPADMA, visto que esta última contém um grupo doador de elétrons em C-4.

O desempenho das *p*-aminofenilchalconas destacadas na recuperação parcial da viabilidade celular, em concentrações reduzidas, é um achado promissor para uma possível aplicação futura dessa classe farmacológica na rotina clínica como alternativa terapêutica capaz de reverter os efeitos adversos, ou de, no mínimo, limitar os danos causados, de fármacos nefrotóxicos, até mesmo em casos de emergência.

Esses resultados contribuem para o conhecimento da LRA induzida por fármacos, em especial por aminoglicosídeos, associando a injúria tubular renal ao estresse oxidativo e à formação de ERO, dentre as quais radicais livres como o ânion superóxido. Os achados sobre

o potencial citoprotetor das *p*-aminofenilchalconas avaliadas também constituem importante arcabouço teórico para otimização da modelagem de potenciais novos fármacos com atividade antioxidante.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que o pós-tratamento com chalconas derivadas da 4'-aminocetofenona *para*-substituídas com grupos nitro (-NO₂) e dimetilamino (-N(CH₃)₂) é capaz de recuperar parcialmente a viabilidade de células renais submetidas a lesão induzida por Gentamicina, dado seu potencial antioxidante. A presença do grupo -NO₂ ligado ao C-4 no anel B aumentou consideravelmente a viabilidade celular da *p*-aminofenilchalcona com a linhagem HK-2. Grupos retiradores de elétrons ligados ao anel B nesta posição tendem a potencializar a atividade antioxidante das chalconas por aumentar o caráter eletrofílico do C-β, tornando as moléculas mais reativas. Logo, destaca-se o potencial das chalconas como possíveis ferramentas farmacológicas na terapia da lesão renal aguda induzida por fármacos devido à possibilidade de modificações estruturais que reduzam a toxicidade dessas moléculas e melhorem suas atividades biológicas, sobretudo o efeito *scavenging* sobre radicais livres, como observado, principalmente, com o radical -NO₂.

REFÊNCIAS

- ADELUSI, T. I., DU, L.; CHOWDHURY, A.; XIAOKE, G.; LU, Q.; YIN, X. Signaling pathways and proteins targeted by antidiabetic chalcones. **Life Sciences**, v. 284, p. 118982, nov. 2021.
- ADELUSI, T. I.; GBEMISOLA, R. G.; YIN, X.; AYINDE, S. K.; OLAOBA, T. O. Neurotrophic, anti-neuroinflammatory, and redox balance mechanisms of chalcones. **European Journal of Pharmacology**, v. 891, n. October 2020, p. 173695, 2021.
- ALKADI, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. **Infect Disord Drug Targets**, v. 20, n. 1, p. 16–26, 2020.
- AWDISHU, L.; MEHTA, R. L. The 6R's of drug induced nephrotoxicity. **BMC Nephrology**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BALLATORI, N. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.**, v. 390, p. 191–214, 2009.
- BANDEIRA, P. N.; FONTENELE, R. O. D. S.; COSTA, P. S.; DOS SANTOS, H. S.; DE LEMOS, T. L. G. In vitro antifungal activity against trichophyton rubrum of P-Aminochalcones and 3'-methoxy-4'-hydroxy chalcone. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 3, p. 703–711, 2020.
- BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; SANTOS, H. S.; CARVALHO, M. C. S.; PINHEIRO, D. P.; MORAES FILHO, M. O.; PESSOA, C.; BARROS-NEPOMUCENO, F. W. A.; RODRIGUES, T. H. S.; RIBEIRO, P. R. V.; MAGALHÃES, H. S.; TEIXEIRA, A. M. R. Synthesis, structural characterization, and cytotoxic evaluation of chalcone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 11, p. 2037–2049, nov. 2019.
- BEZERRA, L. L.; ALMEIDA-NETO, F. W. Q.; MARINHO, M. M.; SANTOS OLIVEIRA, L.; TEIXEIRA, A. M. R.; BANDEIRA, P. N.; DOS SANTOS, H. S.; LIMA-NETO, P. de; MARINHO, E. S. Synthesis of aminochalcones and *in silico* evaluation of their antiparasitic potential against Leishmania. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–8, jul. 2022.
- 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.
- BUSTOS, P. S.; DEZA-PONZIO, R.; PÁEZ, P. L.; ALBESA, I.; CABRERA, J. L.; VIRGOLINI, M. B.; ORTEGA, M. G. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress *in vitro* and *in vivo* in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 253–264, dez. 2016.
- CASANOVA, A. G.; VICENTE-VICENTE, L.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. T. Key role of oxidative stress in animal models of aminoglycoside nephrotoxicity revealed by a systematic analysis of the antioxidant-to-nephroprotective correlation. **Toxicology**, v. 385, n. May, p. 10–17, 2017.

- CHASHMI, N. A.; EMADI, S.; KHASTAR, H. Protective effects of hydroxytyrosol on gentamicin induced nephrotoxicity in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 4, p. 1427–1429, jan. 2017.
- COSTA, M. F. B. da; BRAGA, A.; TELES, F.; MARTINS, S.; MARCOS, P.; SOARES, G.; MENESES, G. C.; ADELVANE, F.; RODRIGUES, D. P.; KALYNE, L.; MOREIRA, A.; MIRON, D.; HOLANDA, A.; MARIA, A.; MARTINS, C. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 22, p. 787–795, 2015.
- CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DUGO, L.; SERRAINO, I.; DI PAOLA, R.; BRITTI, D.; DE SARRO, A.; PIERPAOLI, S.; CAPUTI, A. P.; MASINI, E.; SALVEMINI, D. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 450, n. 1, p. 67–76, ago. 2002.
- DÍAZ-CARRILLO, J. T.; DÍAZ-CAMACHO, S. P.; DELGADO-VARGAS, F.; RIVERO, I. A.; LÓPEZ-ANGULO, G.; SARMIENTO-SÁNCHEZ, J. I.; MONTES-AVILA, J. Synthesis of leading chalcones with high antiparasitic, against *Hymenolepis nana*, and antioxidant activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 3, 2018.
- DIMMOCK, J. R.; JHA, A.; ZELLO, G. A.; ALLEN, T. M.; SANTOS, C. L.; BALZARINI, J.; DE CLERCQ, E.; MANAVATHU, E. K.; STABLES, J. P. Cytotoxic 4'-aminochalcones and related compounds. **Pharmazie** v. 58, p. 227–232, 2003.
- DOWNES, K. J.; HAYES, M.; FITZGERALD, J. C.; PAIS, G. M.; LIU, J.; ZANE, N. R.; GOLDSTEIN, S. L.; SCHEETZ, M. H.; ZUPPA, A. F. Mechanisms of antimicrobial-induced nephrotoxicity in children. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 1, p. 1–13, jan. 2020.
- DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; MCGOWN, A. T.; RENNISON, D. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 9, p. 1051–1056, 1998.
- EGBUJOR, M. C.; SAHA, S.; BUTTARI, B.; PROFUMO, E.; SASO, L. Activation of Nrf2 signaling pathway by natural and synthetic chalcones: a therapeutic road map for oxidative stress. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 465–480, abr. 2021.
- FREEMAN, C. D.; NICOLAU, D. P.; BELLIVEAU, P. P.; NIGHTINGALE, C. H. Once-daily dosing of aminoglycosides: review and recommendations for clinical practice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 677–686, 1997.
- GALANO, A.; RAÚL ALVAREZ-IDABOY, J. Computational strategies for predicting free radical scavengers' protection against oxidative stress: Where are we and what might follow? **International Journal of Quantum Chemistry**. v. 119, n. 2, jan. 2019.
- GEORGE, G.; KOYIPARAMBATH, V. P.; SUKUMARAN, S.; NAIR, A. S.; PAPPACHAN, L. K.; AL-SEHEMI, A. G.; KIM, H.; MATHEW, B. Structural Modifications on Chalcone Framework for Developing New Class of Cholinesterase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, 2022.

GIUSTARINI, D.; DALLE-DONNE, I.; MILZANI, A.; ROSSI, R. Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: Influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 4, p. 141–148, 2011.

HAIDER, K.; HAIDER, M. R.; NEHA, K.; YAR, M. S. Free radical scavengers: An overview on heterocyclic advances and medicinal prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 204, out. 2020.

HARRIS, D. G.; MCCRONE, M. P.; KOO, G.; WELTZ, A. S.; CHIU, W. C.; SCALEA, T. M.; DIAZ, J. J.; LISSAUER, M. E. Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 1, p. 102–106, 2015.

HAYWARD, C. R. S.; CLINIC, W. S.; NHS, B.; UK, B.; HAYWARD, R. S.; HARDING, J.; MOLLOY, R.; LAND, L.; LONGCROFT-NEAL, K.; MOORE, D.; ROSS, J. D. C. Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 223–238, fev. 2018.

HOSOHATA, K. Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 18–26, nov. 2016.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287 – 293, dez. 2018.

IRFAN, R.; MOUSAVI, S.; ALAZMI, M.; SALEEM, R. S. Z. A comprehensive review of aminochalcones. **Molecules**, v. 25, n. 22, nov. 2020.

ISAAC, R.; SRIBINDU, M. C.; REDDY, P. S.; JOLY, V. L. J.; WU, R. J.; MURTHY, Ch. S. S. Halogen Substituted Chalcone as Potential Antioxidants: An *in vitro* Study. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 4, n. 6, p. 499–505, set. 2012.

JACKSON, J.; CHEN, C.; BUISING, K. Aminoglycosides: How should we use them in the 21st century? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 516–525, dez. 2013.

KANG, S.; CHEN, T.; HAO, Z.; YANG, X.; WANG, M.; ZHANG, Z.; HAO, S.; LANG, F.; HAO, H. Oxymatrine Alleviates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6209, set. 2022.

KHAJAVI RAD, A.; MOHEBBATI, R.; HOSSEINIAN, S. Drug-induced nephrotoxicity and medicinal plants. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 11, n. 3, p. 169–179, 2017.

KOZŁOWSKA, J.; POTANIEC, B.; BACZYŃSKA, D.; ZAROWSKA, B.; ANIOŁ, M. Synthesis and biological evaluation of novel aminochalcones as potential anticancer and antimicrobial agents. **Molecules**, v. 24, n. 22, 2019.

LAHSASNI, S. A.; AL KORBI, F. H.; ALJABER, N. A. A. Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant activities of some novel chalcones analogues. **Chemistry Central**

Journal, v. 8, n. 1, mai. 2014.

LIABEU, C. S.; DIVISION, C. P.; RENÉ, A.; AMIENS, L.; PICARD, S.; CHOUKROUN, G.; MASMOUDI, K.; LIABEU, S.; NETWORK, N. The drugs that mostly frequently induce acute kidney injury: a case – noncase study of a pharmacovigilance database. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, n. 6, p. 1341–1349, jun. 2017.

LIANGOS, O.; PERIANAYAGAM, M.C.; VAIDYA, V.S.; HAN, W.K.; WALD, R.; TIGHIOUART, H.; MACKINNON, R.W.; LI, L.; BALAKRISHNAN, V.S.; PEREIRA, B.J.; BONVENTRE, J.V.; JABER, B.L. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, p. 904-912, 2007.

LOPEZ-NOVOA, J. M.; QUIROS, Y.; VICENTE, L.; MORALES, A. I.; LOPEZ-HERNANDEZ, F. J. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. **Kidney International**, v. 79, n. 1, p. 33–45, 2011.

MAGALHÃES, E. P. **Efeito protetor do (-)-alfa bisabolol em modelo *in vitro* de citotoxicidade renal induzida por Anfotericina B**. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MAGALHÃES, E. P.; GOMES, N. D. B.; FREITAS, T. A. de; SILVA, B. P.; RIBEIRO, L. R.; AMEIDA-NETO, F. W. Q.; MARINHO, M. M.; LIMA-NETO, P. de; MARINHO, E. S.; SANTOS, H. S. dos; TEIXEIRA, A. M. R.; SAMPAIO, T. L.; MENEZES, R. R. P. P. B. de; MARTINS, A. M. C. Chloride substitution on 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenylchalcones improves *in vitro* selectivity on *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Chemico-Biological Interactions**, v. 361, jul. 2022.

MAGALHÃES, E. P.; SILVA, B. P.; AIRES, N. L.; RIBEIRO, L. R.; ALI, A.; CAVALCANTI, M. M.; NUNES, J. V. S.; SAMPAIO, T. L.; DE MENEZES, R. R. P. P. B.; MARTINS, A. M. C. (-)- α -Bisabolol as a protective agent against epithelial renal cytotoxicity induced by amphotericin B. **Life Sciences**, v. 291, n. December 2021, p. 120271, 2021.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MAYER, R. J.; OFIAL, A. R. Nucleophilicity of Glutathione: A Link to Michael Acceptor Reactivities. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 49, p. 17704–17708, dez. 2019.

MAZZONE, G.; GALANO, A.; ALVAREZ-IDABOY, J. R.; RUSSO, N. Coumarin-Chalcone Hybrids as Peroxyl Radical Scavengers: Kinetics and Mechanisms. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 4, p. 662–670, 25 abr. 2016.

MENEZES, J. C. J. M. D. S.; DIEDERICH, M. F. Natural dimers of coumarin, chalcones, and resveratrol and the link between structure and pharmacology. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 2019.

MENEZES, R.R.P.P.B. **Efeito tripanocida do (-)-alfa bisabolol sobre cepa Y de**

Trypanosoma cruzi. 2017. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

MENKE, J.; SOLLINGER, D.; SCHAMBERGER, B.; HEEMANN, U.; LUTZ, J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 19, n. 4, p. 395–400, 2014.

MORALES-ALVAREZ, M. C. Nephrotoxicity of Antimicrobials and Antibiotics. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 27, n. 1, p. 31–37, 2019.

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, dez. 1983.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

OTERO, E.; VERGARA, S.; ROBLEDO, S.; CARDONA, W.; CARDA, M.; VÉLEZ, I.; ROJAS, C.; OTÁLVARO, F. Synthesis, Leishmanicidal and Cytotoxic Activity of Triclosan-Chalcone, Triclosan-Chromone and Triclosan-Coumarin Hybrids. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13251–13266, ago. 2014.

PERAZELLA, M. A. Pharmacology behind common drug nephrotoxicities. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 1897–1908, dez. 2018.

PERAZELLA, M. A.; ROSNER, M. H. Drug-Induced Acute Kidney Injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 8, p. 1220–1233, ago. 2022.

PRASAD, Y. R.; RANI, V. J.; RAO, A. S. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of some synthesized 4-Aminochalcones. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 52–58, 2013.

QU, Y.; AN, F.; LUO, Y.; LU, Y.; LIU, T.; ZHAO, W.; LIN, B. Biomaterials A nephron model for study of drug-induced acute kidney injury and assessment of drug-induced nephrotoxicity. **Biomaterials**, v. 155, p. 41–53, 2018.

RANI, A.; ANAND, A.; KUMAR, K.; KUMAR, V. Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 249–288, 2019.

ROCHA, L. W.; SONZA, D. R.; BROERING, M. F.; NUNES, R.; DE CAMPOS-BUZZI, F.; CORRÊA, R.; SILVA, R. L.; CUNHA, T. M.; SANTIN, J. R.; QUINTÃO, N. L. M. Synthetic chalcones as potential tool for acute- and chronic-pain control. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 104, p. 437–450, ago. 2018.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P. G.; CARRION, M. D.; CRUZ-LOPEZ, O.; CARA, C. L.; BALZARINI, J.; HAMEL, E.; CANELLA, A.; FABBRI, E.; GAMBARI, R.; BASSO, G.; VIOLA, G. Hybrid α -bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 7, p. 2022–2028, abr. 2009.

- ROSA, A.C.; CORSI, D.; CAVI, N.; BRUNI, N.; DOSIO, F. Superoxide Dismutase Administration: A review of proposed human uses. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 18–44, 2021.
- RYAN, M. J.; JOHNSON, G.; KIRK, J.; FUERSTENBERG, S. M.; ZAGER, R. A.; TOROK-STORB, B. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. **Kidney International**, v. 45, n. 1, p. 48–57, 1994.
- SACK, M.N.; FYHRQUIST, F.Y; SAIJONMAA, O.J.; FUSTER, V.; KOVACIC, J.C. Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-part series. **J. Amer Col. Of Cardio**, v. 70, n. 2, p. 196–211, 2017.
- SAKATA, R. P.; ANTONIOLLI, G.; LANCELLOTTI, M.; KAWANO, D. F.; GUIMARÃES BARBOSA, E.; ALMEIDA, W. P. Synthesis and biological evaluation of 2'-Aminochoalcone: A multi-target approach to find drug candidates to treat Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 103, out. 2020.
- SALES, G. T. M.; FORESTO, R. D. Drug-induced nephrotoxicity. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, p. 82–90, 2020.
- SANTOS, M.; MOREIRA, R. Michael Acceptors as Cysteine Protease Inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1040–1050, out. 2007.
- SHARMA, I.; LIAO, Y.; ZHENG, X.; KANWAR, Y. S. Modulation of gentamicin-induced acute kidney injury by myo-inositol oxygenase via the ROS/ALOX-12/12-HETE/GPR31 signaling pathway. **JCI Insight**, v. 7, n. 6, mar. 2022.
- SÖKMEN, M.; AKRAM KHAN, M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 81–86, jun. 2016.
- SULPIZIO, C.; ROLLER, A.; GIESTER, G.; ROMPEL, A. Synthesis, structure, and antioxidant activity of methoxy- and hydroxyl-substituted 2'-aminochalcones. **Monatshefte für Chemie**, v. 147, n. 10, p. 1747–1757, out. 2016.
- USTABAŞ, R.; SÜLEYMANOĞLU, N.; ÖZDEMİR, N.; KAHRIMAN, N.; BEKTAŞ, E.; ÜNVER, Y. New Chalcone Derivative: Synthesis, Characterization, Computational Studies and Antioxidant Activity. **Letters in Organic Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 46–53, dez. 2018.
- VICENTE-VICENTE, L.; CASANOVA, A. G.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. T.; PESCADOR, M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J.; MORALES, A. I. A systematic meta-analysis on the efficacy of pre-clinically tested nephroprotectants at preventing aminoglycoside nephrotoxicity. **Toxicology**, v. 377, p. 14–24, 2017.
- WARGO, K. A.; EDWARDS, J. D. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 27, n. 6, p. 573–577, 7 dez. 2014.
- WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **Environmental Health**, v. 134, n. December 2003, p. 489–492, 2004.

WU, H.; HUANG, J. Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathogenic Mechanisms, Biomarkers and Prevention Strategies. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 7, p. 559–567, abr. 2018.

XIAO, G.; LI, Y.; QIANG, X.; XU, R.; ZHENG, Y.; CAO, Z.; LUO, L.; YANG, X.; SANG, Z.; SU, F.; DENG, Y. Design, synthesis and biological evaluation of 4'-aminochalcone-rivastigmine hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, no 3, p. 1030–1041, 2017.

ZHANG, E.-H.; WANG, R.-F.; GUO, S.-Z.; LIU, B. An Update on Antitumor Activity of Naturally Occurring Chalcones. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–22, 2013.