



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TIAGO LIMA SAMPAIO

**EFEITO NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL NA LESÃO RENAL
AGUDA EM MODELOS DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

FORTALEZA

2016

TIAGO LIMA SAMPAIO

**EFEITO NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL NA LESÃO RENAL AGUDA
EM MODELOS DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S186e Sampaio, Tiago Lima.
Efeito nefroprotetor do (-)- α -Bisabolol na lesão renal aguda em modelos de isquemia-reperfusão / Tiago Lima Sampaio. – Fortaleza, 2016.
88 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
1. Lesão Renal Aguda. 2. Biomarcadores Farmacológicos. 3. Sesquiterpenos. I. Martins, Alice Maria Costa (Orient.). II. Título.

TIAGO LIMA SAMPAIO

**EFEITO NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL NA LESÃO RENAL
AGUDA EM MODELOS DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Junior

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

À minha mãe, Lêda, pelo amor e dedicação.

À Alicia, por me mostrar sempre como é bom ver o mundo pela
perspectiva de uma criança...

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda sabedoria, força e perseverança. Obrigado por me valer sempre quanto te recorro.

Aos meus familiares, de forma geral; pela torcida e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu pai, Francisco, por ter me ensinado que o trabalho edifica o homem.

Ao meu irmão, Matheus, por ser meu exemplo de paciência. Tenho muito orgulho de ver o homem no qual você se tornou.

À minha mãe, Lêda, minha rainha, minha amiga e companheira de todas as horas. Por abdicar da sua vida em favor da minha. Sua dedicação e seu amor me fazem sentir muito especial.

Ao Ramon, companheiro de trabalho e de vida. Pelo apoio moral e intelectual. Há muito de você nesse trabalho. Serei sempre grato.

À minha orientadora, Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, uma mãezona de nós todos. Pela paciência, pelos ensinamentos e por acreditar no meu potencial. Tenho muito orgulho de dizer que a melhor orientadora é a minha.

À Profa. Dra. Renata Sousa Alves, por ser meu socorro nos momentos de desespero na execução deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Cultivo Celular, agora chamado Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais. Cada um de vocês foi testemunha e companhia nessa jornada que não foi tão fácil.

Ao Jader e à Louise, em especial, por estarem comigo desde a graduação e por permitirem que durante o mestrado nossa amizade só tenha se fortificado.

À Mauren Villalta, Isabella Evelyn, Gdayllon, Marcus Felipe, Ramon e Gabriela que, em especial, doaram seu tempo e tornaram a execução dessa pesquisa possível.

Ao pessoal do Laboratório HISTOVESP - UECE, em especial à Profa. Dra. Janaína Serra Azul e à Nina, por me ajudarem prontamente na execução do trabalho e por abrirem as portas de uma maneira tão acolhedora.

Aos meus amigos, dos quais não vou citar nomes, agradeço por serem pra mim uma segunda família. Obrigado pelo orgulho que sentem de mim e por me impulsionarem e acreditarem sempre que sou capaz de atingir minhas metas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

A todos, de uma forma geral, que me apoiaram e torceram nessa jornada, meu muito obrigado!

“Os homens são anjos nascidos sem asas.
O que há de mais belo é nascer sem asas
e fazê-las crescer”

José Saramago

RESUMO

EFEITO NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL NA LESÃO RENAL AGUDA EM MODELOS DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A Isquemia/Reperfusão (I/R) é um fenômeno complexo, que contribui para a mortalidade e morbidade e é um fator predisponente para o estabelecimento da Lesão Renal Aguda (LRA). Várias estratégias e recursos são utilizados pelas células para prevenir ou diminuir a injúria celular causada pelo estresse oxidativo. Dessa forma, ressalta-se a importância do estudo utilizando substâncias como o (-)- α -Bisabolol, o qual apresenta um potencial antioxidante. Ademais, o estudo de ferramentas para diagnóstico precoce do desenvolvimento da lesão renal utilizando biomarcadores cada vez mais sensíveis e específicos, como ressaltado neste trabalho o KIM-1, pode auxiliar na detecção da injúria e acompanhamento da progressão do processo de melhora e cura. Logo, o presente trabalho tem como objetivo estudar os possíveis efeitos nefroprotetores do (-)- α -Bisabolol na Lesão Renal Aguda (LRA) em modelos de Isquemia/Reperfusão (I/R), bem como estudar o biomarcador KIM-1 como preditor precoce da injúria renal. Ratos Wistar machos foram submetidos ao procedimento cirúrgico de nefrectomia direita e clampeamento da artéria renal esquerda. Amostras de urina, sangue e tecido renal foram coletadas para avaliações adicionais. Um modelo *in vitro* de I/R foi realizado em cultura de linhagens de células tubulares renais LLC-MK2 para avaliar a viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT. Foram realizados os ensaios de respiração celular por citometria de fluxo: avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas pelo ensaio do DCFH-DA e a análise do potencial transmembrânico mitocondrial com o corante Rodamina 123. Dessa forma, O (-)- α -Bisabolol destaca-se como uma molécula com atividade promissora no contexto da dinâmica renal, principalmente por estar envolvida em mecanismos antioxidantes, os quais são essenciais na proteção contra o desenvolvimento da lesão. Ademais, por tratar-se de uma substância natural, ratifica-se a relevância de seu estudo e utilização. Além disso, a KIM-1 mostrou-se como um marcador bioquímico detectável em estados precoces da lesão aguda, fortalecendo o seu uso como critério auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento da progressão ou regressão da lesão tubular. Posteriormente, estes dados poderão servir de ferramenta na prática clínica.

PALAVRAS-CHAVE: Lesão Renal Aguda. Biomarcadores Farmacológicos. Sesquiterpenos.

ABSTRACT

NEPHROPROTECTING EFFECT OF (-)- α -BISABOLOL IN ACUTE KIDNEY INJURY IN ISCHEMIA-REPERFUSION MODELS

Ischemia / reperfusion (IR) is a complex phenomenon that contributes to mortality and morbidity and is a predisposing factor for the establishment of acute kidney injury (AKI). Various strategies and resources are used by cells to prevent or decrease the cellular injury caused by oxidative stress. Thus, it emphasizes the importance of studying using substances such as (-)- α -Bisabolol, which has an antioxidant potential. Furthermore, the study of strategies for early detection of developing kidney damage using increasingly sensitive and specific biomarkers, as pointed out in this paper the KIM-1, can aid in the detection of injury and follow the progression of improvement and healing process. Thus, this paper aims to study the possible nephroprotective effects of (-)- α -Bisabolol in Acute Kidney Injury (AKI) in models of ischemia/reperfusion (I/R), as well as study the KIM-1 biomarker as a predictor early renal injury. Male Wistar rats underwent surgical procedure right nephrectomy and clamping of the left renal artery. Samples of urine, blood and kidney tissue were collected for further evaluation. An in vitro model of I/R was performed in a culture of renal tubular cell lines, LLC-MK2 to assess cell viability by the MTT reduction assay. It was performed the cellular respiration tests by flow cytometry: evaluation of the production of cytoplasmic reactive oxygen species by DCFH-DA assay and mitochondrial transmembrane potential analysis with the dye Rhodamine 123. Thus, the (-)- α -Bisabolol stands out as a molecule with promising activity in the context of renal dynamic mainly be involved in mechanisms antioxidants, which are essential in the pathophysiological development of the lesion. Moreover, because it is a natural substance, it confirms the relevance of their study and use. In addition, the KIM-1 was shown as a biochemical marker detectable in early stages of acute injury, strengthening its use as a criterion in the diagnosis and in monitoring the progression or regression of tubular injury. Subsequently, this data can assist in the implementation of its routine assessment in clinical practice.

KEYWORDS: Acute Kidney Injury. Pharmacological Biomarkers. Sesquiterpenes.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ATP	Adenosina Trifosfato
Cl ⁻	Íon Cloreto
DCFH	a 2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTNB	5, 5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Sandwich Assay
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FECI ⁻	Fração de Excreção de Cloreto
FEK ⁺	Fração de Excreção de Potássio
FENa ⁺	Fração de Excreção de Sódio
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
I/R	Isquemia e Reperfusão
Ip	Intraperitoneal
K ⁺	Íon Potássio
KIM-1	Kidney Injury Molecule – 1
LRA	Lesão Renal Aguda
MDA	Malondialdeído
MTT	brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Na ⁺	Íon Sódio
NO	Óxido Nítrico
NTA	Necrose Tubular Aguda
PBS	Solução Tampão de Fosfato
Rho123	Rodamina 123
Rpm	rotações Por Minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
Uosm	Osmolalidade Urinária

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Divisão dos grupos experimentais dos experimentos <i>in vivo</i>	29
Tabela 2	Parâmetros Metabólicos Renais.....	42
Tabela 3	Parâmetros Bioquímicos Renais.....	46
Tabela 4	Proteinúria e Albuminúria.....	49
Tabela 5	Fração de Excreção de Eletrólitos.....	51
Tabela 6	Níveis urinários de KIM-1.....	53
Tabela 7	Dosagens de MDA e GSH.....	63
Tabela 8	Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).....	65
Tabela 9	Análise da produção de ERO pela técnica de DCF-DA.....	67
Tabela 10	Análise da respiração celular pela uso do corante de rodamina.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1).....	17
Figura 2	Unidade básica de Isopreno.....	19
Figura 3	Estereoisômeros do bisabolol.....	20
Figura 4	Representação esquemática do método de ELISA sanduíche.....	29
Figura 5	Reação de detecção dos níveis de Malondialdeído (MDA) através da reação de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	31
Figura 6	Interconversão da glutatona em suas duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR).....	32
Figura 7	Princípio do ensaio de oxidação do DCFH ao DCFoxi fluorescente.....	36
Figura 8	Estrutura química do fluorocromo catiônico Rodamina 123.....	37
Figura 9	Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente Rodamina 123 (Rho 123) e sua respectiva ligação à membrana mitocondrial funcional.....	38
Figura 10	Registro do consumo de água durante 24 horas.....	40
Figura 11	Registro do volume urinário produzido em durante 24 horas.....	41
Figura 12	Osmolalidade urinária na urina de 24 horas.....	42
Figura 13	Creatinina plasmática.....	44
Figura 14	Uréia plasmática.....	44
Figura 15	Ácido úrico plasmático.....	45
Figura 16	Clearance de creatinina.....	45
Figura 17	Proteinúria.....	47
Figura 18	Albuminúria.....	48
Figura 19	Fração de excreção de sódio (FENa ⁺).....	50
Figura 20	Fração de excreção de potássio (FEK ⁺).....	50
Figura 21	Fração de excreção de cloreto (FECl ⁻).....	51
Figura 22	Níveis urinários de KIM-1.....	53
Figura 23	Prancha Representativa da fotomicrografia do córtex renal e espaço de Bowman.....	55
Figura 24	Prancha Representativa da fotomicrografia da medula renal.....	56
Figura 25	Níveis teciduais de MDA.....	62

Figura 26	Níveis teciduais de GSH.....	62
Figura 27	Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol.....	64
Figura 28	Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol.....	65
Figura 29	Análise da produção de ERO pela técnica de DCF-DA.....	67
Figura 30	Histograma representativo da formação de ERO pela técnica de DCF-DA.....	68
Figura 31	Histograma representativo da formação de ERO pela técnica de DCF-DA.....	68
Figura 32	Análise da respiração celular pela uso do corante de rodamina.....	69
Figura 33	Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial pela utilização do corante de rodamina.....	70
Figura 34	Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial pela utilização do corante de rodamina.....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Lesão Renal Aguda (LRA).....	14
1.2	A Molécula de Lesão Renal - 1 (KIM-1).....	16
1.3	Óleos Essenciais e Terpenóides.....	18
1.3.1	O Bisabolol.....	20
1.4	Estresse Oxidativo.....	21
1.5	Justificativa.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo Geral.....	25
2.2	Objetivos Específicos.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	Animais e (-)-α-bisabolol.....	27
3.2	Delineamento Experimental.....	27
3.3	Ensaio <i>in vivo</i>.....	28
3.4	Os grupos experimentais.....	28
3.5	Mensuração de parâmetros bioquímicos.....	29
3.5.1	Determinação dos níveis urinários de KIM-1 por ELISA.....	29
3.6	Análise Histológica.....	31
3.7	Avaliação do equilíbrio óxido-redutor no tecido renal.....	31
3.7.1	Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA).....	31
3.7.2	Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH).....	32
3.8	Cultura de células tubulares renais.....	33
3.8.1	Cultivo de células renais LLC-MK2.....	33
3.8.2	Indução de I/R <i>in vitro</i>	34
3.8.3	Ensaio de redução do MTT.....	34
3.9	Ensaio de Respiração Celular por Citometria de Fluxo.....	35
3.9.1	Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio Citoplasmáticas	36
3.9.2	Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial.....	36
3.10	Análise Estatística.....	

4	RESULTADOS.....	40
4.1	Avaliação de parâmetros metabólicos renais.....	40
4.2	Medição dos Parâmetros Bioquímicos.....	43
4.2.1	Níveis de KIM-1 Urinários.....	52
4.3	Análise Histológica.....	54
4.4	Avaliação de alterações no equilíbrio óxido-redutor no tecido renal	60
4.5	Cultura de células renais e viabilidade celular.....	63
4.6	Ensaio de respiração celular por citometria de fluxo.....	66
4.6.1	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio.....	66
4.6.2	Análise do potencial transmembrânico mitocondrial.....	68
5	DISCUSSÃO.....	72
6	CONCLUSÃO.....	83
7	REFERÊNCIAS.....	84

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão Renal Aguda (LRA)

Os rins são órgãos essenciais à homeostase, não apenas porque eliminam produtos indesejáveis do metabolismo, como também por metabolizar substratos, manter constantes o volume extracelular, o balanço hidroeletrólítico, a pressão osmótica e o equilíbrio ácido-base do organismo, além de desempenhar um papel fundamental na regulação da pressão arterial e nas funções endócrinas, como a produção de eritropoietina e da forma ativa da vitamina D (GUYTON & HALL, 2011; BAYNES, 2015; KIDGO, 2015).

A lesão renal aguda (LRA) pode ser definida como uma perda ou redução da função renal súbita e inesperada, resultando na acumulação de substâncias azotadas ou nitrogenadas (uréia e creatinina), com ou sem diminuição da diurese (LI *et al.*, 2013), assim como o acúmulo de líquidos sob forma de edema, a perda da capacidade de diluir e concentrar a urina e a incapacidade de regular o equilíbrio ácido-base ou de manter o balanço e os níveis plasmáticos de eletrólitos (MENKE *et al.*, 2014; HARRIS *et al.*, 2015).

LRA está associada com alta morbidade e mortalidade e como parte da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (HORKAN *et al.*, 2015). Estudos recentes indicam que LRA afeta aproximadamente 20% dos pacientes hospitalizados e até 67% das pessoas admitidas em unidade de terapia intensiva, tornando-se entre as disfunções orgânicas mais comuns (HARRIS *et al.*, 2015). Além disso, o processo de isquemia/reperfusão (I/R) é comumente relacionado com a LRA, principalmente em procedimentos de captação e conservação de órgãos para transplante renal, tratamento de escolha para insuficiência renal crônica terminal (DITONNO *et al.*, 2015).

A LRA é classificada em três grandes grupos, de acordo com os mecanismos básicos que levam à disfunção renal: LRA pré-renal; LRA renal; LRA pós renal.

Nos casos em que o rim está funcionalmente íntegro, mas a perfusão sanguínea que a ele chega está reduzida, a LRA é denominada **pré-renal**. Essa hipoperfusão renal é geralmente causada por hipovolemia aguda, como por exemplo, em casos de desidratação por perdas gastrointestinais ou hemorragia grave (HORKAN *et al.*, 2015). No entanto, pode decorrer também de situações em que a *volemia arterial efetiva* está reduzida, como na insuficiência cardíaca congestiva grave, na cirrose. Esse quadro é essencialmente reversível se o distúrbio volêmico for corrigido em tempo. No entanto, a manutenção prolongada dessa

hipoperfusão renal pode causar lesão e necrose de células tubulares, principalmente nos segmentos renais localizados na medula externa (túbulo proximal e porção espessa da alça de Henle). Nesse caso, instala-se um quadro de **LRA renal** (KELLUM, 2008; KELLUM *et al.*, 2002).

A LRA renal, ou intrínseca, é caracterizada principalmente por *necrose tubular aguda* (NTA), embora possam aparecer outras alterações, à vezes sutis, e esporadicamente apenas vistas em microscopia eletrônica. Tais alterações podem ser exemplificadas por condensação de cromatina nuclear, lesões de cristas mitocondriais e vacuolização citoplasmática (MENKE *et al.*, 2014). A LRA renal, também denominada intrínseca, parenquimatosa, orgânica, ou estabelecida, constitui a modalidade mais comum de LRA (DITONNO *et al.*, 2015).

Na **LRA pós-renal**, o fluxo urinário é dificultado ou mesmo interrompido por obstrução mecânica das vias urinárias, devido, por exemplo, à presença de cálculos ou crescimento tumoral. Essa modalidade de LRA é potencialmente reversível caso seja realizada a desobstrução precoce das vias urinárias. No entanto, a recuperação pode ser mais difícil ou evoluir para NTA se a duração do processo obstrutivo tiver sido demasiadamente longa (KIDGO, 2015; KELLUM, 2008).

Isquemia, por definição, é ausência de fluxo sanguíneo e conseqüente redução ou ausência da oferta de oxigênio e substratos ao tecido e acúmulo de excesso de metabólitos (HARRIS *et al.*, 2015). Adicionalmente, o processo isquêmico no rim é caracterizado por diminuição do fluxo sanguíneo renal, decréscimo da filtração glomerular e diminuição do coeficiente de ultrafiltração renal, além da disfunção tubular secundária à obstrução e dano do epitélio tubular (DITONNO *et al.*, 2015). A conjunção desses fatores oferece as condições necessárias para a instalação da Síndrome de Isquemia-Reperusão (I/R), que é uma causa importante da disfunção orgânica em transplante renal, além de quadros de choque e em revascularizações, e também em processos inflamatórios, como pancreatite, colecistite, septicemia, doença de Crohn e outros. (MENKE *et al.*, 2014; HARRIS *et al.*, 2015; KADKHODAEI *et al.*, 2014; DA COSTA *et al.*, 2003).

A I/R é um mecanismo importante de dano oxidativo, no qual a hipóxia cria condições ideais para a produção de radicais livres após a reoxigenação, processo conhecido como reperusão. O tempo de isquemia e a intensidade da reoxigenação determinarão o grau de lesão, comprometendo principalmente a membrana celular; porém seus efeitos lesivos

também podem acontecer ao nível dos ácidos nucleicos, assim como das proteínas e outros constituintes da célula (KADKHODAE *et al.*, 2014; SHIMO *et al.*, 2011).

Se, por um lado, essa restauração do fluxo sanguíneo é, em geral, necessária para se recuperar a função celular normal, por outro lado, a re-introdução do sangue oxigenado nos tecidos isquêmicos pode desencadear lesões teciduais ainda mais intensas do que as provocadas pela isquemia, sobretudo relacionadas à elevada reatividade do oxigênio no tecido lesionado. Por isso, as principais consequências da isquemia ocorrem em microambiente vascular e, se persistindo a isquemia, surgem as primeiras áreas de necrose capilar e tecidual (BUSSMANN *et al.*, 2014; DEVARAJAN, 2006).

A tolerância dos tecidos à isquemia é variável e multifatorial dependendo do tempo de hipóxia, das necessidades metabólicas do tecido, do aporte da circulação colateral e de fatores humorais (YOSHIDA *et al.*, 1996). Sendo assim, consequências bioquímicas, hemodinâmicas, anatômicas e patológicas em extensão variável repercutem, principalmente após o início da reperfusão. Logo, o desenvolvimento de técnicas diagnósticas relacionadas às intercorrências da I/R, sobretudo da injúria renal, tem tomado destaque especial, principalmente relacionado ao diagnóstico precoce.

Os estágios iniciais da doença renal são geralmente assintomáticos e exigem testes laboratoriais para detecção. Um biomarcador ideal para o diagnóstico precoce de LRA deve ser endógeno, hidrossolúvel, não-tóxico, não-invasivo, produzido a um ritmo constante, livremente filtrado nos glomérulos, possuir mínima ligação às proteínas, não tendo secreção ou reabsorção tubular e sem o metabolismo e excreção extrarenal (MASSEY, 2004; HOFFMAN *et al.*, 2013). A avaliação deste analito deve ser fácil e disponível em amostras acessíveis e com o mínimo de interferência analítica (NGUYEN *et al.*, 2008; SABBISSETTI *et al.*, 2014; PICKERING *et al.*, 2014).

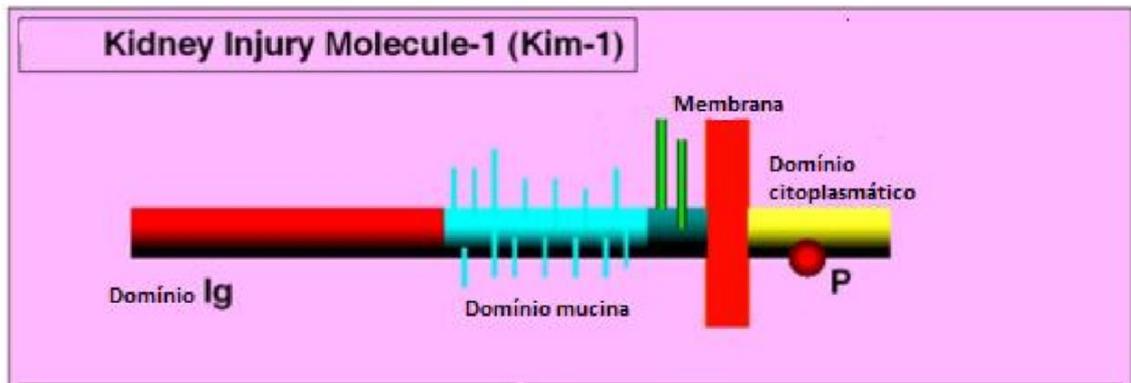
1.2 A Molécula de Lesão Renal - 1 (KIM-1)

A Molécula de Lesão Renal (KIM-1) é descrita como um novo biomarcador de lesão renal, principalmente expressa no túbulo proximal. KIM-1 é uma proteína transmembranar tubular, de 38,7 KDa, com uma imunoglobulina e domínio de mucina (Figura 1), mais especificamente um receptor de fosfatidilserina que medeia a fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados, indicando que o KIM-1 pode ter a função de uma molécula de sinalização. Esta molécula não é detectável em rins normais, mas sua presença é

acentuadamente induzida em lesão renal aguda, principalmente como marcador de lesão de túbulo contorcido proximal, no qual as células epiteliais indiferenciadas expressam facilmente essa molécula, sobretudo em eventos de lesão por isquemia (CHARLTON *et al.*, 2014; ICHIMURA *et al.*, 2008).

KIM-1 está associada com a ativação de células T e a resposta imune (HAN *et al.*, 2002). Quando cronicamente expressa, resulta na fibrose renal progressiva e insuficiência renal crônica. Além disso, é considerada como um marcador único, com elevada sensibilidade e especificidade, acima de tudo, para diagnóstico de lesão renal precoce (LIANGOS *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2015).

Figura 1: Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1).



Fonte: ICHIMURA *et al.*, 2008.

Muitos estudos demonstraram que o epitélio tubular é capaz de responder à injúria renal através de diversos mecanismos. Células tubulares são capazes de gerar consideráveis citocinas pró-inflamatórias, assim como receptores para linfócitos T, demonstrando uma participação significativa na resposta imune. Dessa forma, a KIM-1, apresenta-se, basicamente, como uma imunoglobulina com domínio mucina caracterizando um receptor de células T *upregulated* como resposta a injúrias às células tubulares proximais; por esta razão a KIM-1 também é conhecida por TIM-1 (*T cell immunoglobulin mucin domains-1*), pois é expressa em níveis baixos por subpopulações de células T ativadas (TAN *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2002; DEVERAJAN, 2011; LAHOUD *et al.*, 2015).

Sabe-se que a KIM-1 é um receptor de fosfatidilserina, e como tal é responsável por mediar a fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados, etapa fundamental da morte celular programada. Logo, se for possível detectar a expressão desses receptores em estágios

precoces da injúria isquêmica, seria possível estabelecer um prognóstico e tratar a doença, evitando assim complicações resultantes da LRA, inclusive transplante renal (DE BORST *et al.*, 2007; LAHOUD *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2002).

Quando KIM-1 é expressa cronicamente, isso resulta em progressão da fibrose renal e falência renal crônica, o que, muitas vezes, é relacionado com a fagocitose de lipídios oxidados, o que pode levar a estudos mais aprofundados da KIM-1 como também uma molécula relacionada ao diagnóstico da doença já estabelecida, no acompanhamento do avanço da patologia e no seu estágio de cronicidade (HUMPHREYS *et al.*, 2013; LAHOUD *et al.*, 2015).

A detecção laboratorial da presença de KIM-1 urinária tem se mostrado fidedigna quando em relação com as concentrações teciduais (LAHOUD *et al.*, 2015). Uma vez que a KIM-1 apresenta-se majoritariamente nas células tubulares proximais como uma proteína transmembrana, o que foi observado, principalmente em ensaios de cultivo celular, é que o domínio extracelular (ectodomínio) é clivado por metaloproteinases, possivelmente como forma de se gerar um sinal de regeneração celular. Logo, a clivagem do ectomínio resulta na sua detecção na urina (CHARLTON *et al.*, 2014; ICHIMURA *et al.*, 2008; DEVERAJAN, 2011).

1.3 Óleos Essenciais e Terpenóides

Substâncias químicas de origem natural têm sido uma das principais fontes da diversidade química na descoberta de novos fármacos. Estes e seus derivados sintéticos se mostram benéficos no tratamento de diversas doenças na maioria das áreas da medicina. Estudar atividades medicinais de plantas até então desconhecidas e explorar as classes de substâncias naturais tem sido um grande desafio no estudo farmacobotânico.

Em especial, os óleos essenciais são popularmente conhecidos por sua vasta utilização na indústria química e farmacêutica, destacando-se a produção de cosméticos e perfumaria, principalmente por suas propriedades aromáticas. Entretanto, diversos óleos essenciais tem sabidamente demonstrado diversas atividades farmacológicas, ressaltando a importância do seu estudo em condições de variadas doenças.

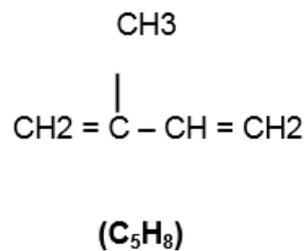
Os óleos essenciais são majoritariamente constituídos por terpenos, além de substâncias secundárias como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetona de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta, principalmente, substâncias constituídas por dez e quinze átomos de carbono,

respectivamente monoterpenos e sesquiterpenos (HARBONE *et al.*, 1991; BREITMAIER, 2006).

Terpenos, terpenóides ou isoprenóides são considerados, de forma geral, uma classe de substâncias provenientes de plantas superiores, além de fungos e organismos marinhos. Terpenóides constituem uma classe secundária de metabolitos lipofílicos derivados do mevalonato e isopentenilo pirofosfato, formados na síntese de hormônios vegetais, denominados fitoesteróis, que ocorrem de forma generalizada na natureza e são os componentes majoritários da fração volátil da variedade de plantas aromáticas. Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (NIEDERBACHER *et al.*, 2015).

Monoterpenos e sesquiterpenos são compostos geralmente encontrados nos óleos essenciais de várias plantas aromáticas (HARBONE *et al.*, 1991). Em especial, os sesquiterpenos (C₁₅) são formados biossinteticamente a partir de três unidades de isopreno, ou seja, a unidade básica de formação dos terpenóides; cada unidade de isopreno é formada por um esqueleto básico de cinco carbonos; por isso, os terpenos também são conhecidos como isoprenóides (Figura 2) (BREITMAIER, 2006).

Figura 2: Unidade básica de Isopreno.



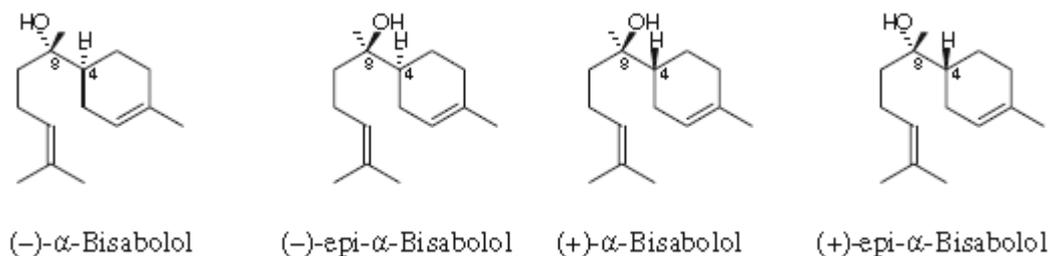
Fonte: BREITMAIER, 2006.

Sesquiterpenos foram identificados como os componentes ativos presentes em diversas plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional, com uma vasta gama de propriedades biológicas, incluindo anti-infecciosos (SANTOS *et al.*, 2015), antioxidantes (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2015), anti-inflamatória (MAURYA *et al.*, 2014), atividades anticancerígenas (FRIKECHE *et al.*, 2015) e anti-colinesterase (MAKWANA *et al.*, 2015).

1.3.1 O Bisabolol

O bisabolol (alfa,4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol) é um pequeno álcool de sesquiterpeno monocíclico e oleoso com massa molecular de 222,37 Da ($C_{15}H_{26}O$) isolado a partir do óleo essencial de uma variedade de plantas, arbustos e árvores. Foi isolado pela primeira vez em 1951 por Isaac (BRUNKE *et al.*, 1985) do óleo essencial de *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), popularmente conhecida por camomila, o qual contém até 50% de α -bisabolol; no entanto, este sesquiterpeno pode estar presente em uma variedade de plantas (JAKOVLEV *et al.*, 1969; JAKOVLEV *et al.*, 1979) e desde então foi estabelecido que este sesquiterpeno pode existir em quatro estereoisômeros possíveis (Figura 3) (GUY *et al.*, 2010). O enantiômero (+)- α -bisabolol é raro na natureza.

Figura 3: Estereoisômeros do bisabolol.



Adaptado de GUY *et al.*, 2010.

Geralmente, o (-)- α -bisabolol, também chamado levomenol, está presente em maior quantidade em uma variedade de plantas e pode ser obtido por hidrodestilação de seus respectivos óleos essenciais. Exemplos dessas plantas são camomila alemã (*Matricaria chamomilla*), sálvia (*Salvia runcinata*), candeeiro (*Vanillosmopsis arborea*), arnica (*Arnica chamissonis*) e *Myoporum grassifolium* (BUITRAGO *et al.*, 2015).

Berry, 1995, descreve a camomila como uma panacéia, ou seja, ela é descrita como detentor de uma diversidade de indicações terapêuticas, sendo o alto nível do estereoisômero com atividade farmacológica mais pronunciada no óleo essencial, ou seja, o (-)- α -bisabolol, relacionado com a gama de propriedades biológicas. Existem estudos que relatam o (-)- α -bisabolol como possuindo atividade anti-infecciosa (ROTTINI *et al.*, 2015), contra o câncer (LIANG *et al.*, 2014), anti-inflamatória (ZARGARAN *et al.*, 2014), anticolinesterásica (DE SIQUEIRA, *et al.*, 2014), além da habilidade de favorecer a permeação transdérmica de

fármacos (KIM *et al.*, 2012). No entanto, grande parte dos efeitos biológicos do (-)- α -bisabolol se dá devido à sua atividade antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2015).

Assim, o presente estudo pretende avaliar a bioprospecção do (-)- α -bisabolol como uma molécula com atividade nefroprotetora, contra a injúria causada pelo processo de isquemia seguida de reperfusão (I/R).

1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), também nomeadas radicais livres, e a capacidade antioxidante total do organismo (GALLE, 2001). O termo radical livre significa qualquer átomo ou molécula que tenha em sua órbita mais externa um ou mais elétrons não pareados. O não emparelhamento de elétrons na última camada confere alta reatividade aos átomos e moléculas, pois eles têm uma forte tendência a doar ou receber elétron (BUSSMANN *et al.*, 2014).

A lesão isquêmica ocorre essencialmente através de estresse oxidativo, o qual é gerado principalmente na mitocôndria por meio da cadeia transportadora de elétrons (BUSSMANN *et al.*, 2014). A degradação de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina, inosina, hipoxantina e xantina possivelmente está relacionada com os danos causados por eventos de isquemia e reperfusão. Na fase de reperfusão do tecido isquêmico, o acúmulo de xantina resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH \cdot) (SHIMO *et al.*, 2011). Os danos para as células tubulares renais causados por ERO são mediados por oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, danos no DNA e a indução de morte celular (ERNANI *et al.*, 2001). O processo de I/R aumenta a transdução do sinal para produção de óxido nítrico (NO). A pequena quantidade de NO produzida reage rapidamente na presença de altas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ formando o radical livre peroxinitrito (ONOO \cdot), um dos maiores responsáveis pela peroxidação de lipídios, principalmente aqueles poliinsaturados constantes na membrana fosfolipídica, o que resulta em aumento da permeabilidade celular e alteração da função renal e histofisiologia (DEVARAJAN, 2006).

Os radicais $O_2^{\cdot-}$ e seus produtos de redução, o H_2O_2 e, principalmente o radical OH \cdot , são alguns dos responsáveis pela lesão celular, promovendo a peroxidação lipídica, com lesão das mitocôndrias, lisossomos, degradação do colágeno e da própria membrana celular,

levando à morte das células (BUSSMANN *et al.*, 2014; SHIMO *et al.*, 2011). No rim, tais alterações são responsáveis por um aumento da permeabilidade tubular com perda das funções de transporte, bem como redução da fosforilação oxidativa mitocondrial e liberação inapropriada de enzimas líticas lisossômicas, que acelerariam o processo de degradação celular, com consequente diminuição da função renal (ERNANI *et al.*, 2001; BONVENTRE *et al.*, 1993), portanto, o estresse oxidativo, que corresponde a produção de radicais livres sobrepujando a defesa antioxidante, provoca uma rápida degeneração da função da célula tubular renal.

Detoxificação de EROs nas células é promovido por sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que constituem defesa antioxidante (GALLE, 2001). Sistemas enzimáticos incluem enzimas como superóxido dismutase, catalase, glutaciona peroxidase, entre outras que agem especificamente contra EROs através de reações em cadeia que culminam com a propagação e amplificação do processo e, consequentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (RAZVICKAS *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2004).

No parênquima renal, células tubulares, células glomerulares e os macrófagos são geradores potenciais de EROs (GALLE, 2001). Dados mostram que a participação chave de radicais livres nos mecanismos de nefropatias (Rodrigo & Rivera, 2002). Segundo Hahn *et al.* (1999), a suplementação dietética com o antioxidante "vitamina E" diminuem a taxa de progressão da deterioração renal atenuando a nefrotoxicidade e melhorando a ocorrência de glomerulosclerose na nefrectomia em estudos com ratos. Também, a nefrotoxicidade induzida por gentamicina foi atenuada com ácido gálico (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000).

Dessa forma, sugere-se que sistemas não enzimáticos, onde estão inclusos antioxidantes de origem farmacológica e/ou dietética, incluindo substâncias de origem natural, particularmente o Bisabolol, possuam atividade antioxidante em modelos de I/R renal, cuja fisiopatologia consiste inclusive em dano oxidativo.

1.5 Justificativa

A I/R é um fenômeno complexo, que contribui para a mortalidade e morbidade em diversos contextos, inclusive nos procedimentos de transplante renal, assim como é um fator predisponente para o estabelecimento da LRA. Várias estratégias e recursos são utilizados pelas células para prevenir ou diminuir a injúria celular causada pelo estresse oxidativo. Esses mecanismos de defesa antioxidantes celulares têm por finalidade prevenir a formação de

radicais livres, converter espécies oxidantes tóxicas em menos tóxicas, preservar a compartimentalização celular, que é vital para as estruturas intracelulares, ou promover o reparo do dano causado pelos radicais livres. Dessa forma, é possível que a suplementação com substâncias antioxidantes possa minimizar o dano oxidativo decorrente da I/R, destacadamente no que é relacionado à LRA.

Dessa forma, ressalta-se a importância do estudo utilizando substâncias como o terpeno (-)- α -Bisabolol, o qual apresenta diversificadas atividades biológicas, sobretudo um potencial antioxidante, o qual apresenta-se como estratégia de defesa ao modelo de LRA por I/R. Adicionalmente, a bioprospecção de substâncias isoladas de plantas pertencentes ao portfólio etnofarmacológico brasileiro, ratifica a importância deste trabalho, uma vez que cada vez mais a comunidade científica tem buscado alternativas terapêuticas e farmacológicas provenientes da biodiversidade local.

Ademais, o estudo de estratégias para diagnóstico precoce do desenvolvimento da lesão renal utilizando biomarcadores cada vez mais sensíveis e específicos, como ressaltado neste trabalho a KIM-1, pode auxiliar na detecção da injúria e acompanhamento da progressão do processo de melhora e cura.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos nefroprotetores do (-)- α -Bisabolol na Lesão Renal Aguda (LRA) em modelos de Isquemia/Reperusão (I/R), bem como estudar o biomarcador KIM-1 como preditor precoce da injúria renal.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos nefroprotetores do (-)- α -Bisabolol na LRA por I/R *in vivo* através da aferição dos parâmetros bioquímicos tradicionais;
- Estudar o envolvimento do biomarcador KIM-1 no diagnóstico precoce da LRA e sua associação com os efeitos do (-)- α -Bisabolol;
- Avaliar o efeito do (-)- α -Bisabolol *in vitro* em cultivo de células LLC-MK2;
- Estudar os efeitos do (-)- α -Bisabolol no contexto do equilíbrio redox através de ensaios de avaliação do estresse oxidativo no tecido renal e da avaliação da respiração celular por ensaios de citometria de fluxo.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e (-)- α -bisabolol

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (UFC) (no. 142/ 2015) em conformidade com as diretrizes éticas. Ratos Wistar machos com aproximadamente 200g foram mantidos sob condições controladas (25 ± 2 °C, ciclo claro-escuro de 12 horas). Comida e água foram fornecidas *ad libitum*. O (-)- α -bisabolol foi obtido a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Como critérios de aceitação para os estudos *in vivo*, foram usados animais hígidos, alimentados e bem hidratados, pesando entre 200 – 220 g. Foram excluídos do estudo animais não saudáveis, fora da faixa de peso e que não se adaptaram às condições do biotério, como não aceitar a água e o alimento oferecidos. Também foram excluídos animais refratários à anestesia.

3.2 Delineamento Experimental

No presente trabalho, foi avaliado o potencial do álcool sesquiterpeno (-)- α -bisabolol como molécula biologicamente ativa contra a lesão renal aguda causada por modelos de isquemia seguida de reperfusão (I/R). O estudo foi dividido, de forma geral, em duas etapas, uma *in vivo* e outra *in vitro*.

A primeira etapa, *in vivo*, foi realizada com o objetivo de induzir a lesão em estudo e observar os efeitos nefroprotetores do Bisabolol através do monitoramento metabólico, bioquímico e histológico, como já descrito.

A segunda, *in vitro*, consiste em estudos utilizando ensaios de cultivo celular em uma linhagem bem caracterizada de células renais tubulares proximais imortalizadas, as células LLC-MK2. Nesta etapa, a citoproteção relacionada à atividade do Bisabolol foi mensurada através de ensaios de viabilidade celular. Adicionalmente, conhecendo a lesão de I/R como sendo uma causadora de danos celulares por ativar o estresse oxidativo, características de respiração celular foram observadas por citometria de fluxo, assim como a interferência do Bisabolol nesses processos.

3.3 Ensaios *in vivo*

Os animais foram previamente anestesiados com Tiopental (Cristália Produtos Farmacêuticos e Químicos, São Paulo, Brasil) (50 mg/ kg i.p.). Uma laparotomia através de uma incisão na linha média foi realizada, o rim direito foi visualizado e removido e a isquemia foi induzida no rim esquerdo pelo clameamento não traumático, causando oclusão unilateral da artéria renal, durante 60 minutos, seguido de 48 h de reperfusão tal como previamente descrito (DA COSTA *et al.*, 2015; NAJAFI *et al.*, 2014). Os animais foram mantidos aquecidos a uma temperatura constante de aproximadamente 36° C durante as cirurgias e por fim, foi realizada uma sutura no local da incisão com fio de polipropileno 4.0 (PolipropyPoint®). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de forma similar em grupos falso-operado, denominado Sham, exceto pela nefrectomia direita e o clameamento da artéria renal. Durante as últimas 24 horas da reperfusão, as amostras de urina foram obtidas por meio de uma gaiola metabólica. O tempo escolhido para I/R foi o tempo capaz de causar disfunção renal significativa e lesão do rim do animal, além de produzir uma característica fisiopatológica reconhecida de insuficiência renal aguda (DA COSTA *et al.*, 2015). No final deste período, os animais foram novamente anestesiados para obter amostras de sangue para realização dos testes bioquímicos. Adicionalmente, o rim esquerdo de cada animal foi recolhido para avaliações adicionais.

3.4 Os grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n = 6), todos eles tratados através de gavagem oral 24 h após o início da reperfusão. O Bisabolol foi diluído em uma solução aquosa a 2% de DMSO 10 mL/Kg tal como descrito previamente (BEZERRA *et al.*, 2009).

Os grupos experimentais foram subdivididos como segue na tabela 1:

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais dos experimentos *in vivo*.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Administração através de gavagem
Sham	Falso-operado	Veículo
Sham + Bis	Falso Operado	(-)- α -Bisabolol (100 mg / kg)
Isquemia/reperfusão (I/R)	I/R	Veículo
I/R + Bis	I/R	(-)- α -Bisabolol (100 mg / kg)

Legenda: Bis = (-)- α -Bisabolol; I/R = Isquemia/Reperfusion

3.5 Mensuração de parâmetros bioquímicos

As amostras de sangue foram centrifugadas (4500 rpm durante 10 minutos) para obtenção do plasma. Os parâmetros bioquímicos foram aferidos utilizando um analisador automático (Roche Diagnostics Limited, Rotkreuz Suíça). Foram determinadas as concentrações de proteínas e albumina urinárias, respectivamente proteinúria e microalbuminúria, concentrações de creatinina plasmática e urinária e níveis plasmáticos de uréia e ácido úrico. Além disso, foram aferidos os níveis plasmáticos e urinários dos íons sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-), utilizando um eletrodo íon-seletivo (Roche Diagnostics Limited, Rotkreuz Suíça). Além disso, o consumo de água e diurese foram registrados e osmolaridade urinária foi mensurada utilizando um osmômetro de ponto de congelamento (PZL, Londrina, Brasil). Os níveis de KIM-1 urinária foi determinado pela reação imunoenzimática – ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), mais especificamente pela técnica de ELISA sanduíche (Tecnologia Boster Biológica, Fremont, CA, EUA) e expressa por comparação com a creatinina urinária.

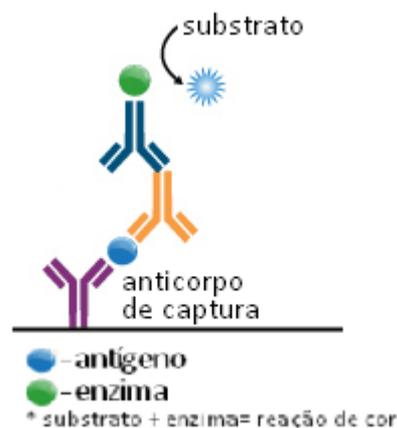
3.5.1 Determinação dos níveis urinários de KIM-1 por ELISA

Os níveis de KIM-1 urinário foram quantificados através da técnica do ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) sanduíche utilizando o kit da empresa Boster Biological Technology (Fremont, CA, USA). A técnica do ELISA sanduíche se baseia na quantificação do antígeno (KIM-1 urinária) através de sua ligação com anticorpos anti-KIM-1 adsorvidos na placa de 96 poços (placa sensibilizada e fornecida pelo fabricante). Foram seguidos os procedimentos de acordo com as normas do fabricante. Para a leitura colorimétrica foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Os resultados de KIM-1

urinário foram normalizados pela creatinina urinária da mesma amostra e expressos em mg/g-Creatinina (LAHOUD *et al.*, 2015).

Nesse método, como representado na figura 4, o anticorpo para um antígeno específico, chamado de anticorpo de captura é, inicialmente, adsorvido no poço. Depois, a amostra com o antígeno (neste caso, a urina) é adicionada e se liga a esse anticorpo. Logo após, é adicionado outro anticorpo específico para o antígeno. Finalmente, um terceiro anticorpo ligado à enzima é adicionado. Essa enzima irá reagir com o substrato adicionado, gerando cor. A intensidade da reação (cor mais fraca até mais intensa) é proporcional à quantidade de antígeno presente.

Figura 4: Representação esquemática do método de ELISA sanduíche.



Fonte: O autor.

3.6 Análise Histológica

Os tecidos renais removidos foram fixados em solução a 10% de formol tamponado e 24 h após, transferidos para uma solução de conservação de etanol a 70%. Após o processamento de tecidos, o qual consiste em desidratação, clarificação e diafanização; foram cortadas com um micrótomo secções mediana-sagital de 3 μm e seguiu-se a coloração de hematoxilina-eosina para avaliação histológica.

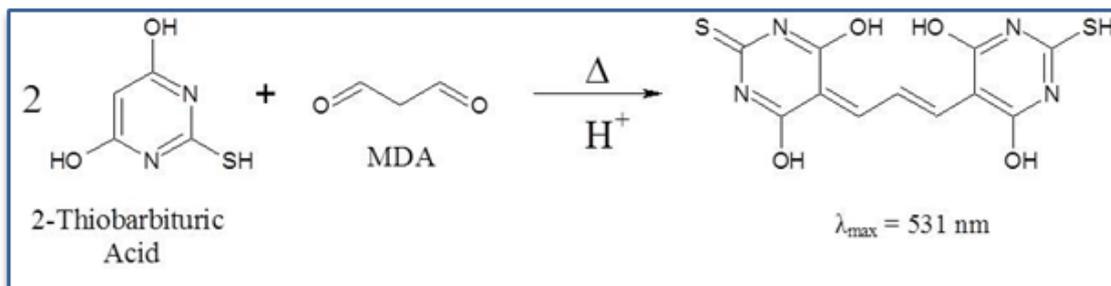
3.7 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor no tecido renal

3.7.1 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*) -, representadas principalmente pelo Malondialdeído (MDA) são formadas como um subproduto da peroxidação lipídica que podem ser detectadas pelo ensaio TBARS usando ácido tiobarbitúrico como um reagente (Figura 5) (KIL *et al.*, 2014).

A concentração de Malondialdeído (MDA) no tecido renal foi determinada como um indicador da peroxidação lipídica, tal como descrito anteriormente, utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (MIHARA *et al.*, 1980). Fragmentos do rim esquerdo foram homogeneizados com 1,15% de KCl, seguido pela adição de 1% de ácido fosfórico e de ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi incubada a 96 °C durante 20 minutos para a formação de um cromógeno cor-de-rosa. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 532 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram expressos em µg/g de tecido.

Figura 5: Reação de detecção dos níveis de Malondialdeído (MDA) através da reação de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).



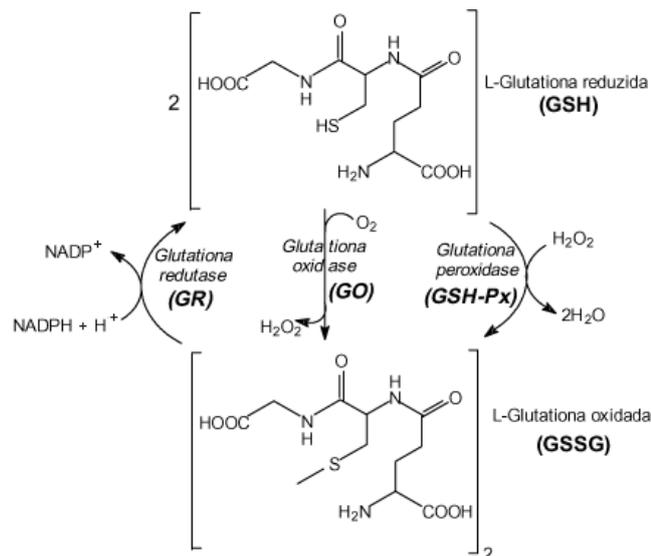
Fonte: MIHARA *et al.*, 1980.

3.7.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Para a determinação da glutathiona reduzida (γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH), o homogenato do tecido foi preparado com 0,02 M de EDTA. As amostras foram misturadas ao ácido tricloroacético a 50%, centrifugado (3000 rpm, 15 min), 400 uL do sobrenadante foi adicionado a 800 ul de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 ul de DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)). Por fim, a absorbância foi medida por espectrofotometria a 412 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram expressos em µg/g de tecido.

Sob condições oxidantes, duas moléculas de GSH doam um elétron para cada GSSG, que pode ser reduzido novamente para GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR) (Figura 6). Um decréscimo das concentrações de GSH e/ou alta concentração de GSSG e uma baixa relação das concentrações dessas duas moléculas (razão GSH/GSSG), são interpretadas como prova de desequilíbrio redox (GIUSTARINI *et al.*, 2011). Um razão baixa de GSH/GSSG é uma manifestação bem estabelecida do processo de envelhecimento e de uma variedade de estados de doença humana, incluindo a diabetes, insuficiência renal, pneumonia, malignidade, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e catarata (BALLATORI *et al.*, 2009).

Figura 6: Interconversão da glutatona em suas duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR).



Fonte: Adaptado de BALLATORI *et al.*, 2009.

3.8 Cultura de células tubulares renais

3.8.1 Cultivo de células renais LLC-MK2

As células epiteliais tubulares renais LLC-MK2 (HULL *et al.*, 1962), uma linhagem imortalizada de células de túbulo proximal oriundas de macacos, foram gentilmente doadas pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo e cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, EUA composto de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis, e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem confluência (BUTLER e DAWSON, 1992).

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

Para produção de estoques celulares, as células foram periodicamente deslocadas, quantificadas, conforme descrito a seguir e ressuspensas em meio DMEM completo acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Essas suspensões foram armazenadas em *vials* de criopreservação a -20°C *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a -80°C, mantidas por até 4 meses.

Antes de cada experimento, as células foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensão em 1mL de meio DMEM completo. Para plaqueamento inicial dos experimentos, as células foram quantificadas e ajustada a concentração para 1×10^5 .

Nos estudos *in vitro*, passagens celulares que apresentassem característica de contaminação ou de alteração morfológica não foram aceitas. Foram incluídos nos resultados ensaios onde os grupos experimentais pertencessem à mesma passagem da linhagem celular.

Para quantificação, alíquotas foram removidas para contagem em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular

foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1×10^5 células/mL em placas de 24 e 96 poços.

3.8.2 Indução de I/R *in vitro*

A lesão *in vitro* por isquemia/reperfusão foi induzida por um método anteriormente descrito denominado método da câmara anaeróbica (GINO *et al.*, 2014). As células foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços, e mantidas *overnight*, para permitir adesão e proliferação celular. Para a indução da isquemia, o meio de cultura normal foi substituído por DMEM privado de glicose, piruvato e SBF e em seguida as placas foram incubadas numa câmara anaeróbica por 24 horas. A reperfusão foi realizada, após o período na câmara, através da adição de um meio de cultura completo e retorno das células à atmosfera de 5% de CO₂.

Após 3 horas, as placas foram tratadas com bisabolol em várias concentrações (500; 250; 125; 62,5 e 31,25 mM). Diluições de dois passos foram realizadas para assegurar que a concentração de DMSO nos grupos experimentais nunca excedesse 0,5%. Todos os ensaios foram realizados em paralelo nas células em condições normais de aerobiose a fim de detectar eventuais concentrações tóxicas do (-)- α -bisabolol na linhagem celular. A recuperação da viabilidade celular foi medida pelo ensaio de redução do MTT.

3.8.3 Ensaio de redução do MTT

O teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é amplamente usado na determinação da viabilidade de células em cultivo. É um sal de tetrazólio de cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, deve ser adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados. Os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica e viabilidade celular (LIU *et al.*, 1997; MOSMANN, 1983).

As placas submetidas ao processo de I/R e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 μ L de sobrenadante foram removidos. 10 μ L de uma solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados e a placa foi

incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida, 90 µL de dodecil-sulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 horas de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm.

3.9 Ensaios de Respiração Celular por Citometria de Fluxo

No intuito de investigar o potencial do (-)- α -bisabolol em reverter a lesão da injúria após I/R por desequilíbrio redox, foram avaliados dois parâmetros da respiração celular: produção de espécies reativas de oxigênio e alteração no potencial transmembrânico mitocondrial.

O protocolo de plaqueamento das células LLC-MK2 em placas de 24 poços (1 mL/poço) e o processo de I/R *in vitro*, bem como o tratamento com Bisabolol foram realizados como previamente descrito neste trabalho.

Previamente a cada experimento de citometria de fluxo, as células foram tripsinizadas e lavadas por três centrifugações subsequentes na presença de tampão fosfato (PBS) a 4000 RPM por 5 minutos.

Com o objetivo de excluir uma possível associação dos danos celulares ao tratamento com Bisabolol, além da análise dos parâmetros de respiração celular em células submetidas à I/R, essas análises também foram feitas em células cultivadas e tratadas em condições normais e constantes de aerobiose (37°C e 5% de CO₂).

A intensidade de fluorescência foi medida através de citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, São Paulo, SP) equipado com laser de argônio de 15 mW resfriado a ar e operando em 488 nm. Parâmetros como complexidade (Detector lateral de dispersão da luz - SSC) e tamanho (Detector frontal de dispersão da luz - FSC) celular também foram avaliados.

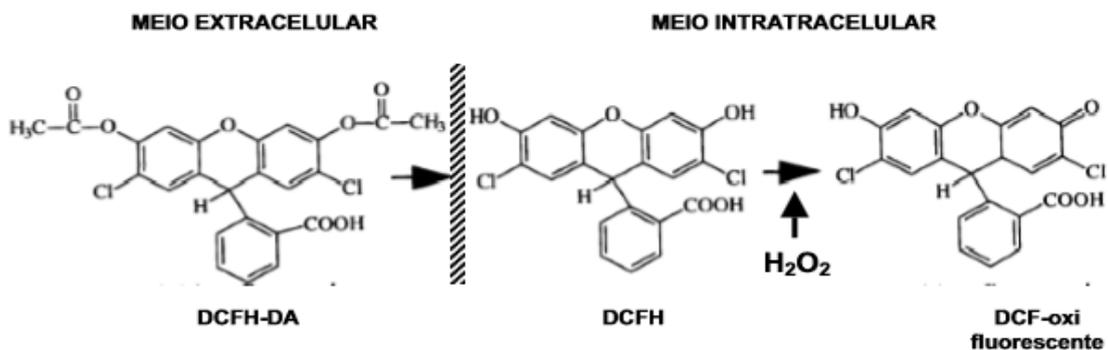
3.9.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio Citoplasmáticas

O princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, provendo um substrato oxidável (DCFH). O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada

(DCFoxi), que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530 nm (Figura 7). A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células. (BASS *et al.*, 1983).

Para o a incorporação do DCFH no interior das células, 5 μ L (concentração final 100 μ M) da solução estoque foram adicionados aos poços da placa de 24 poços contendo as células em cultivo 3 horas após o tratamento com (-)- α -bisabolol, como previamente descrito (BASS *et al.*, 1986). Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde (FL1).

Figura 7: Princípio do ensaio de oxidação do DCFH ao DCFoxi fluorescente



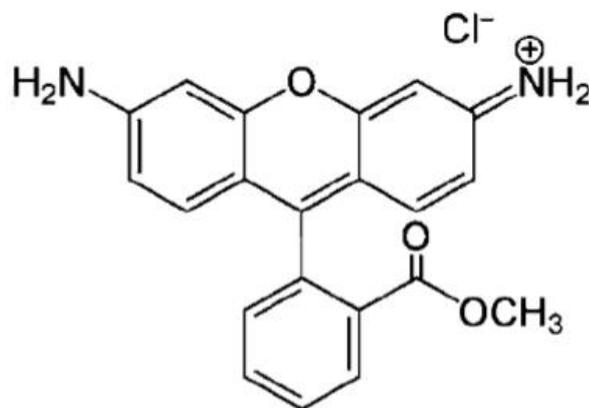
Fonte: Adaptado de ROBINSON, 1998.

3.9.2 Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) o qual é um corante específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas, emitindo fluorescência vermelha (Figura 8). Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectados em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde citosólica em detrimento da vermelha mitocondrial, indicando uma

difusão da Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas (JOHNSON *et al.*, 1980) (Figura 9). Sendo assim, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada através do filtro de fluorescência vermelha (FL2) (YANG *et al.*, 2012).

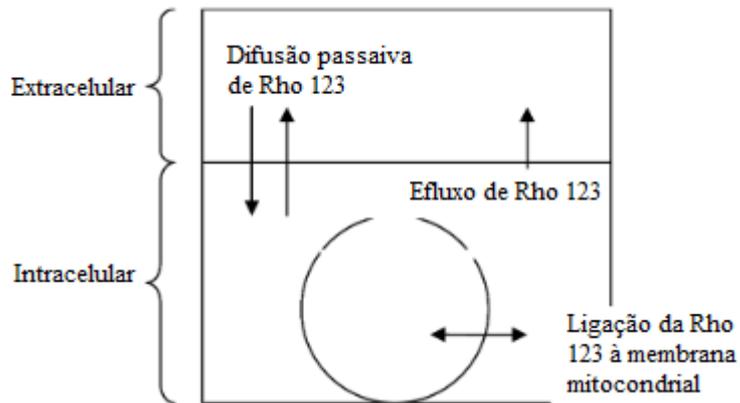
Figura 8: Estrutura química do fluorocromo catiônico Rodamina 123



Fonte: JOHNSON *et al.*, 1980.

As células em cultura que foram submetidas à lesão por Isquemia/ Reperfusão pelo método da câmara anaeróbica foram tratadas com Bisabolol, como descrito anteriormente neste trabalho. Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 µg/mL) por meia-hora para, em seguida, ser processado em citômetro de fluxo.

Figura 9: Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente Rodamina 123 (Rho 123) e sua respectiva ligação à membrana mitocondrial funcional.



Fonte: YANG *et al.*, 2012.

3.10 Análise estatística

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

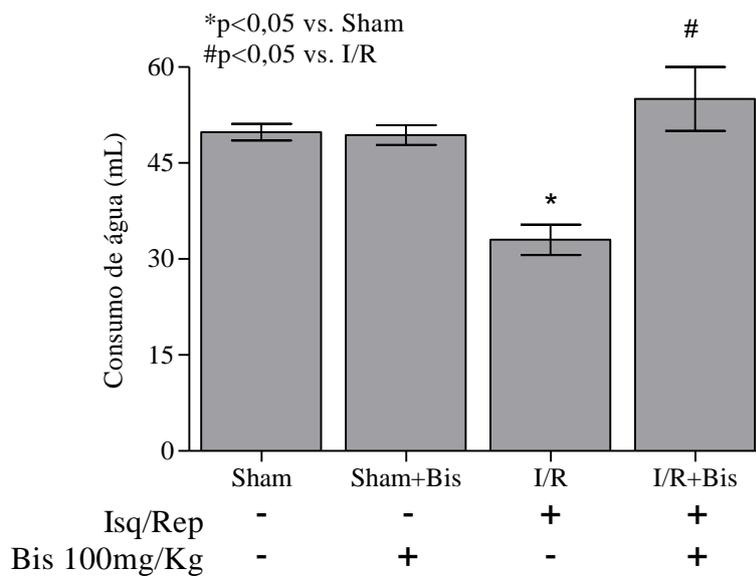
Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de parâmetros metabólicos renais

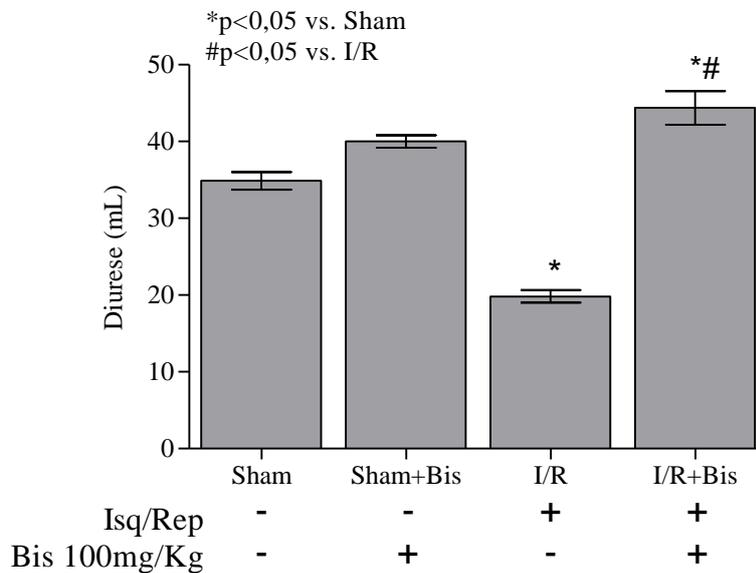
Todos os animais utilizados no estudo foram mantidos em gaiolas metabólicas, sendo estas uma ferramenta essencial quando se pretende avaliar, em estudos *in vivo*, parâmetros metabólicos. Sendo assim, no presente estudo, a média do volume de água ingerido e o volume de urina produzida em 24 horas por cada animal, respectivamente figuras 10 e 11, foram registrados a fim de acompanhar o andamento funcional renal em cada grupo de forma inespecífica.

Figura 10: Registro do consumo de água durante 24 horas.



Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como volume médio \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, p<0,05.

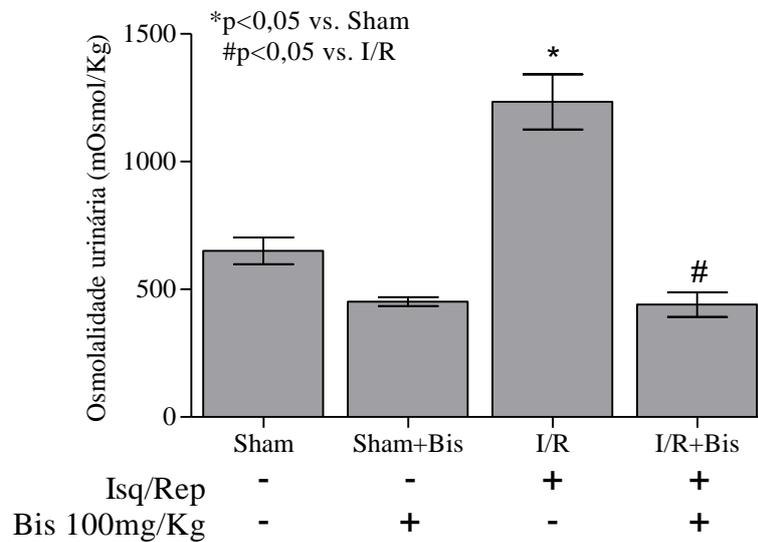
Figura 11: Registro do volume urinário produzido em durante 24 horas.



Os experimentos foram realizados com $n=6$, e os dados expressos como volume médio \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Foi observado que houve uma diminuição no consumo de água e na diurese dos animais em que a lesão foi estabelecida pelo processo de I/R. O Bisabolol foi capaz de reverter completamente essas alterações no grupo I/R + Bis. Neste contexto, foi observado que o volume urinário é significativamente reduzido após o processo de I/R.

Além disso, a osmolalidade urinária (Uosm) foi medida. Por conceito, osmolalidade pode ser interpretada como o número de partículas presentes em um determinado volume de solução, ou seja, ao mensurar a Uosm nos grupos experimentais, pretende-se relacionar se a alteração de volume está ou não associada a alterações na composição da urina formada. Uosm está representada na figura 12.

Figura 12: Osmolalidade urinária na urina de 24 horas.

Os experimentos foram realizados com $n=6$, e os dados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

A Uosm é o padrão ouro quando se estuda a capacidade de concentração urinária. Considerando essa assertiva, o grupo I/R apresentou aumento na Uosm correlacionada ao estabelecimento da lesão, ou seja, a urina está com uma concentração de solutos aumentada em comparação ao Sham. Dessa forma, foi observado que o tratamento com Bisabolol (I/R + Bis) normalizou esse parâmetro. Os dados numéricos relacionados aos parâmetros metabólicos renais estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros Metabólicos Renais

Grupos	Consumo de água (mL)	Diurese (mL)	Osmolalidade urinária (mOsmol/Kg)
Sham	49,83 \pm 1,3	34,88 \pm 1,2	650,5 \pm 52,9
Sham + Bis	49,38 \pm 1,5	40,0 \pm 0,8	451,5 \pm 17,6
I/R	33,0 \pm 2,4	19,83 \pm 0,8	1234 \pm 108,1
I/R + Bis	55,0 \pm 5,0	44,38 \pm 2,2	440,3 \pm 48,13

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM.

Dessa forma, foi possível observar o estabelecimento da lesão renal aguda (LRA), assim como os efeitos em potencial do fármaco ao modificar a patologia. Logo, tornou-se necessário iniciar estudos a nível bioquímico, objetivando confirmar os resultados obtidos.

4.2 Medição dos Parâmetros Bioquímicos

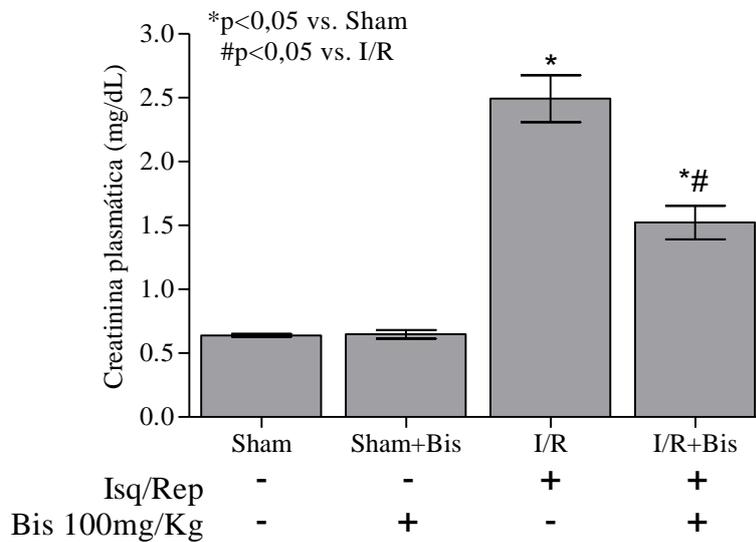
A correlação existente entre a presença de alterações bioquímicas a níveis séricos e urinários com o surgimento de uma lesão renal, da LRA de forma especial neste estudo, é de fundamental importância quando se pretende estabelecer um acompanhamento em pacientes nefropatas de qualquer nível.

A avaliação indireta de parâmetros renais, isto é, a detecção de metabólitos de origem renal em amostras como soro e urina é de grande praticidade, principalmente pelo acesso facilitado às amostras por métodos relativamente não invasivos, ao contrário do estudo direto da integridade renal. Contudo, o grande desafio a ser enfrentado neste contexto é o de se estudar e padronizar marcadores cada vez mais precoces e sensíveis à detecção do estabelecimento da lesão e do acompanhamento do seu desenvolvimento.

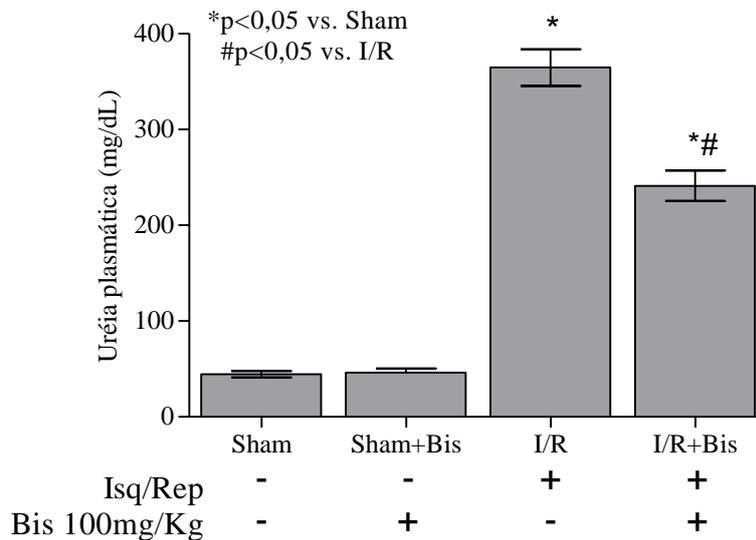
Sendo assim, foram mensurados parâmetros bioquímicos universalmente utilizados em estudos da função renal; tais como: creatinina, uréia e ácido úrico plasmáticos, respectivamente figuras 13, 14 e 15, assim como foi calculado o clearance de creatinina (Figura 16), de acordo com a fórmula a seguir. Os dados numéricos correspondentes às dosagens bioquímicas estão contidos na tabela 3.

$$\text{Cear. de Creatinina} = \frac{\text{Creatinina Urinária} \times \text{Volume urinário de 24h}}{\text{Creatinina Plasmática} \times 1440 \text{ minutos}}$$

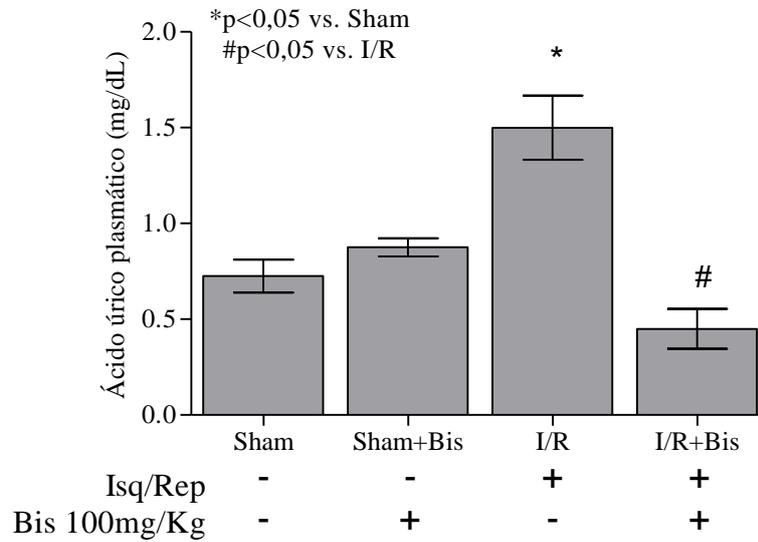
Foi observado, respectivamente, um aumento da creatinina, da uréia e do ácido úrico plasmáticos, assim como uma diminuição no clearance de creatinina no grupo I/R quando comparado com o Sham; esses dados são relativos ao estabelecimento da LRA por I/R. Destacadamente, o tratamento com Bisabolol reverteu as alterações no grupo I/R + Bis.

Figura 13: Creatinina plasmática.

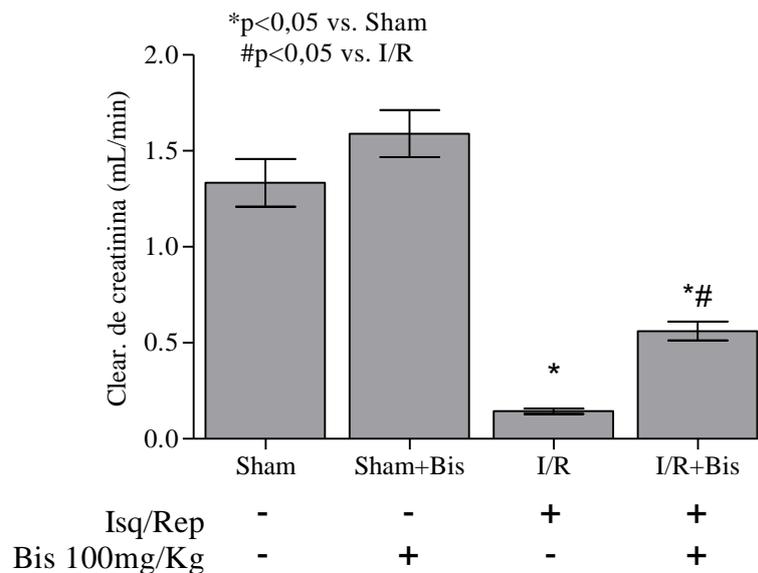
Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como concentração média \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Figura 14: Uréia plasmática.

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como concentração média \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Figura 15: Ácido úrico plasmático.

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como concentração média \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Figura 16: Clearance de creatinina.

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como volume médio por minuto \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Tabela 3: Parâmetros Bioquímicos Renais

Grupos	Creatinina plasmática (mg/dL)	Uréia plasmática (mg/dL)	Ácido úrico plasmático (mg/dL)	Clear. de creatinina (mL/min)
Sham	0,64 ± 0,01	44,5 ± 3,43	0,725 ± 0,08	1,33 ± 0,12
Sham + Bis	0,65 ± 0,03	46,0 ± 4,42	0,875 ± 0,05	1,59 ± 0,12
I/R	2,49 ± 0,18	364,8 ± 19,2	1,5 ± 0,17	0,14 ± 0,015
I/R + Bis	1,52 ± 0,13	241,3 ± 15,87	0,45 ± 0,10	0,56 ± 0,05

Os dados estão expressos como média padrão ± EPM.

Com base nos resultados obtidos, foi possível inferir que o procedimento experimental foi capaz de causar modificações não somente funcionais na dinâmica renal, como também alterações em nível de néfron nos animais do grupo I/R, o qual apresentou aumento plasmático das concentrações de creatinina, uréia e ácido úrico, assim como redução no valor do clearance de creatinina quando comparado com o Sham.

No presente estudo, foi observado que o tratamento com o Bisabolol, no grupo I/R + Bis, foi capaz de reduzir as alterações bioquímicas encontradas. No entanto, ao realizar uma análise estatística dos resultados obtidos, é possível perceber que esta melhora não é significativamente considerável quando se compara, por exemplo, a creatinina e a uréia plasmáticas do grupo I/R + Bis com o Sham; ao contrário do que acontece, por sua vez, com o ácido úrico e com o clearance de creatinina.

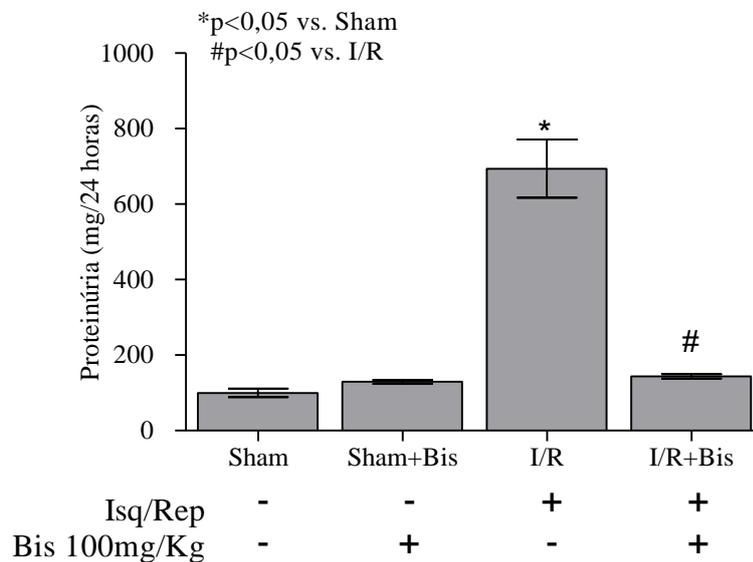
Estes resultados podem parecer contraditórios; apesar disto, eles não invalidam o método. Como já citado anteriormente, os métodos e parâmetros bioquímicos utilizados na prática clínica apresentam, dentre outras, a desvantagem de possuírem relativamente baixa especificidade e sensibilidade, principalmente quando se pretende acessar pequenas variações na escala de dano renal e no diagnóstico precoce da lesão recém-estabelecida.

Nesse contexto, na busca de marcadores com maiores valores preditivos positivos do estabelecimento da LRA assim como da avaliação da atividade do Bisabolol como uma

substância com potencial nefroprotetor, foram mensurados os níveis de proteínas, assim como da albumina, urinárias.

Observou-se aumento da proteinúria no grupo I/R em comparação com o Sham (Figura 17); O tratamento com Bisabolol, no grupo I/R + Bis, foi capaz de reverter estatisticamente a proteinúria a níveis semelhantes aos do grupo Sham. Este vem a ser um dado adicional à característica de nefroproteção em algum grau da molécula estudada.

Figura 17: Proteinúria.



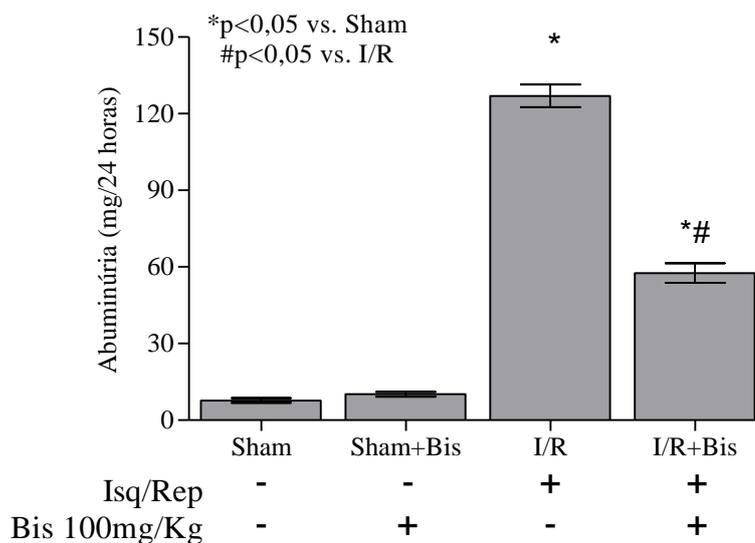
Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como massa de proteínas (em mg) por 24 horas \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

No intuito de continuar avaliando as alterações renais, também foi dosada a concentração de albumina no volume de urina coletado durante 24 horas, conhecida como albuminúria ou microalbuminúria. Considerando que o teste de microalbuminúria é capaz de detectar pequenas quantidades de albumina na urina, e é considerado um marcador sensível e precoce de lesão renal, o qual é detectável mesmo sem diminuição da TFG, antes mesmo da proteinúria e aumento de creatinina no sangue (LEVEY *et al.*, 2015).

Na figura 18, foi observado de que o estabelecimento da lesão está intimamente relacionado com a detecção da presença de albumina na urina (grupo I/R), a qual deveria ser basicamente nula em estado não patológico, como demonstrado no grupo Sham. Mesmo assim, o Bisabolol foi capaz de reduzir em praticamente a metade esses níveis apenas com uma dose única (I/R + Bis).

Sendo assim, conhecendo principalmente a sensibilidade relativamente aumentada da análise deste biomarcador, é possível sugerir que o Bisabolol protege o tecido renal contra a injúria da LRA assim como este pode auxiliar na prevenção do agravamento da lesão.

Figura 18: Albuminúria.



Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como massa de albumina (em mg) por 24 horas \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Os dados numéricos referentes à proteinúria e à albuminúria nos grupos experimentais estão contidos da tabela 4.

Tabela 4: Proteinúria e Microalbuminúria

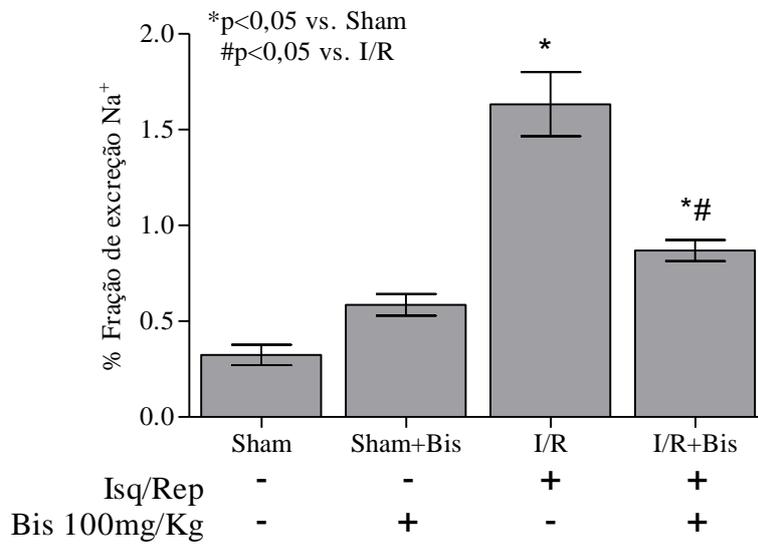
Grupos	Proteinúria (mg/24 horas)	Abuminúria (mg/24 horas)
Sham	99,9 ± 11,45	7,72 ± 0,94
Sham + Bis	129,4 ± 5,23	10,16 ± 0,95
I/R	694,1 ± 76,78	127 ± 4,49
I/R + Bis	143,6 ± 5,85	57,62 ± 3,8

Os dados estão expressos como média padrão ± EPM.

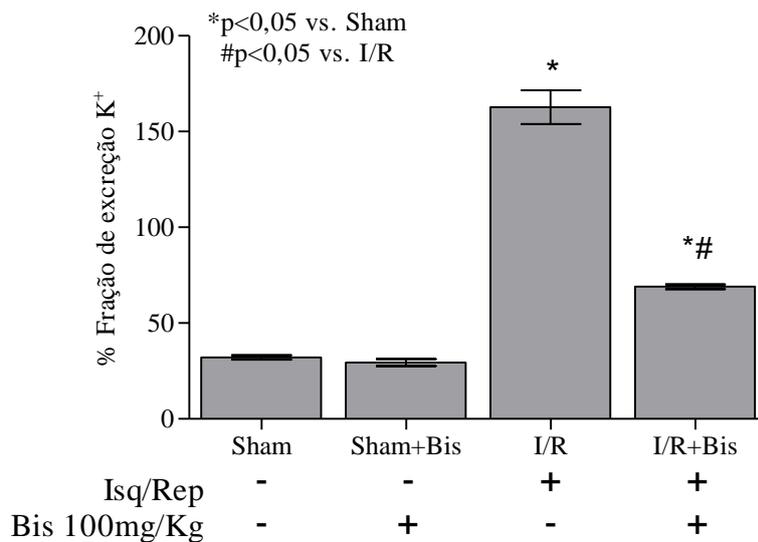
Logo, torna-se inexorável o objetivo de se obter maiores detalhes relacionados ao desenvolvimento de técnicas de estudo para marcadores bioquímicos idealizados como possuidores de eficácia e sensibilidade ideais. Portanto, resolvemos estudar a KIM-1 (molécula de injúria renal) como candidata a padrão para este modelo, principalmente pelo fato de esta apresentar uma localização transmembranar preferencial em nível de células do túbulo contorcido proximal.

Esta localização foi escolhida ao se estudar a fração de excreção dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto. A fração de excreção é calculada levando em consideração as dosagens dos respectivos eletrólitos e da creatinina em amostra isolada de urina e no plasma, fazendo-se uma correlação percentual entre elas (AMLAL *et al.*, 2003), como demonstrado na fórmula a seguir. As frações de excreção de sódio, potássio e cloreto estão representadas nas respectivas figuras 19, 20 e 21 e tabela 5.

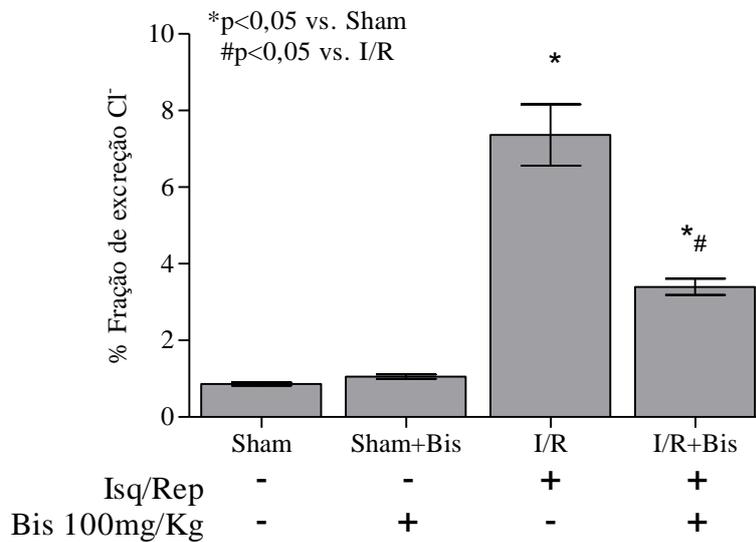
$$FE (\%) = \frac{\text{Concentração urinária do Eletrólito} \times \text{Creatinina urinária}}{\text{Concentração plasmática do Eletrólito} \times \text{Creatinina plasmática}} \times 100\%$$

Figura 19: Fração de excreção de sódio (FENa⁺).

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como percentual médio \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Figura 20: Fração de excreção de potássio (FEK⁺).

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como percentual médio \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Figura 21: Fração de excreção de cloreto (FECl⁻).

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como percentual médio ± EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, p<0,05.

Tabela 5: Fração de Excreção de Eletrólitos

Grupos	% FENa ⁺	% FEK ⁺	% FECl ⁻
Sham	0,32 ± 0,05	32,03 ± 1,15	0,86 ± 0,04
Sham + Bis	0,58 ± 0,06	29,42 ± 1,83	1,058 ± 0,06
I/R	1,66 ± 0,17	162,8 ± 8,85	7,36 ± 0,8
I/R + Bis	0,87 ± 0,05	69,02 ± 1,26	3,4 ± 0,21

Os dados estão expressos como média padrão ± EPM.

Quando analisadas conjuntamente, as FE indicam que no grupo I/R há uma maior eliminação de eletrólitos na urina, levantando-se a hipótese de um dano renal tubular, principalmente em nível de túbulo contorcido proximal, visto que este processo de reabsorção de eletrólitos se dá principalmente e em maior escala neste nível do néfron (KIDGO, 2015). Adicionalmente, este aumento na eliminação dos eletrólitos, associado à diminuição da diurese, ratifica a elevação na osmolalidade urinária, conseqüentemente gerando uma urina

mais concentrada, reforçando a hipótese de dano tubular e confirmando a importância da dosagem do KIM-1 urinário, pois este marcador tem demonstrado especificidade e sensibilidade aumentadas no estudo deste dano.

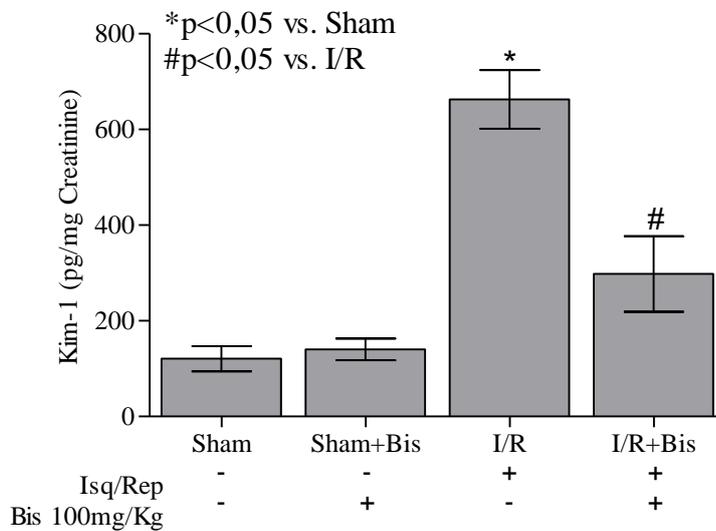
Na análise dos três eletrólitos, o tratamento com Bisabolol se mostrou capaz de diminuir as suas respectivas FE, indicando um restabelecimento, mesmo que parcial, da homeostasia neste nível.

4.2.1 Níveis de KIM-1 Urinários

A molécula de injúria renal (KIM-1) é conhecida como um biomarcador de lesão apresentado apenas em tecidos que sofreram insulto, isto é, seus níveis são praticamente indetectáveis em rins saudáveis. Sua expressão é marcadamente relacionada a uma regulação para cima (*up-regulation*) em células do túbulo contorcido proximal de rins pós-isquêmicos de ratos, como demonstrando por Han (2002). Contudo, alta especificidade e sensibilidade associadas à sua detecção, assim como a correlação no auxílio do diagnóstico da LRA em estados precoces têm elevado este biomarcador a níveis promissores no estudo da função renal.

No presente estudo, foram dosados os níveis de KIM-1 na urina de 24 horas dos animais dos grupos experimentais pela técnica de ELISA sanduíche. Com o objetivo de reduzir a influência do volume urinário nos valores absolutos de concentração de KIM-1 obtidos, estes valores foram corrigidos, ou seja, expressos na forma de razão pela concentração da creatinina urinária, como exposto na figura 22 e tabela 6.

Analisando a figura 22, foi observado que após a indução da isquemia seguida por reperfusão (I/R), os níveis de KIM-1 urinários aumentaram estatisticamente em relação aos basais obtidos no grupo Sham. Com essa informação é possível sugerir que a KIM-1 está associada ao estabelecimento da LRA no modelo de I/R e que seus níveis urinários estão significativamente aumentados, confirmando a importância da detecção desse biomarcador em diferentes estágios da doença.

Figura 22: Níveis urinários de KIM-1.

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como razão de massa de KIM-1 e creatinina urinária \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Tabela 6: Níveis urinários de KIM-1.

Grupos	KIM-1 (pg/mg Creatinina)
Sham	120,8 \pm 26,5
Sham + Bis	140,6 \pm 22,7
I/R	663 \pm 61,25
I/R + Bis	298 \pm 78,92

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM.

Ademais, uma única administração do Bisabolol mostrou-se capaz de reduzir aproximadamente pela metade os valores relativos de KIM-1 urinária no grupo I/R + Bis, indicando uma provável regressão da lesão após o tratamento. Um biomarcador ideal da função renal é aquele de cujas mínimas variações possam ser confiavelmente relacionado às mudanças na progressão da lesão. Portanto, a alta sensibilidade relacionada à KIM-1 valida o

objetivo deste trabalho que postula a busca de um biomarcador capaz de detectar a LRA em estágios precoces, assim como a avaliação de pequenas variações no quadro clínico.

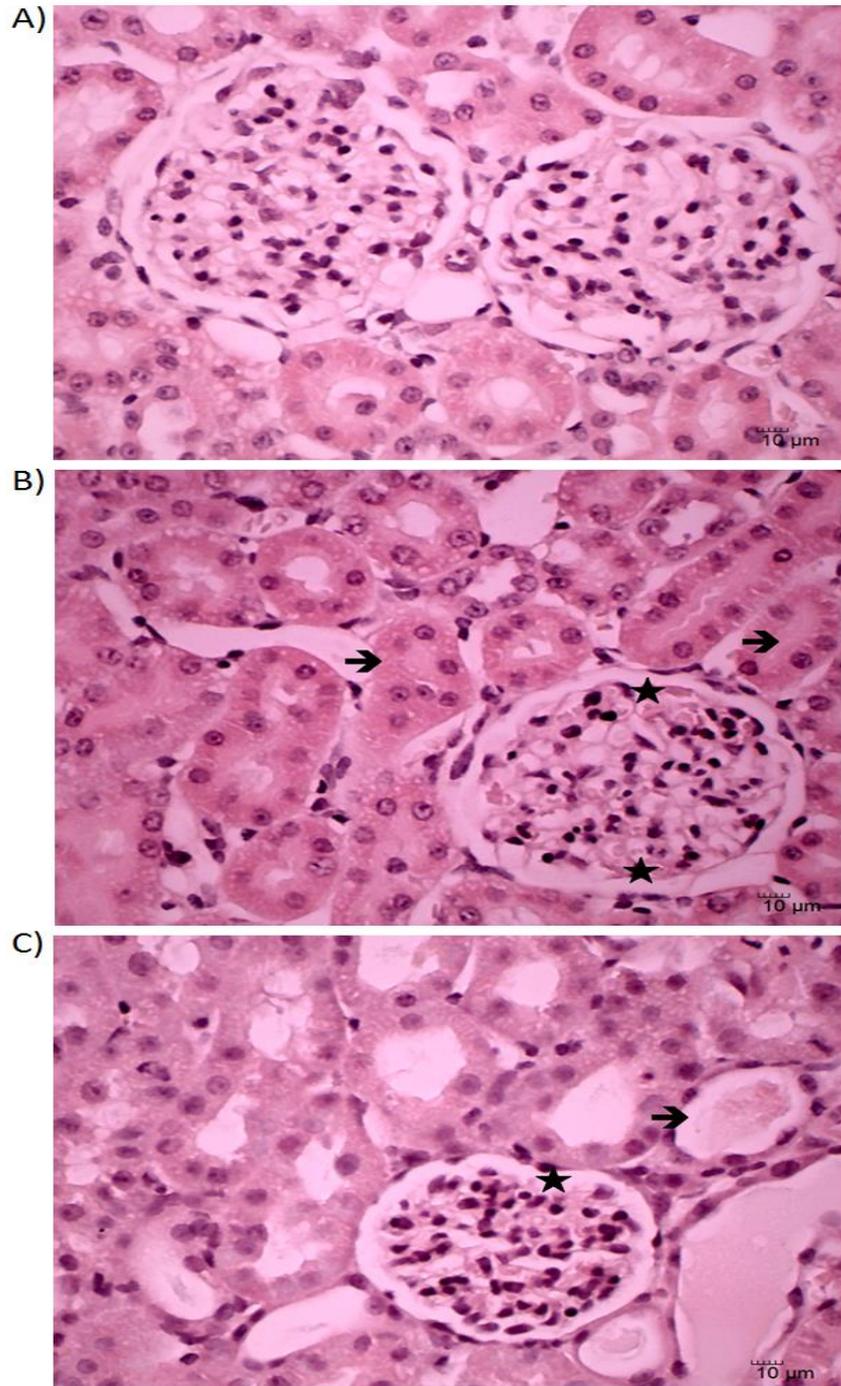
Logo, através de estudos histopatológicos, sugere-se que seja possível associar a avaliação microscópica do tecido renal nos diferentes grupos experimentais com a análise dos níveis de KIM-1 urinária, os quais são comprovadamente proporcionais aos teciduais.

4.3 Análise Histológica

No sentido de correlacionar os resultados bioquímicos obtidos com a avaliação do dano tecidual renal direto, foram recolhidos tecidos renais dos grupos experimentais para exame histológico. O *status* no grupo Sham + Bis foi semelhante ao do grupo Sham, ou seja, sem danos histológicos. Além disso, no grupo I/R, as células das paredes dos túbulos proximais mostraram danos severos, tais como: vacuolização celular, focos de hemorragia intersticial, e deposição de proteínas, congestão glomerular e esfoliação para os lúmens, com presença de fibrose e discreto infiltrado inflamatório (Figuras 23, 24 e 25). Na medula externa, houve dano celular grave nos segmentos tubulares de Alça de Henle (Figuras 26, 27 e 28). A gravidade dos danos diminuiu nos animais do grupo I/R + Bis. O tratamento reduziu essas alterações, marcadamente a congestão vascular e depósito protéico intratubular, em comparação com o Grupo I/R.

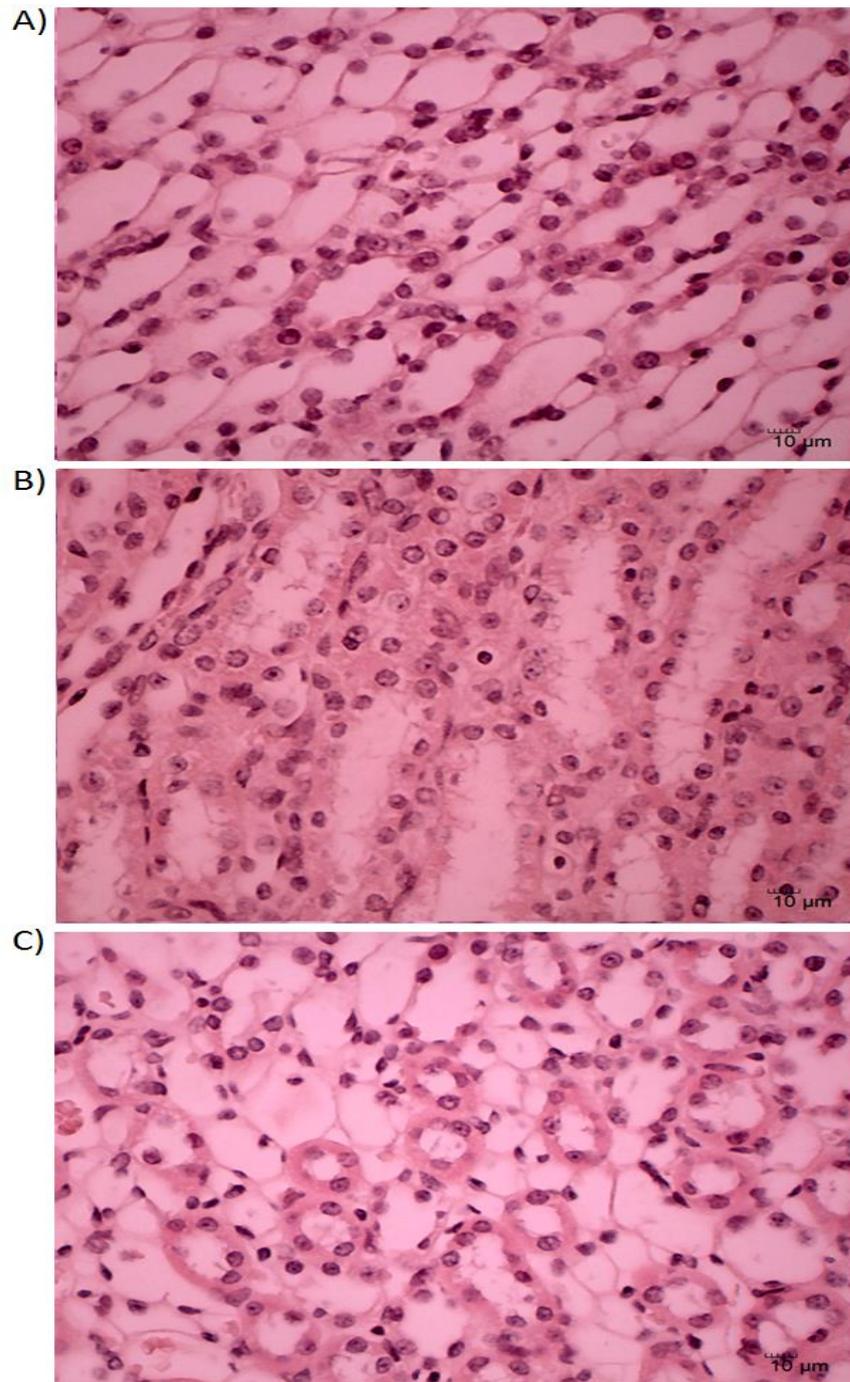
Esses dados, associados aos dados bioquímicos, tornaram possível sugerir que uma única administração de Bisabolol, mesmo que por via oral, de alguma maneira altera positivamente a arquitetura renal e evidentemente a sua histofisiologia, de forma que esse vem a ser um fator que leva a acreditar na sua atividade nefropotetora.

Figura 23: Prancha Representativa da fotomicrografia do córtex renal e espaço de Bowman.



Legenda: (A) Grupo Sham; (B) Grupo I/R; (C) Grupo I/R + Bis. Os animais apresentaram alterações como congestão vascular (estrelas) e depósito de material protéico intratubular (setas). Coloração de Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Trinocular Motic® BA310. Moticam® Software 2.0.

Figura 24: Prancha Representativa da fotomicrografia da medula renal.



Legenda: (A) Grupo Sham; (B) Grupo I/R; (C) Grupo I/R + Bis. Os animais apresentaram alterações como degradação da arquitetura tubular. Coloração de Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Trinocular Motic® BA310. Moticam® Software 2.0.

4.4 Avaliação de alterações no equilíbrio óxido-redutor no tecido renal

O (-)- α -bisabolol, assim como grande parte dos óleos essenciais e, principalmente daqueles pertencentes ao grupo dos sesquiterpenos, possui propriedades antioxidantes bem descritas, como previamente relatadas neste trabalho. Dessa forma, é possível racionalizar que, na busca de mecanismos para seu efeito nefroprotetor no modelo de I/R, é de essencial importância realizar o estudo de suas influências no balanço óxido-redutor.

Sabe-se que a reperfusão, apesar de necessária, possui o contraponto de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a peroxidação da membrana celular fosfolipídica ao se restabelecer o aporte sanguíneo a um tecido previamente isquêmico; o que gera inúmeros questionamentos de como seria possível reverter o *status* isquêmico diminuindo tais efeitos deletérios sobre o tecido.

Dessa forma, em ciência desses fatos, decidimos estudar a influência da indução de LRA por I/R no equilíbrio redox no tecido renal, assim como possíveis alterações neste equilíbrio em animais tratados com o Bisabolol. Portanto, utilizamos duas técnicas, a aferição da peroxidação lipídica através do ensaio de TBARS e a avaliação do equilíbrio redox pelo ensaio da glutatona diretamente no tecido renal coletado no procedimento cirúrgico.

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), representadas principalmente pelo malondialdeído (MDA), estão representadas na figura 29. Com isso, o que se observa é um aumento na peroxidação lipídica relativa ao tecido renal coletado dos animais do grupo I/R, reforçando a hipótese do envolvimento da formação de ERO na patofisiologia da LRA pré-renal. O tratamento com o Bisabolol diminuiu comparativamente a presença de MDA nos rins do grupo I/R + Bis, levando a acreditar que seu mecanismo de ação pode estar relacionado a efeitos teciduais diretos.

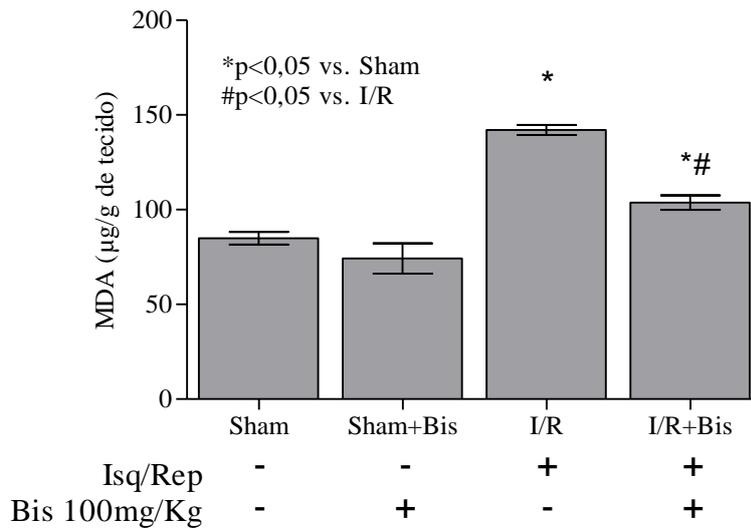
Nesse contexto, sabendo-se que o ensaio de dosagem da glutatona reduzida (γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) é uma ferramenta utilizada para avaliar desequilíbrio redox em tecidos vivos, convém estudar o possível envolvimento deste marcador no estabelecimento da LRA por I/R além do estudo do Bisabolol como uma molécula com potencial nefroprotetor.

Contudo, ao se observar a figura 30, ratificam-se os achados no ensaio de TBARS, quando o Bisabolol aumenta os níveis da substância antioxidante GSH em contrapartida da diminuição causada pelo procedimento de indução no grupo I/R. Reforçando a idéia de que a

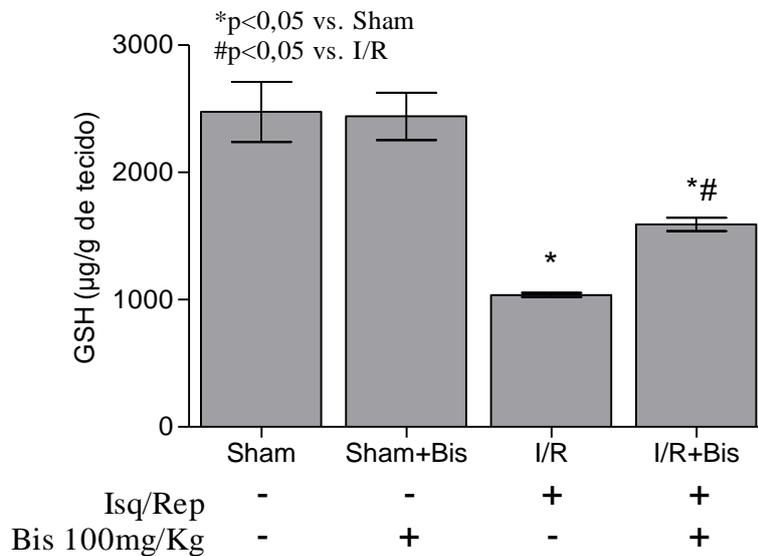
proteção contra a progressão da LRA se dá por efeitos diretos, ou seja, pela presença do Bisabolol ou de seus metabólitos no tecido, equilibrando o potencial redox.

Os dados numéricos referentes às dosagens de MDA e GSH estão contidos na tabela 7.

Figura 25: Níveis teciduais de MDA.



Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como razão de massa de MDA por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Figura 26: Níveis teciduais de GSH.

Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como razão de massa de GSH por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Tabela 7: Dosagens de MDA e GSH.

Grupos	MDA (µg/g tecido)	GSH (µg/g tecido)
Sham	84,88 \pm 3,36	2475 \pm 236,6
Sham + Bis	74,19 \pm 8,02	2441 \pm 186,2
I/R	142 \pm 2,67	1037 \pm 15,71
I/R + Bis	103,8 \pm 3,85	1591 \pm 51,96

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM.

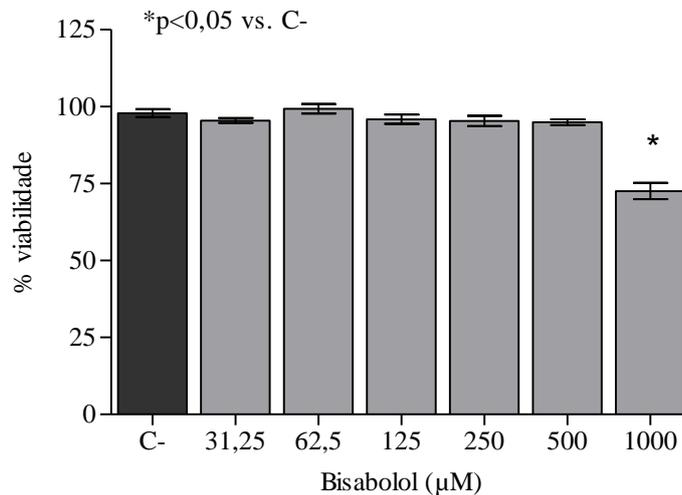
4.5 Cultura de células renais e viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular visam objetivamente mensurar o percentual de células vivas (viáveis) comparadas com o controle após a exposição de uma concentração conhecida de células a uma condição adversa (produtos químicos ou estresse físico, por

exemplo). Neste trabalho foi realizado o teste de redução do MTT, o qual visa estudar, mesmo que de forma indireta, a eficiência da respiração celular.

Como demonstrado na figura 31, com o objetivo de determinar as concentrações de Bisabolol sem efeitos tóxicos, as células LLC-MK2 em condições ideais de cultivo foram tratadas com Bisabolol em concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μM), demonstrando que somente a maior concentração apresenta efeitos tóxicos; nas demais concentrações não houve alteração significativa na viabilidade, indicando que não há efeitos tóxicos nestas.

Figura 27: Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol.

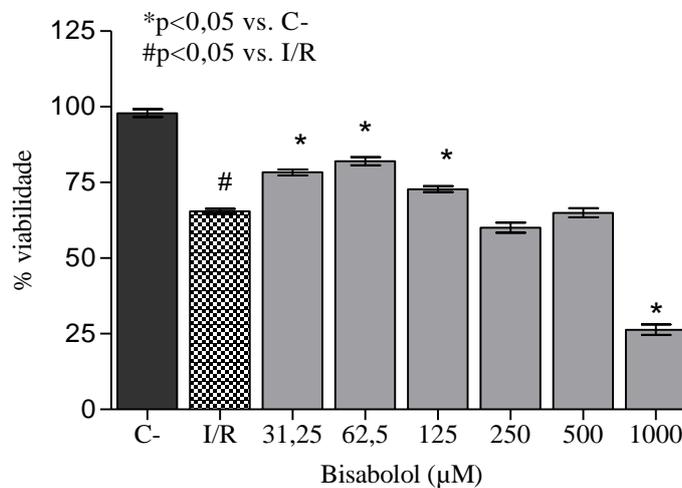


Os experimentos foram realizados com $n=6$, e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Conhecendo a faixa de concentração de trabalho, as células foram submetidas às condições de I/R *in vitro* pelo método da câmara anaeróbica e tratadas com o Bisabolol a fim de avaliar efeitos protetores diretos através do aumento no percentual de viabilidade celular. Na figura 32 o grupo controle (C-) representa a totalidade no percentual de viabilidade, ou seja, as células mantidas em condições de aerobiose. Uma vez que o cultivo foi submetido ao procedimento de I/R sem o tratamento com Bisabolol, obtém-se o efeito do modelo sobre a linhagem celular (grupo I/R), o qual reduz a viabilidade para aproximadamente 65% (Tabela 8).

As células foram submetidas ao modelo da câmara anaeróbica com posterior tratamento com Bisabolol dentro da faixa de concentração avaliada como não tóxica para LLC-MK2. Foi observado que o perfil de ausência de toxicidade foi mantido nas concentrações estudadas e, sobretudo, nas três menores concentrações (31,25; 62,5 e 125 μM) houve um aumento no percentual de vida, indicando um efeito protetor direto.

Figura 28: Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol



Os experimentos foram realizados com $n=6$, e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $*p<0,05$ vs. grupo controle.

Tabela 8: Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).

	Bisabolol (μM)							
	C-	I/R	31,25	62,5	125	250	500	1000
Viabilidade Celular (%)	97,9 \pm 1,3	65,5 \pm 0,8	78,3 \pm 0,9	82,1 \pm 1,3	72,8 \pm 1,0	60,1 \pm 1,7	65,0 \pm 1,5	26,3 \pm 1,7

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM.

Como já é descrito na literatura e demonstrado nos resultados deste trabalho, a lesão por I/R tem um caráter oxidativo e, além disso, os efeitos biológicos do Bisabolol são relacionados com efeitos antioxidantes. Dessa forma, no sentido de correlacionar os estudos *in vivo* e *in vitro*, buscou-se estudar o envolvimento deste equilíbrio redox no modelo de I/R através dos ensaios mais específicos de citometria de fluxo.

4.6 Ensaios de respiração celular por citometria de fluxo

A LRA, de forma especial aquela gerada por I/R, ocorre quando o processo de respiração celular não acontece de maneira eficaz, visto que há ausência de oxigenação adequada para suprir as necessidades teciduais. Uma vez que haja o processo de reperfusão, o tecido que anteriormente estava isquêmico e, conseqüentemente ávido por oxigênio, receberá o aporte respiratório e, de forma genérica, essa avidéz levará a geração de ERO, as quais podem levar a um desequilíbrio redox e a danos teciduais.

Portanto, a técnica de citometria de fluxo foi utilizada para mensurar a geração de ERO através da técnica do DCF e a eficiência da respiração celular avaliada pela técnica do potencial mitocondrial utilizando o corante Rodamina.

4.6.1 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

Objetivando analisar a produção de ERO individualmente em cada célula em cultivo através da técnica de citometria de fluxo, foi utilizada a técnica de DCF-DA. O DCFH-DA é um composto não fluorescente que dentro da célula forma a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde a qual pode ser mensuradas por receptores de fluorescência (FL1).

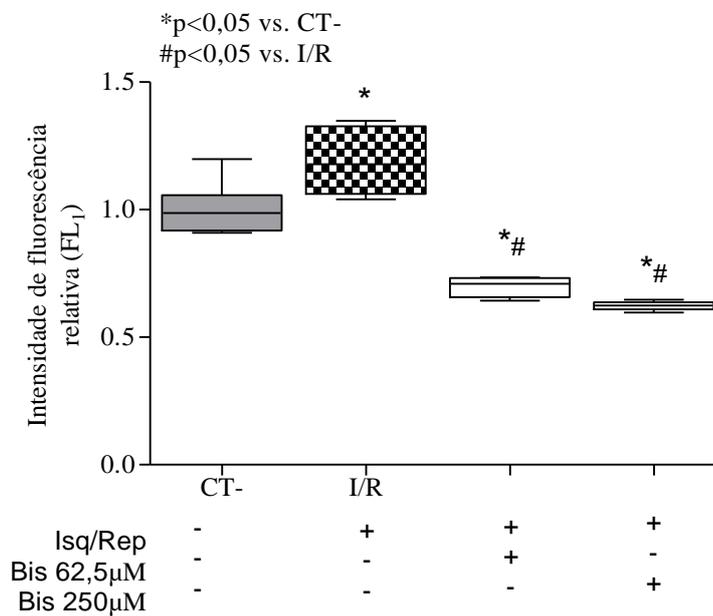
Dessa forma, foram escolhidas duas concentrações de (-)- α - Bisbolol, as quais não deveriam apresentar toxicidade na linha celular e, além disso, ser dotadas de atividade protetora, ou seja, que tenham aumentado significativamente a viabilidade nos poços em relação ao grupo I/R. Logo, decidimos utilizar as concentrações de 250 e 62,5 μ M para os ensaios de citometria de fluxo.

Quando feitas as análises, foi possível perceber que as mudanças foram estatisticamente significantes quando se compara o controle negativo com as células que foram submetidas ao modelo da câmara anaeróbica, ou seja, o aumento da detecção de

DCFoxi indica que houve aumento da produção de ERO. Adicionalmente, nos grupos tratados com Bisabolol, a detecção de fluorescência relacionada à produção de ERO diminuiu significativamente, resultados concordantes com a dosagem de MDA e GSH.

A análise quantitativa pode ser observada na figura 33 e tabela 9. Nas figuras 34 e 35 estão representados os histogramas relacionados à análise qualitativa do DCF-DA nas concentrações de 250 e 62,5 μM , respectivamente.

Figura 29: Análise da produção de ERO pela técnica de DCF-DA.



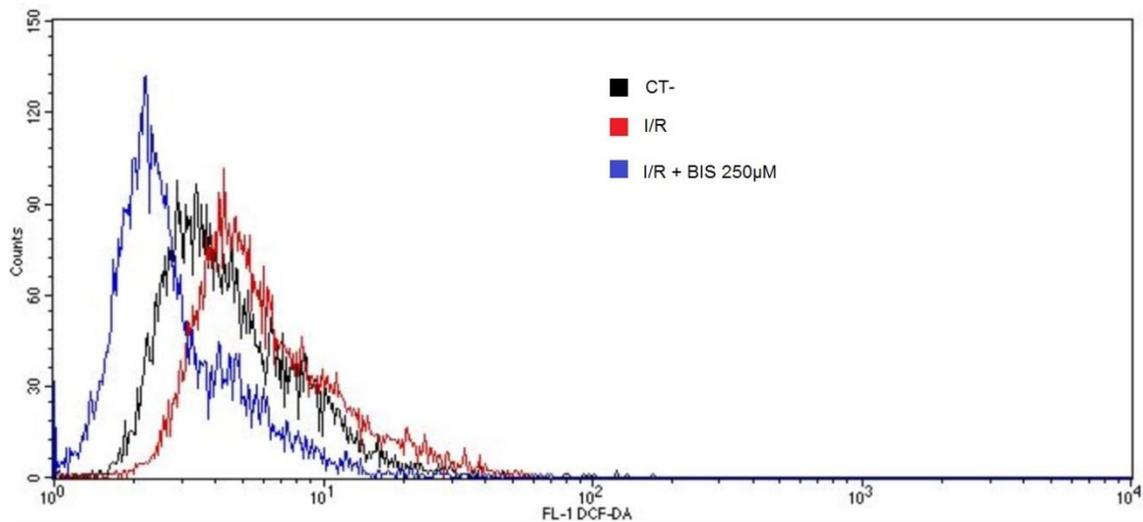
No gráfico estão representados o grupo controle, I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM). Os experimentos foram realizados com $n=6$, e os dados expressos como razão de fluorescência relativa ao controle \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $*p<0,05$ vs. grupo controle.

Tabela 9: Análise da produção de ERO pela técnica de DCF-DA.

	Bisabolol (μM)			
	CT-	I/R	62,5	250
Intensidade de Fluorescência Relativa	$1,0 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,04$	$0,69 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,005$

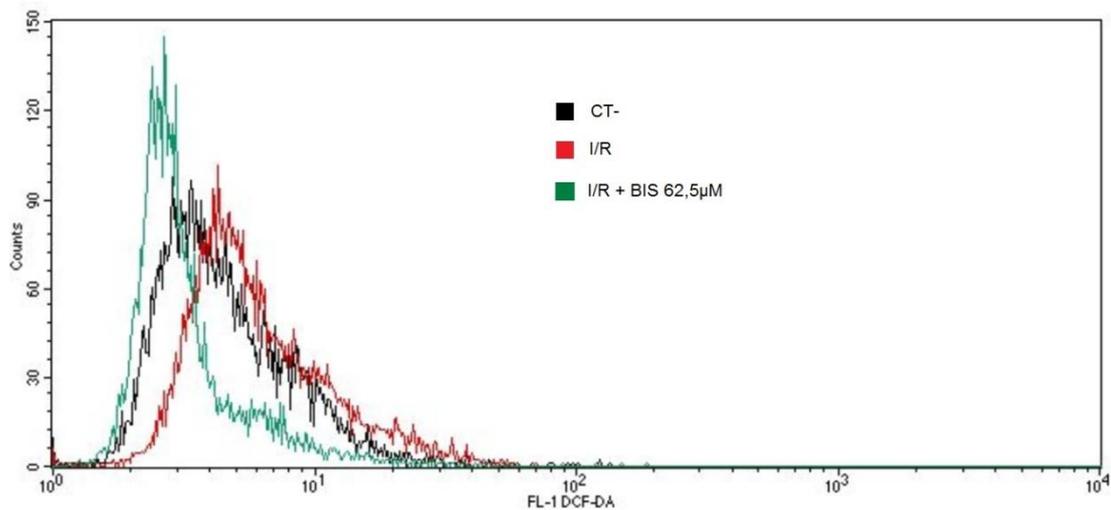
Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM.

Figura 30: Histograma representativo da formação de ERO pela técnica de DCF-DA.



Estão apresentados o grupo controle, I/R e tratado com Bisabolol 250 µM. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Figura 31: Histograma representativo da formação de ERO pela técnica de DCF-DA.

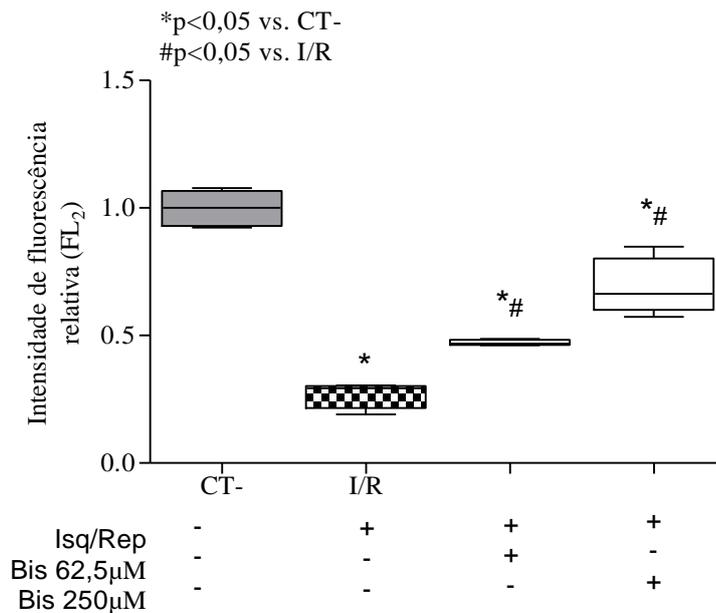


Estão apresentados o grupo controle, I/R e tratado com Bisabolol 62,5 µM. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

4.6.2 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial

O corante Rodamina 123 (Rho 123) é um corante capaz de revelar mitocôndrias de células viáveis avaliando o potencial mitocondrial. Células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R pelo método da câmara anaeróbica tiveram a fluorescência relativa diminuída em relação ao controle, como mostrado na figura 36 e tabela 10. O tratamento com Bisabolol mostrou-se capaz de aumentar a fluorescência de forma significativa em relação ao grupo I/R. Além disso, o aumento na fluorescência relativa no tratamento de 250 μM foi mais representável que no grupo tratado com Bisabolol a 62,5 μM , reforçando a hipótese de que os danos existentes na LRA são de cunho oxidativo. Nas figuras 37 e 38 estão representados os histogramas relativos ao tratamento nas respectivas concentrações.

Figura 32: Análise da respiração celular pela uso do corante de rodamina.

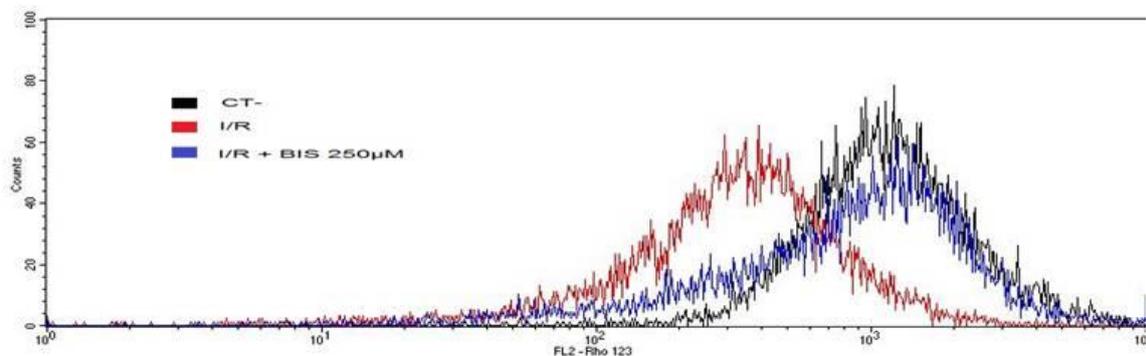


No gráfico estão representados o grupo controle, I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM). Os experimentos foram realizados com $n=6$, e os dados expressos como razão de fluorescência relativa ao controle \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

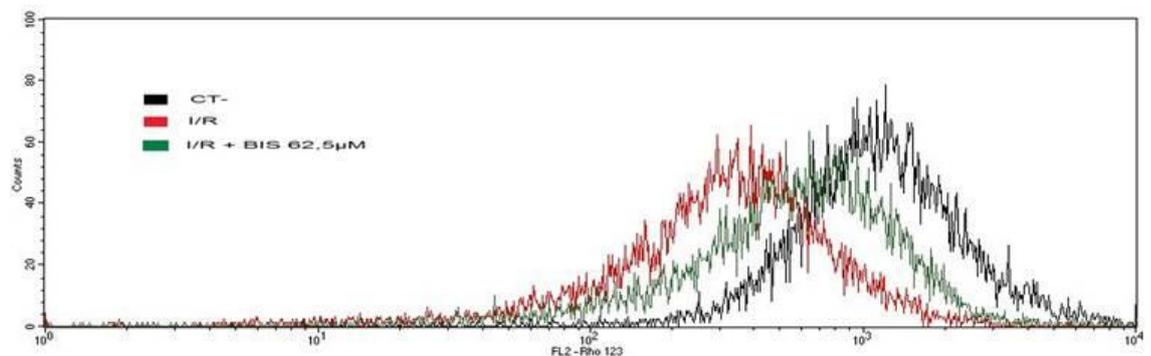
Tabela 10: Análise da respiração celular pela uso do corante de rodamina.

	Bisabolol (μM)			
	CT-	I/R	62,5	250
Intensidade de Fluorescência Relativa	$1,0 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,005$	$0,69 \pm 0,04$

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM.

Figura 33: Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial pela utilização do corante de rodamina.

Estão apresentados o grupo controle, I/R e tratado com Bisabolol 250 μM . Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Figura 34: Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial pela utilização do corante de rodamina.

Estão apresentados o grupo controle, I/R e tratado com Bisabolol 62,5 μM . Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A lesão renal por isquemia/reperfusão (I/R) é um processo fisiopatológico complexo que ocorre em vários contextos, como parada cardíaca com recuperação, transplante de rim, heminefrectomia e cirurgia vascular, e é uma causa comum de morte celular e falência renal, além de disfunção e rejeição do enxerto renal (MENKE *et al.*, 2014). Os mecanismos subjacentes aos danos renais costumam ser multifatoriais e interdependentes, envolvendo hipóxia, danos por estresse oxidativo e resposta inflamatória (DITONNO *et al.*, 2014; KADKHODAEI *et al.*, 2014). Devido à importância e relevância das intercorrências resultantes desta injúria, há uma necessidade incipiente para a descoberta de novas drogas capazes de proteger o rim de este tipo de lesão. Assim, decidimos investigar o efeito nefroprotetor de bisabolol, em modelos tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, de LRA.

O modelo experimental utilizado neste estudo tem o objetivo de mimetizar de maneira confiável e reprodutível o dano causado pelo processo de I/R. Nós avaliamos a potencialidade do bisabolol como um agente nefroprotetor, avaliando parâmetros metabólicos, morfológicos e laboratoriais. Assim, este estudo demonstrou que o tratamento com (-)- α -bisabolol atenua a IRA mediada por I/R, refletindo sobre biomarcadores renais, destacadamente a KIM-1.

Quando submetidos ao procedimento cirúrgico para indução de I/R, os animais apresentaram diversas alterações biológicas, incluindo diminuição da diurese e da ingestão de água. Não foi possível estabelecer com fidedignidade qual evento caracterizaria o início do processo de LRA, no entanto, é possível afirmar que eles estão correlacionados entre si e com os eventos iniciais encontrados no estabelecimento da lesão. Estas alterações foram completamente restauradas pelo tratamento com o bisabolol. Além disso, bisabolol também inverteu o aumento da osmolalidade urinária (Uosm) induzida por I / R.

A osmolalidade urinária, a saber, é descrita como o padrão ouro na avaliação da capacidade de concentração de urina, a qual é uma ferramenta valiosa para a avaliação da função renal em condições clínicas distintas, tais como a doença renal aguda ou crônica. Estudos indicam que valores elevados de Uosm estão associados ao LRA pré-renal (KIDGO, 2015; GARCÍA-NIETO *et al.*, 2014), devido a alterações no volume de urina produzida.

Por definição, a osmolalidade nada mais é do que a medida do número de partículas osmoticamente ativas do soluto que estão presentes em uma determinada massa de solução (KIDGO, 2015), portanto, pode ser utilizada como uma ferramenta essencial na abordagem em estudos que envolvem a função renal, principalmente porque esta vem a auxiliar na determinação de modificações na composição urinária decorrente de diversos processos, principalmente no que tange a concentração de eletrólitos e modificações na absorção de água (BROWN, 2003).

A medula é a região do rim responsável pela geração de urina concentrada; desta forma, para haver uma manutenção da concentração urinária, o líquido contido na luz tubular precisa estar exposto a pressões osmóticas e oncóticas positivas. Essas pressões são resultantes do estabelecimento do interstício medular hipertônico gerado pelo funcionamento dos segmentos de nefrôns localizados nas alças de Henle, os quais serão responsáveis, adicionalmente à funcionalidade dos túbulos proximais, pela reabsorção seletiva de um percentual significativo de eletrólitos e, além disso, os ductos coletores devem ser permeáveis à água para realizar seu transporte favorecido pelo gradiente de solutos (STEPHENSON, 1972; GUYTON & HALL, 2011). Considerando que a hipertonicidade medular também é responsável por manter o equilíbrio eletrolítico estabelecido na reabsorção tubular, vários autores mostram que as alterações na capacidade de concentração poderiam estar relacionadas com a função tubular, através da expressão de canais de água, conhecidos como aquaporinas (BROWN, 2003; COMBET *et al.*, 2008), assim como de transportadores de eletrólitos, principalmente de sódio (AMLAL *et al.*, 2003).

Portanto, é possível sugerir que o modelo *in vivo* de I/R causa alterações renais e que o Bisabolol possui um potencial efeito relacionado com a melhora da LRA. No sentido de se investigar possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos nestas observações, foram coletadas amostras de sangue e urina para avaliar as características de modificações funcionais decorrentes da injúria, estudar marcadores auxiliares no diagnóstico e tratamento precoces da LRA, assim como diminuir os danos relacionados ao estabelecimento da lesão em longo prazo e, sobretudo, avaliar diretamente a influência da administração do (-)- α -Bisabolol sobre tais alterações.

Análises de amostras de urina e de sangue mostraram alterações nos parâmetros bioquímicos tradicionais após I/R. Foi observado um aumento na creatinina, uréia e ácido úrico plasmáticos. Além disso, houve uma diminuição do *clearance* de creatinina.

Em contraste, animais submetidos a I/R tratados com (-)- α -bisabolol tiveram as alterações funcionais parcialmente revertidas.

O acúmulo sanguíneo de substâncias nitrogenadas é descrito como preditor laboratorial de insuficiência da função renal, sendo uréia e creatinina os parâmetros bioquímicos mais utilizados em avaliações clínicas (DEVARAJAN, 2011). Entretanto, apesar da ampla utilização destes marcadores no diagnóstico e acompanhamento de doenças renais, especialmente da LRA, estes apresentam baixa sensibilidade e especificidade, principalmente no diagnóstico em estados iniciais da injúria (BELLOMO *et al.*, 2004). Estudos apontam que a creatinina plasmática mantém-se dentro dos níveis normais, quando até 50% da função renal já está prejudicada, não possuindo, assim, a característica de um marcador precoce (BELLOMO *et al.*, 2012; NGUYEN *et al.*, 2008).

A determinação laboratorial dos níveis plasmáticos de uréia, ou seja, a uremia, avalia, de forma indireta, a eficiência da função renal e, sobretudo do funcionamento adequado do néfron, principalmente a nível tubular. A uréia é um composto formado a partir da detoxificação da amônia resultante do metabolismo muscular e excretada na urina; logo, a eficiência na sua eliminação pode estar diretamente relacionada a um funcionamento adequado dos rins (GUYTON & HALL, 2011; BAYNES, 2015).

Além da questão da sensibilidade, a especificidade dos testes bioquímicos é outro fator o qual deve ser considerado ao interpretar a função renal a partir deles. Tanto a uréia quanto a creatinina, por exemplo, não são produzidas constantemente durante o dia e as suas concentrações sanguíneas podem variar com a ingestão protéica, sangramento gastrointestinal e o uso de alguns medicamentos, como, por exemplo, os corticosteróides. Ressalta-se também que a produção pode diminuir na vigência de condições tais como a insuficiência hepática e a desnutrição (BASTOS *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2008).

Durante muito tempo, o *clearance*, ou a depuração da creatinina em urina de 24 horas foi considerado o melhor método de determinação da TFG na prática clínica (DA COSTA *et al.*, 2003). A depuração da creatinina é diretamente proporcional à geração de creatinina e inversamente proporcional à sua concentração sanguínea, diminuindo a influência do volume de urina produzida e do consumo de água nos valores absolutos de creatinina urinária (DA COSTA *et al.*, 2003; DEVARAJAN, 2006). Contudo, conceitualmente, a depuração da creatinina não preenche os critérios de um marcador ideal da TFG, pois, além de filtrada, a creatinina também é secretada pelo túbulo

contornado proximal. Assim, a depuração da creatinina superestima a TFG. Esta superestimativa - expressa como porcentagem da TFG - é mais pronunciada para valores menores da TFG, podendo chegar a 15%-25% (STEVENS *et al.*, 2006; BAYNES, 2015). Um segundo problema da depuração da creatinina é a necessidade de coleta de urina pelo período de 24 horas, o que, nos extremos da vida, pode ser difícil pela ocorrência de incompreensão (como nas crianças) e déficit cognitivo ou incontinência urinária ou ambos (como nos idosos). A vantagem da depuração da creatinina sobre a depuração das substâncias padrão ouro é o fato de ser a creatinina de produção endógena, sua determinação é de baixo custo e é realizada na maioria dos laboratórios de análises clínicas (STEVENS *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007).

Neste estudo, foi demonstrado que o tratamento com Bisabolol foi capaz de reverter parcialmente a redução da depuração, ou *clearance* da creatinina induzida pela lesão induzida por I/R, indicando que ele possui efeitos sobre a taxa de filtração glomerular.

No sentido de avaliar a capacidade de secreção tubular e seu respectivo funcionamento, foram realizadas as dosagens dos níveis de ácido úrico plasmático, uma vez que este é secretado diretamente nos túbulos proximais. Os níveis elevados de ácido úrico no plasma estão associados a muitas lesões tubulares, incluindo necrose tubular aguda (DA COSTA *et al.*, 2003; BAYNES, 2015; GUYTON & HALL, 2011). Sendo assim, foi observado que o tratamento com o Bisabolol reverteu completamente o aumento dos níveis de ácido úrico observado no grupo I/R, sugerindo que o seu mecanismo de ação pode estar associado a efeitos nos túbulos renais.

Sob a observação de que o dano da LRA por I/R, principalmente no presente modelo, apresenta um envolvimento tubular bastante pronunciado, foi mensurada a excreção de eletrólitos, uma vez que a reabsorção destes eletrólitos a partir da luz tubular se dá principalmente por proteínas transportadoras localizadas nos túbulos contorcidos proximais (DA COSTA *et al.*, 2015; KATZUNG, 2014; GUYTON & HALL, 2011). Sugere-se, assim, que a lesão por I/R reflete-se em um fenômeno de hiper-concentração urinária, como verificado pelo aumento da fração de excreção de sódio (FeNa^+), potássio (FEK^+) e cloreto (FeCl^-). Esses dados corroboram com a aferição da U_{osm} , fortalecendo a hipótese de que a injúria da I/R tem como consequência a oligúria com aumento da concentração urinária dos metabólitos (GUYTON & HALL, 2011).

A organização internacional KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) sugere que a taxa de filtração glomerular (TFG) é o melhor índice de avaliação da função renal, sendo a estimativa de TFG à base de creatinina o mais frequentemente utilizado (BELLOMO *et al.*, 2012). Entretanto, a medição da albuminúria é essencial quando se pretende definir a fase da doença renal, seja ela aguda ou crônica, uma vez que a parede do capilar glomerular, quando intacta, dificulta a passagem de albumina e outras proteínas do soro para o espaço de Bowman (BELLOMO *et al.*, 2004).

A albumina é excretada na urina em quantidade contínua, e encontra-se aumentada em alguns casos, como na presença de diabetes *mellitus* entre outras patologias que podem comprometer a função renal, sobretudo glomerular. A microalbuminúria tem sido tradicionalmente definida como excreção de albumina urinária de 20 a 200 µg/min, correspondendo a 30 a 300 mg/24h (GRIPPA, 2002), ou alternativamente, pela relação albumina/creatinina de 30 a 300 µg/mg (10–25 mg/mmol) (DONNELLY *et al.*, 2003). Sendo assim, o extravasamento de albumina pela membrana glomerular pode ser um marcador de mudanças hemodinâmicas que conduzem a elevação na pressão intraglomerular (LEVEY *et al.*, 2015; STEPHENSON, 1972).

O filtro glomerular (membrana basal) normal é extremamente delicado e permite a passagem apenas de peptídeos e proteínas de baixo peso molecular (geralmente inferior a 10 kDa) que são prontamente reabsorvidas nas primeiras porções do túbulo contornado proximal (LEVEY *et al.*, 2015; DONNELLY *et al.*, 2003). A albumina tem peso molecular por volta de 60 kDa e, portanto, não deve ser filtrada. A diminuta quantidade de albumina filtrada é também reabsorvida, de tal forma que o rim normal não deve perder albumina (BAYNES, 2015; GUYTON & HALL, 2011).

No presente trabalho, o grupo tratado com Bisabolol (I/R + Bis), após o tratamento, teve os níveis de proteínas urinárias estatisticamente normalizados quando comparados com o Sham, o que sugere uma reversão ou regressão da lesão através de mecanismos nefroprotetores. No entanto, o tratamento levou a uma discreta diminuição de microalbuminúria, de forma parcial. Este achado é consistente, uma vez que a microalbuminúria é considerada mais sensível e capaz de detectar lesões residuais não detectáveis pelos ensaios bioquímicos anteriormente descritos.

Sendo assim, torna-se evidente a necessidade da pesquisa de marcadores de caráter prognóstico cada vez mais sensíveis e específicos de lesão renal, com o objetivo

de avaliar a persistência e a gravidade desta lesão (DEVERAJAN 2011). Nesse contexto, no presente estudo, decidiu-se avaliar o KIM-1 como um novo biomarcador no modelo de IRA e seus níveis nos animais tratados com bisabolol.

KIM-1, também conhecido como receptor de imunoglobulina e mucina de células T (TIM-1), é uma glicoproteína (90 kDa) transmembrana com um domínio externo clivável localizado na membrana apical de túbulos com lesão aguda e crônica o qual é praticamente indetectável no rim normal e é um biomarcador precoce de lesão renal, especialmente de células tubulares proximais lesadas (DEVERAJAN, 2011; LAHOUD *et al.*, 2015). Os níveis urinários de KIM-1 têm sido documentados como intimamente relacionados com os níveis de KIM-1 no tecido renal e, dessa forma, sua dosagem tem sido associada a danos nos tecidos do rim (HAN *et al.*, 2002; LIANGOS *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi observado um aumento estatisticamente significativo de KIM-1 em animais submetidos a I/R, quando comparados com Sham. Este resultado indica que o KIM-1 é um marcador promissor para detectar lesão renal, neste caso induzida por I/R. Além disso, mostramos que o KIM-1 foi suficientemente sensível para avaliar o efeito nefroprotetor induzida pelo bisabolol neste modelo.

Os resultados encontrados corroboram com dados da literatura (VAIDYA *et al.*, 2006; VAIDYA *et al.*, 2008). Um pequeno estudo em seis pacientes com necrose tubular aguda (NTA) mostrou a expressão de KIM-1 através de imuno-histoquímica na biópsia renal (DE BORST *et al.*, 2007). Outro estudo de grande relevância demonstra a dosagem de KIM-1 na urina de 40 pacientes, os dados encontrados revelam níveis mais elevados de KIM-1 em pacientes com NTA isquêmica em comparação com aqueles apresentando nefropatia por contraste, outras formas de LRA, doença renal crônica e controles normais (HAN *et al.*, 2002).

O estudo histopatológico das lâminas do tecido renal permitiu confirmar a afirmação gerada a partir dos achados laboratoriais, os quais afirmam que a hipóxia precedente ao dano no processo de I/R é intimamente relacionada ao estabelecimento de lesão em porções do néfron, sobretudo aquelas relacionadas aos túbulos renais como a congestão vascular e marcadamente os depósitos intratubulares de material protéico visivelmente presentes no grupo I/R. O Bisabolol destacou-se nestas condições por mostrar efeitos não somente funcionais, como a melhora nas alterações bioquímicas, mas também uma proteção tecidual direta, na qual uma única administração foi capaz de reverter notadamente alterações morfológicas observadas.

Estes dados são consistentes com estudos anteriores, os quais descrevem que o dano endotelial conduz à constrição das artérias renais, aumentando a produção de agentes vasoconstritores, tais como a adenosina e a endotelina, e diminuição de agentes vasodilatadores, tal como o óxido nítrico e as prostaglandinas (NAJAFI *et al.*, 2014; BONVENTRE, 2003). Além disso, outros autores relatam a deposição protéica intratubular como um parâmetro na análise histopatológica da reversão ou proteção ao processo de LRA por I/R (NAJAFI *et al.*, 2014; DA COSTA *et al.*, 2015).

Sabe-se que o processo isquêmico pode causar lesão tecidual diretamente, como resultado da redução da oxigenação com depleção das reservas de energia celular e consequente acúmulo de metabólitos tóxicos que conduzem à LRA (BUSSMANN *et al.*, 2014; SHIMO *et al.*, 2011). A reperfusão do tecido isquêmico, embora seja necessária como um mecanismo de reparação, tem sido demonstrado que sua ocorrência, na maioria dos casos, pode exacerbar a lesão isquêmica aguda através da geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (DEVARAJAN, 2006).

Nesse contexto, o Bisabolol foi estudado em diferentes modelos como um candidato para o desenvolvimento de novas drogas. Dentre seus efeitos farmacológicos já descritos destacam-se sua atividade gastroprotetora (BEZERRA *et al.*, 2009) anti-inflamatória (MAURYA *et al.*, 2014) e potencial neuroprotetor (DE SIQUEIRA *et al.*, 2012). A maioria destes efeitos está associada ao seu potencial antioxidante (KAMATOU *et al.*, 2010). Conseqüentemente, decidimos investigar parâmetros oxidoredutores objetivando investigar o mecanismo de ação bisabolol em um modelo de I/R.

Dessa forma, o nível de estresse oxidativo no tecido renal foi avaliado através da mensuração do malondialdeído (MDA) e da glutathiona reduzida (GSH). Foi observado um aumento significativo do MDA e uma diminuição de GSH teciduais do grupo I/R, quando comparados com o grupo Sham. Além disso, o tratamento com bisabolol foi capaz de reduzir estas alterações, sugerindo que haja um efeito relacionado a atividades antioxidantes no tecido renal.

Sob condições oxidantes, as moléculas de GSH doam um elétron, formando GSSG. Adicionalmente, a GSSH pode ser reduzida de volta para GSH pela enzima redutase da GSSG (GR). Baixas concentrações de GSH tecidual podem ser interpretadas como evidência de desequilíbrio redox (WU *et al.*, 2004). Neste contexto, estudos demonstram que as substâncias antioxidantes são capazes de atenuar alterações nos níveis de GSH induzidos pela lesão de I/R (DA COSTA *et al.*, 2015; BALLATORI *et al.*, 2009).

Além disso, espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas durante a re-introdução de oxigênio a um tecido previamente isquêmico, resultando em alterações na relação entre fatores pró e antioxidantes (WU *et al.*, 2004; KADKHODAEI *et al.*, 2014). Estudos recentes têm demonstrado que a formação de ERO desempenha um papel na fisiopatologia inicial da LRA. Níveis aumentados de TBARS após isquemia renal têm sido descritos como marcador de estresse oxidativo (KADKHODAEI *et al.*, 2014; NAJAFI *et al.*, 2014). A utilização de substâncias antioxidantes, tais como própolis vermelha (DA COSTA *et al.*, 2015) e extrato de *Tribulus terrestris* (NAJAFI *et al.*, 2014) na melhoria da lesão renal são exemplos de como mecanismos oxidativos podem estar envolvidos em danos renais, sobretudo na LRA.

De acordo com o que foi observado até agora, é possível inferir que os danos a médio e longo prazo relacionados à LRA podem ser relacionados a mecanismos vasculares e a danos teciduais ou celulares diretos (MENKE *et al.*, 2014; DITONNO *et al.*, 2014). Nesse sentido, objetivando estudar melhor os efeitos do Bisabolol, principalmente ao saber que este diminui o desequilíbrio redox nos estudos *in vivo*, decidimos estudar os efeitos citotóxicos e citoprotetores diretos respectivamente do processo de I/R e do tratamento com o Bisabolol.

Então, no intuito de investigar efeitos mais diretos do Bisabolol e estudar a fisiopatologia da injúria por I/R, foram realizados os ensaios de citotoxicidade e avaliação da respiração celular *in vitro*. Para tanto, foi utilizada a linhagem celular de células LLC-MK2, visto que estas são uma linhagem celular imortalizada de túbulos próximos de macacos (*Macaca mulatta*) e são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade, da função renal e de efeitos de fármacos (HULL *et al.*, 1962).

Os ensaios em cultura celular permitem realizar estudos de efeitos diretos de substâncias em cultivos de células. Essas células podem ser provenientes de um cultivo primário, ou seja, obtidas diretamente do tecido animal ou os ensaios podem ser desenvolvidos em linhagens celulares imortalizadas.

Os resultados obtidos e já apresentados no presente estudo, principalmente as dosagens bioquímicas reforçadas pelas alterações na excreção de eletrólitos, a seletividade da KIM-1 pelo túbulo proximal e a indicação de envolvimento de alterações tubulares na análise histológica reafirmam a escolha desta linhagem na investigação dos efeitos renais do Bisabolol.

No ensaio de cultura celular, o (-)- α -bisabolol não apresentou citotoxicidade nas concentrações estudadas. Quando comparado com o grupo controle, as células que foram submetidas ao processo de I/R apresentaram redução significativa no percentual de viabilidade. Além disso, (-)- α -bisabolol foi capaz de reverter parcialmente os danos celulares causados por I/R, com a recuperação da viabilidade. Estes resultados podem ser explicados pela capacidade de regeneração do epitélio tubular após eventos de injúria renal isquêmica ou tóxica, ou seja, o epitélio tubular tem uma potente capacidade para proliferar e substituir as células perdidas (BONVENTRE, 2003).

Dados complementares foram encontrados por um grupo de pesquisadores que induziram hipóxia em células mesangiais, células contráteis de suporte estrutural do glomérulo, as quais, quando submetidas à reperfusão, apresentaram aumento nos níveis citoplasmático de cálcio com conseqüente contração mesangial, resultando numa diminuição da área de filtração glomerular (RAZVICKAS *et al.*, 2013).

Está bem estabelecido que durante a isquemia, a concentração de ATP celular diminui significativamente. Além disso, é bem sabido que a redução no coeficiente ATP/ADP abre canais de potássio sensíveis ao ATP, resultando em hiperpolarização da membrana celular (RAZVICKAS *et al.*, 2013; ZAGER *et al.*, 1985). É neste contexto que se decidiu estudar o envolvimento da I/R no processo de respiração celular e, conseqüentemente do metabolismo energético da célula, utilizando a técnica de citometria de fluxo.

As técnicas de citometria de fluxo permitem estudar alterações existentes em populações de células de forma individual, ou seja, célula a célula e, dessa forma, é possível analisar estatisticamente as alterações existentes de forma mais fidedigna que nos ensaios de viabilidade celular, por exemplo.

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a técnica do DCF-DA é bastante utilizada em ensaios de cultivo celular. Em estudo realizado para avaliar o efeito da hipóxia em células musculares estriadas esqueléticas, percebeu-se através da técnica de DCF que os danos causados estavam relacionados com a produção de ERO e, sobretudo, da despolarização da membrana mitocondrial, diminuindo os níveis de GSH, causando um desequilíbrio na razão GSH/GSSH e também aumentando a produção de MDA (PUNTEL *et al.*, 2011).

Há algum tempo já se sabe que o processo de I/R de diversos tecidos leva à formação de ERO e a danos teciduais. Carlotti e colaboradores, além disso,

correlacionaram a formação de ERO com consequente comprometimento mitocondrial através da utilização da rodamina, como demonstrado neste trabalho (CARLOTTI JUNIOR *et al.*, 2001).

Sabe-se que as ERO podem ser geradas por diversos mecanismos, principalmente pelo sistema NADPH-oxidase e também através da mitocôndria. O processo de hipóxia leva a um desequilíbrio na cadeia respiratória mitocondrial, resultando em acúmulo de elétrons e subsequente formação de ERO, cuja produção excessiva pode levar a danos teciduais diretos, principalmente morte celular programada (MAIANSKI *et al.*, 2004). Portanto, o Bisabolol reverte a lesão por mecanismos diretos sobre as células tubulares ao apresentar uma característica de molécula antioxidante, diminuindo a produção de ERO e restabelecendo a função, ou seja, o potencial da membrana mitocondrial, afetando positivamente a respiração celular e favorecendo a característica de recuperação intrínseca deste tipo de células (BONVENTRE, 2003).

Óleos essenciais e substâncias isoladas a partir deles são bem descritos na literatura como tendo efeitos nefroprotetor (NAJAFI *et al.*, 2014; BOROUSHAKI *et al.*, 2015; AL-GAYYAR *et al.*, 2015). Estas substâncias normalmente têm atividades antioxidantes e hemodinâmicas, o que pode auxiliar ao descrever o seu mecanismo de ação desses compostos. Assim, bisabolol e substâncias similares mostraram os requisitos para ser estudado como ferramentas fisiofarmacológicas para novos substratos nefroprotetores.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O (-)- α -Bisabolol destaca-se como uma molécula com atividade promissora no contexto da dinâmica renal, principalmente por estar envolvida em mecanismos antioxidantes, os quais são essenciais contra o desenvolvimento fisiopatológico da lesão renal. Ademais, por tratar-se de uma substância natural, ratifica-se a relevância de seu estudo e utilização.

Diante do exposto, a KIM-1 mostrou-se como um marcador bioquímico detectável em estados precoces da lesão aguda, fortalecendo o seu uso como critério auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento da progressão ou regressão da lesão tubular. Posteriormente, estes dados podem auxiliar na implantação de sua aferição rotineira na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; BABAZADEH ORTAKAND, D.; MORTON D. W.; YUSOF, A. P.; Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. **J Chromatogr A**. v. 1385, p. 103-110, 2015.
- AL-GAYYAR, M. M.; HASSAN, H. M.; ALYOUSSEF, A.; ABBAS, A.; DARWEISH, M. M.; EL-HAWWARY, A. A. Nigella sativa oil attenuates chronic nephrotoxicity induced by oral sodium nitrite: Effects on tissue fibrosis and apoptosis. **Redox Rep**. 2015.
- AMLAL, H.; WILKE, C. Resistance of mTAL Na⁺-dependent transporters and collecting duct aquaporins to dehydration in 7-month-old rats. **Kidney Int**. v. 64, n. 2, p. 544–554, 2003.
- BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.**, v. 390, p. 191–214, 2009.
- BASS, D. A.; OLBRAND, P.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; McCALL, C.E. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 136-141, 1986
- BASS, D. A.; PARCE, W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P. SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.
- BASTOS, M. G.; BASTOS, R. M. R.; PAULA, R. B. Avaliação da função renal. Em Barros E, Gonçalves LF (Eds). **Nefrologia no consultório**. Artmed, Porto Alegre, 2007, pp 49-67.
- BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H.. **Bioquímica Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **Lancet**. v. 380, n. 9843, p. 756-766, 2012.
- BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A. et al. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs. **Crit Care**. v. 8, n. 4, p. 204-212, 2004.
- BEZERRA, S. B.; LEAL, L. K.; NOGUEIRA, N. A.; CAMPOS, A. R. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP⁺ channels. **J Med Food**. v. 12, n. 6, p. 1403-6, 2009.
- BONEVENTRE, J. V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 43, n. 5, p. 1160-78, 1993.
- BONVENTRE, J. V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. **J Am SocNephrol**. v. 14, n. 1, p. 55–61, 2003.

BOROUSHAKI, M. T.; RAJABIAN, A.; FARZADNIA, M.; HOSEINI, A.; POORLASHKARI, M.; TAGHAVI, A. et al. Protective effect of pomegranate seed oil against cisplatin-induced nephrotoxicity in rat. **Ren Fail.** v. 19, p. 1-6, 2015.

BREITMAIER, E. Terpenes: importance, general structure and biosynthesis. **Terpenes**, v.1, p.19, 2006.

BROWN, D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 284, p. 893-901, 2003.

BRUNKE, E. J.; HAMMAERSCHMIDT, F. J. (1985) Constituents of the essential oil of *Salvia stenophylla*—first identification of the (?) α -bisabolol in nature. In: Svendsen AB, Scheffer JJC (eds) *Essential oils and aromatic plants*. MartinusNijhoff/Dr. Junk W Publishers, Dordrecht, p. 37–43(1985).

BUITRAGO, A.; ROJAS, J.; ROJAS, L.; VELASCO, J.; MORALES, A.; PEÑALOZA, Y.; DÍAZ, C. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Vismia macrophylla* leaves and fruits collected in Táchira-Venezuela. **Nat Prod Commun.** v. 10, n. 2, p. 375-7, 2015.

BUSSMANN, A. R.; MARTON FILHO, M. A.; MÓDOLO, M. P.; MÓDOLO, R. P.; AMADO, P.; DOMINGUES, M. A.; CASTIGLIA, Y. M.; MÓDOLO, N. S. Effect of allopurinol on the kidney function, histology and injury biomarker (NGAL, IL 18) levels in uninephrectomised rats subjected to ischaemia-reperfusion injury. **Acta Cir Bras.** v. 29, n. 8, p. 515-21, 2014.

BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford; Blackwell, 1992.

CHARLTON, J. R.; PORTILLA, D.; OKUSA, M. D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, n. 7, p. 1301-11, 2014.

COMBET, S.; GOURAUD, S.; GOBIN, R. et al. Aquaporin-2 downregulation in kidney medulla of aging rats is posttranscriptional and is abolished by water deprivation. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 294, n. 6, p. 1408–1414, 2008.

DA COSTA, J. A. C.; VIEIRA-NETO, O. M.; NETO, M. M. **Acute Renal Failure**. Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: Urgências e Emergências Nefrológicas. v. 36, p. 307-324, 2003.

DA COSTA, M. F.; LIBÓRIO, A. B.; TELES, F.; MARTINS, C. D. A. S.; SOARES, P. M.; MENESES, G. C. et al. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 22, n. 9, p. 787-95, 2015.

DE BORST, M. H.; VAN TIMMEREN, M. M.; VAIDYA, V. S.; DE BOER, R. A.; VAN DALEN, M. B.; KRAMER, A. B. Induction of kidney injury molecule-1 in homozygous *Ren2* rats is attenuated by blockade of the reninangiotensin system or p38 MAP kinase. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 292, n. 1, p. 313-320, 2007.

DE SIQUEIRA, R. J.; FREIRE, W. B.; VASCONCELOS-SILVA, A. A.; FONSECA-MAGALHÃES, P. A.; LIMA, F. J.; BRITO, T. S.; MOURÃO, L. T.; RIBEIRO, R. A.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. In-vitro characterization of the pharmacological effects induced by (-)- α -

bisabolol in rat smooth muscle preparations. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 90, n. 1, p. 23-35, 2012.

DEVARAJAN, P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. **Curr Opin Pediatr.** v. 23, p. 194–200, 2011.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol.** v. 17, n. 6, p. 1503-20, 2006.

DITONNO, P.; IMPEDOVO, S. V.; PALAZZO, S.; BETTOCCHI, C.; GESUALDO, L.; GRANDALIANO, G.; SELVAGGI, F. P.; BATTAGLIA, M. Effects of ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: risk factors and early and long-term outcomes in a single center. **Transplant Proc.** v. 45, n. 7, p. 2641-4, 2013.

DONNELLY, R. & REA, R., Microalbuminuria: how informative and reliable are individual measurements? **Journal of hypertension**, v. 21, p. 1229–1233, 2003.

ERNANI, L. R.; TELOKEN, C.; SOUTO, C. A. V.; RHODEN, C.; LUCAS, M. L.; BELLO-KLEIN, A. Effects of L-arginine and L-name on renal ischemia-reperfusion in rats. **Braz J Urol.**, v. 27, n.1, p. 78-83, 2001.

FERNANDES, K. P. S.; MAYER, M. P. A.; ANDO, E. S. Inhibition of interferon- γ -induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytolethal distending toxin. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 23, p. 360-366, 2008.

FRIKECHE, J.; COUTEAU, C.; ROUSSAKIS, C.; COIFFARD, L. J. Research on the immunosuppressive activity of ingredients contained in sunscreens. **Arch Dermatol Res.** v. 307, n. 3, p. 211-8, 2015.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrology dialysis transplantation, oxford**, v. 16, n. 11, p. 233-235, 2001.

GARCÍA-NIETO, V.; GONZÁLEZ-CERRATO, S.; LUIS-YANES, M. I.; MONGE-ZAMORANO, M.; REYES-MILLÁN, B. Decreased concentrating capacity in children with febrile urinary tract infection and normal ^{99m}Tc - dimercaptosuccinic acid scan: does medullonephritis exist? **World J Pediatr.** v. 10, n. 2, p. 133-137, 2014.

GAUSH, C. R.; HARD, W. L.; SMITH, T. F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 122, n. 3, p. 931-5, 1966.

GINO, A. K.; BRINDHA, P. Standardization of in vitro Cell-based Model for Renal Ischemia and Reperfusion Injury. **Indian J Pharm Sci.**, v. 76, n. 4, p. 348–353, 2014.

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. **Mech. Ageing Dev.** v. 132, p. 141–148, 2011.

GRIPPA, G. Microalbuminuria in essential hypertension. **Journal of human hypertension**, v. 16, s. 1, p. 74-77, 2002.

Guyton & Hall, Tratado de Fisiologia Médica, 12ª Edição Rio de Janeiro, 2011, Guanabara.

HAHN, S.; KRIEG, R. J. J. R.; HISANO, S.; CHAN, W.; KUEMMERLE, N. B.; SABORIO, P.; CHAN, J. C. Vitamin E suppresses oxidative stress and glomerulosclerosis in rat remnant kidney. **Pediatr Nephrol**, v. 13, n. 3, p. 195-8, 1999.

HAN, W. K.; BAILLY, V.; ABICHANDANI, R.; THADHANI, R.; BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney Int**. v. 62, n. 1, p. 237-44, 2002.

HARBORNE, J. B.; TOMAS-BARBERA, F. A. (1991) **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. Oxford University Press, New York

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 surgical patients. **J Crit Care**. v. 30, n. 1, p. 102-6, 2015.

HOFFMAN, S. B.; MASSARO, A. N.; SOLER-GARCÍA, A. A.; PERAZZO, S.; RAY, P. E. A novel urinary biomarker profile to identify acute kidney injury (AKI) in critically ill neonates: a pilot study. **Pediatr Nephrol**. v. 28, n. 11, p. 2179-88, 2013.

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

HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research. **J Exp Med**. v. 115, p. 903-18, 1962.

HUMPHREYS, B. D.; XU, F.; SABBISSETTI, V.; GRGIC, I.; MOVAHEDI NAINI, S.; WANG, N.; CHEN, G.; XIAO, S.; PATEL, D.; HENDERSON, J. M.; ICHIMURA, T.; MOU, S.; SOEUNG, S.; MCMAHON, A. P.; KUCHROO, V. K.; BONVENTRE, J. V. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. **J Clin Invest**. v. 123, n. 9, p. 4023–4035, 2013.

ICHIMURA, T.; ASSELDONK, E. J.; HUMPHREYS, B. D.; GUNARATNAM, L.; DUFFIELD, J. S.; BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. **J Clin Invest**. v. 118, n. 5, p. 1657–1668, 2008.

JAKOVLEV, V.; ISAAC, O.; THIEMER, K.; KUNDE, R. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. **Planta Med**. v. 35, p. 125–140, 1979.

JAKOVLEV, V.; VON SCHLICHTEGROLL, A. On the inflammation inhibitory effect of (-)-alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil. **Arzneimittelforschung**, v. 19, p. 615–616, 1969.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 77, n. 2, p. 990-4, 1980.

Junior, C. G. C.; Colli, B. O.; Kazuo, J. Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial: modelo experimental. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** v. 59, n. 2, 2001.

KADKHODAEI, M.; NAJAFI, A.; SEIFI, B. Classical and remote post-conditioning effects on ischemia/reperfusion-induced acute oxidant kidney injury. **Int J Surg.** v. 12, n. 11, p. 1162-6, 2014.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. **J Am Oil Chem Soc.** v. 87, p. 1–7, 2010.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica.** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 991 p.

KELLUM, J. A. Acute Kidney Injury. **Crit Care.** v. 36, p. 141-5.2, 2008.

KELLUM, J. A.; LEVIN, N.; BOUMAN, C.; LAMEIRE, N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. **Curr Opin Crit Care.** v. 8, p. 509-14, 2002.

Kidney Disease; Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. Available: http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/KDIGO%20AKI%20Guideline.pdf. Accessed February 5, 2015.

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

KIM, J.; JANG, J. H.; LEE, J. H.; CHOI, J. K.; PARK, W. R.; BAE, I. H.; BAE, J.; PARK, J. W. Enhanced topical delivery of small hydrophilic or lipophilic active agents and epidermal growth factor by fractional radiofrequency microporation. **Pharm Res.** v. 29, n. 7, p. 2017-29, 2012.

LAHOUD, Y.; HUSSEIN, O.; SHALABI, A.; NATIV, O.; AWAD, H.; KHAMAISSI, M. et al. Effects of phosphodiesterase-5 inhibitor on ischemic kidney injury during nephron sparing surgery: quantitative assessment by NGAL and KIM-1. **World J Urol.** v. 33, n. 12, p. 2053-62, 2015.

LEVEY, A. S.; CASSANDRA BECKER, C.; INKER, L. A. Glomerular Filtration Rate and Albuminuria for Detection and Staging of Acute and Chronic Kidney Disease in Adults A Systematic Review. **JAMA.** v. 313, n. 8, p. 837-846, 2015.

LI, P. K. T.; BURDMANN, E. A.; MEHTA, R. L. Acute kidney injury: global health alert. **Kidney International,** v. 83, p. 372-376, 2013.

LIANG, Y.; LIU, H. H.; CHEN, Y. J.; SUN, H. Antitumor activity of the protein and small molecule component fractions from *Agrocybe aegerita* through enhancement of cytokine production. **J Med Food.** v. 17, n. 4, p. 439-46, 2014.

LIANGOS, O.; PERIANAYAGAM, M. C.; VAIDYA, V. S. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. **J Am SocNephrol.** v. 18, p. 904–912, 2007.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J. Neurochem**, v. 69, p. 581-593, 1997.

MAIANSKI, N. A.; GEISLER, J.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S.; ROOS, D.; KUIJPERS, T. W. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. **Cell Death Differ**. v. 11, n. 2, p. 143-53, 2004.

MAKWANA, R.; VENKATASAMY, R.; SPINA, D.; PAGE, C. The effect of phytocannabinoids on airway hyper-responsiveness, airway inflammation, and cough. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 353, n. 1, p. 169-80, 2015.

MASSEY, D. Commentary: clinical diagnostic use of cystatin C. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 18, p. 55-60, 2004.

MAURYA, A. K.; SINGH, M.; DUBEY, V.; SRIVASTAVA, S.; LUQMAN, S.; BAWANKULE, D. U. α -(-)-bisabolol reduces pro-inflammatory cytokine production and ameliorates skin inflammation. **Curr. Pharm. Biotechnol**. v. 15, n. 2, p. 173-81, 2014.

MENKE, J.; SOLLINGER, D.; SCHAMBERGER, B.; HEEMANN, U.; LUTZ, J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. **Curr Opin Organ Transplant**. v. 19, n. 4, p. 395-400, 2014.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. **Biochem Med**. v. 23, n. 3, p. 302-11, 1980.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

NAJAFI, H.; FIROUZIFAR, M. R.; SHAFIAT, O.; CHANGIZIASHTIYANI, S.; HOSSEINI, N. Protective effects of Tribulusterrestris L extract against acute kidney injury induced by reperfusion injury in rats. **Iran J KidneyDis**. v. 8, n. 4, p. 292-8, 2014.

NGUYEN, M.; DEVARAJAN, P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 23, p. 2151-217, 2008.

NIEDERBACHER, B.; WINKLER, J. B.; SCHNITZLER, J. P. Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping.. **J Exp Bot**. v. 66, n. 18, p. 5403-16, 2015.

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

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

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

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

ROBINSON, J. P.; CARTER, W. O.; NARAYANAN, P. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, Funcional assays by flow cytometry. 2. ed. p. 1-1001, 1995.

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

ROTTINI, M. M.; AMARAL, A. C.; FERREIRA, J. L.; SILVA, J. R.; TANIWAKI, N. N.; SOUZA, C. S. In vitro evaluation of (-)- α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **ExpParasitol.**, v. 148, p. 66-72, 2015.

SABBISSETTI, V. S.; WAIKAR, S. S.; ANTOINE, D. J.; SMILES, A.; WANG, C.; RAVISANKAR, A. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes. **J Am SocNephrol**. v. 25, n. 10, p. 2177-86, 2014.

SANTOS, N. O.; MARIANE, B.; LAGO, J. H.; SARTORELLI, P.; ROSA, W.; SOARES, M. G.; DA SILVA, A. M.; LORENZI, H.; VALLIM, M. A.; PASCON, R. C. Assessing the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Brazilian Plants-*Eremanthus erythropappus* (Asteraceae), *Plectrantuns barbatus*, and *P. amboinicus* (Lamiaceae). **Molecules**. v. 20, n. 5, p. 8440-52, 2015.

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

STEPHENSON, J. L. Concentration of urine in a central core model of the renal counterflow system. **Kidney Int**. v. 2, p. 85-94, 1972 .

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

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

VAIDYA, V. S.; RAMIREZ, V.; ICHIMURA, T.; BOBADILLA, N. A.; BONVENTRE, J. V. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. **Am. J. Renal Physiol**. v. 290, n. 2, p. 517-29, 2006.

VAIDYA, V. S.; WAIKAR, S. S.; FERGUSON, M. A.; COLLINGS, F. B.; SUNDERLAND, K.; GIOULES, C. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. **Clin Transl Sci.**, v. 1, n. 3, p. 200-208, 2008.

WINBERG, J. Renal concentration capacity during acute, nonobstructive urinary tract infections in infancy and early childhood. **Acta Paediatr.**, v. 47, p. 635-645, 1958.

WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **J. Nutr.** v. 134, p. 489-492, 2004.

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

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

ZAGER, R. A.; JURKOWITZ, M. S.; MEROLA, A. J. Responses of the normal rat kidney to sequential ischemic events. **Am J Physiol.** v. 249, p. 148-59, 1985.

ZARGARAN, A.; BORHANI-HAGHIGHI, A.; FARIDI, P.; DANESHAMOUZ, S.; KORDAFSHARI, G.; MOHAGHEGHZADEH, A. Potential effect and mechanism of action of topical chamomile (*Matricariachammomila* L.) oil on migraine headache: A medical hypothesis. **MedHypotheses.** v. 83, n. 5, p. 566-9, 2014.