



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

TIAGO LIMA SAMPAIO

**ENVOLVIMENTO DA ENZIMA NAPHOXIDASE NO EFEITO
NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL EM UM MODELO DE LESÃO
RENAL AGUDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO *in vitro*.**

FORTALEZA

2018

TIAGO LIMA SAMPAIO

ENVOLVIMENTO DA ENZIMA NADPH-OXIDASE NO EFEITO
NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL EM UM MODELO DE LESÃO RENAL
AGUDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO *in vitro*.

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

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

FORTALEZA

2018

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

- S186e Sampaio, Tiago Lima.
Efeito nefroprotetor do (-)-alfa-Bisabolol em um modelo de lesão renal aguda por isquemia-reperfusão in vitro : envolvimento da enzima NADPH-oxidase / Tiago Lima Sampaio. – 2018.
102 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
1. Isquemia. 2. Reperfusão. 3. NADPH oxidase. 4. NOX4. I. Título.

CDD 615.1

TIAGO LIMA SAMPAIO

**ENVOLVIMENTO DA ENZIMA NADPH-OXIDASE NO EFEITO
NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL EM UM MODELO DE LESÃO
RENAL AGUDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO *in vitro*.**

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

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

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

Profª. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profª. Dra. Roberta Jeanne Bezerra Jorge
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gustavo José da Silva Pereira
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profª. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Minha alucinação é suportar o dia-a-dia, e o meu delírio é a experiência com coisas reais. Amar e cultivar as coisas me interessa muito mais...”

Belchior

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pai todo poderoso, que foi minha força, motivação e alicerce durante todas as caminhadas que resolvi trilhar na minha vida.

A minha mãe, amiga e companheira, Leda, por ter sido a representação de paciência, amor e cuidado.

Ao meu pai, Francisco, por me ensinar que o trabalho dignifica o homem e me mostrar que o estudo árduo é o único caminho válido.

Ao meu irmão, Matheus, por ser um grande amigo de todas as horas e me encher de orgulho por ser um homem tão íntegro e inteligente.

Ao Ramon, companhia de todas as horas, no pessoal e no intelectual. Sua personalidade e seu profissionalismo me inspiram.

A minha orientadora, professora Alice Martins, a qual há algum tempo me acolheu e foi uma base para meu crescimento. Agradeço pelos ensinamentos e pela confiança que sempre deposita em mim.

A minha família, de forma geral, que de tão grande não vou citar nomes, mas que sempre me apoia e me impulsiona.

Ao Tigrón, o gato mais humano que eu conheço, companhia ativa nas madrugadas de estudo, preparação de aulas e na escrita desse trabalho.

A todos os meus amigos, em especial Renata e Ederson, pelo amor e pela confiança mútua. As brincadeiras e as fotos na academia foram um combustível para minha alma.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais, pelo companheirismo, pelo aprendizado mútuo, pela amizade e pela confiança.

Aos colegas professores da FAMETRO, que mais que companheiros de trabalho, se tornaram uma grande família para mim. Em especial minhas queridas Suzana, Ticiania, Andrea e Nívia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela promoção do meu crescimento pessoal e intelectual.

A todos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC pelo acolhimento e ajuda em diversas etapas da realização desse doutorado.

A Universidade Federal do Ceará, a qual me recebeu há alguns anos como um menino e agora me lança ao mundo como um Doutor.

A todos que contribuíram, torceram e acompanharam de alguma forma nessa caminhada, meu **MUITO OBRIGADO!!**

RESUMO

Envolvimento da enzima NADPH-oxidase no efeito nefroprotetor do (-)-alfa-Bisabolol em um modelo de lesão renal aguda por isquemia-reperfusão *in vitro*.

A Lesão Renal Aguda (LRA) está associada a alta morbidade e mortalidade, gerando custos de saúde pública. Isquemia e reperfusão (I/R) são eventos que frequentemente levam à LRA por hipóxia tecidual, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), estresse oxidativo e morte celular programada por apoptose. Anteriormente, demonstramos o potencial nefroprotetor do (-)- α -Bisabolol, um sesquiterpeno monocíclico insaturado de flores de camomila. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o mecanismo de nefroproteção mediada pelo Bisabolol em células renais tubulares humanas após indução de I/R em um modelo *in vitro*. Adicionalmente, este trabalho pretende analisar o envolvimento de ERO gerados por NOX4 na lesão e recuperação celular. Células HK2 foram expostas a condições de I/R e tratadas com Bisabolol em várias concentrações. A viabilidade celular foi realizada pelo ensaio MTT. Células tratadas e não tratadas foram submetidas à citometria de fluxo para avaliar células necróticas/apoptóticas, produção de ERO e o potencial transmembrânico mitocondrial. TBARS e GSH foram utilizados como parâmetros do balanço redox. Além disso, os níveis de KIM-1 liberados no sobrenadante foram medidos por ELISA. A fim de identificar uma interação entre Bisabolol e NOX4, foram realizados ensaios de *docking* molecular e enzimáticos *in vitro*. A expressão da isoforma NOX4 em células tratadas foi avaliada por "Western-blot". Finalmente, as células foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. O Bisabolol melhorou a viabilidade celular e preveniu a morte celular por apoptose, indicada também pela diminuição dos níveis de KIM-1 no sobrenadante celular. Foi observada uma diminuição na produção de ERO e despolarização mitocondrial, com regulação antioxidante pelo aumento da GSH e diminuição da peroxidação lipídica. Também foi demonstrado que o tratamento com Bisabolol pode inibir o NOX4. Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que o Bisabolol reduziu o dano celular induzido por I/R. Portanto, o tratamento com Bisabolol protege as células HK2 epiteliais tubulares renais contra o dano oxidativo ocasionado pela I/R. Este efeito está relacionado à inibição da apoptose, diminuição da liberação de KIM-1, e estabelecimento do equilíbrio REDOX através da inibição da atividade da NOX4 nas células tubulares.

Palavras-chave: Bisabolol; Isquemia/Reperfusão renal; NADPH oxidase; NOX4.

ABSTRACT

Involvement of the enzyme NADPH oxidase in the nephroprotective effect of (-) - alpha-Bisabolol in a model of acute renal injury by ischemia-reperfusion in vitro.

Acute Renal Injury (AKI) is associated with high morbidity and mortality, generating public health costs. Ischemia and reperfusion (I/R) are events that frequently lead to AKI due to tissue hypoxia, reactive oxygen species (ROS) production, oxidative stress and programmed cell death by apoptosis. Previously, we have demonstrated the nephroprotective potential of (-)- α -Bisabolol, an unsaturated monocyclic sesquiterpene of chamomile flowers. The objective of the present study was to evaluate the mechanism of nephroprotection mediated by Bisabolol in human tubular renal cells after induction of I/R in an *in vitro* model. Additionally, this work intends to analyze the involvement of ROS generated by NOX4 in the lesion and cellular recovery. HK2 cells were exposed to I/R conditions and treated with Bisabolol at various concentrations. Cell viability was performed by the MTT assay. Treated and untreated cells were submitted to flow cytometry to evaluate necrotic/apoptotic cells, ROS production and mitochondrial transmembrane potential. TBARS and GSH were used as redox balance parameters. In addition, the levels of KIM-1 released in the supernatant were measured by ELISA. In order to identify an interaction between Bisabolol and NOX4, molecular docking and enzymatic assays *in vitro* were performed. Expression of the NOX4 isoform in treated cells was assessed by Western blotting. Finally, the cells were visualized by scanning electron microscopy. Bisabolol improved cell viability and prevented cell death by apoptosis, also indicated by decreased levels of KIM-1 in the cell supernatant. A decrease in ROS production and mitochondrial depolarization was observed, with antioxidant regulation by the increase of GSH and decrease of lipid peroxidation. It has also been shown that treatment with Bisabolol can inhibit NOX4. Scanning electron microscopy images showed that Bisabolol reduced cell injury induced by I/R. Therefore, treatment with Bisabolol protects renal tubular epithelial HK2 cells against the oxidative damage caused by I/R. This effect is related to inhibition of apoptosis, decreased release of KIM-1, and establishment of REDOX balance through inhibition of NOX4 activity in tubular cells.

Keywords: Bisabolol; Renal ischemia / reperfusion; NADPH oxidase; NOX4.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7AAD – 7-amino-actinomycin.

Anx – Annexin V.

DCFH-DA – Diacetato de Diclorofluoresceína.

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO – Dimethylsulfóxido.

DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid).

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay.

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio.

GSH – Glutathiona Reduzida.

HK2 – Células Human Kidney 2.

I/R – Isquemia e Reperfusão.

KIM-1 – Kidney Injury Molecule 1.

LRA – Lesão Renal Aguda.

MDA – Malondialdeído.

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

NADPH – Nicotinamida e Adenina Dinucleotídeo Fosfato.

NOX4 – NADPH Oxidase Isoforma 4.

PBS – Phosphate Buffer Solution.

Rho123 – Rodamina 123.

SDS – Dodecilsulfato de Sódio.

TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances.

$\Delta\Psi_m$ –Potencial Transmembranico Mitochondrial.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de viabilidade celular das células HK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).	52
Tabela 2. Percentual de viabilidade celular das células HK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).	54
Tabela 3. Valores numéricos do ensaio de citometria de fluxo para avaliação da marcação por 7AAD (7-aminoactinomicina) e/ou anexina V, usando células submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).	56
Tabela 4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células HK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol.	59
Tabela 5. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células HK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol.	61
Tabela 6. Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de glutathiona reduzida (GSH).	69
Tabela 7. Níveis de Molécula de Lesão Renal (KIM-1) no sobrenadante de células HK2.	71
Tabela 8. Produção de NADPH em células HK2 na presença de Bisabolol.	73
Tabela 9. Valores de densidade relativa obtidos no ensaio de Western Blot.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação da apoptose pela via citoplasmática. -----	17
Figura 2. Via intrínseca de ativação da apoptose. -----	18
Figura 3. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) -----	19
Figura 4. Representação da enzima transmembrana NADPH-oxidase. -----	22
Figura 5. Unidade básica de Isopreno. -----	24
Figura 6. Estereoisômeros do bisabolol. -----	25
Figura 7. Estrutura tridimensional do Bisabolol. -----	25
Figura 8. Visualização de células HK2 ao microscópio. -----	32
Figura 9. Princípio do ensaio de redução do MTT. -----	33
Figura 10. Câmara de anaerobiose. -----	34
Figura 11. Princípio da análise por citometria de fluxo.-----	35
Figura 12. Princípio da metodologia de avaliação do mecanismo de morte celular. ---	36
Figura 13. Princípio do método de análise de ERO citoplasmáticas usando DCFH-DA. -----	38
Figura 14. Estrutura da Rodamina. -----	39
Figura 15. Princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura. -----	40
Figura 16. Reação de detecção dos níveis de Malondialdeído (MDA) através da reação de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). -----	41
Figura 17. Interconversão da glutathiona em suas duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR). -----	42
Figura 18. Representação da análise de proteínas por Western blot. -----	46
Figura 19. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade do Bisabolol em células HK2. -----	51
Figura 20. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células HK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após a exposição ao Bisabolol.53	
Figura 21. Análise estatística do ensaio de avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por Anx (anexina V). -----	55
Figura 22. Gráficos <i>density plot</i> representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7- aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V. 57	

Figura 23. Análise do estresse oxidativo e produção de ERO citoplasmáticas por citometria de fluxo através do ensaio utilizando o DCFH-DA. -----	58
Figura 24. Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentando grupo tratado com Bisabolol na concentração de 250 μ M. -----	59
Figura 25. Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentando grupo tratado com Bisabolol na concentração de 62,5 μ M. -----	60
Figura 26. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123. -----	61
Figura 27. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com Bisabolol na concentração de 250 μ M. -----	62
Figura 28. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com Bisabolol na concentração de 62,5 μ M. -----	62
Figura 29. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células HK2 do grupo controle. -----	63
Figura 30. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células HK2 submetidas à isquemia/reperfusão.-----	64
Figura 31. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células HK2 submetidas à isquemia/reperfusão e tratadas com Bisabolol na concentração de 250 μ M.-----	65
Figura 32. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células HK2 submetidas à isquemia/reperfusão e tratadas com Bisabolol na concentração de 62,5 μ M.-----	66
Figura 33. Avaliação do estresse oxidativo através da medida das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).-----	67
Figura 34. Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). -----	68
Figura 35. Níveis de Molécula de Lesão Renal (KIM-1) no sobrenadante de células HK2. -----	70
Figura 36. Efeito do Bisabolol sobre a produção de NADPH em células HK2. Os resultados são mostrados como média \pm SEM. -----	72
Figura 37. Simulação de acoplamento molecular do Bisabolol com a isoforma NOX4 por <i>Docking</i> molecular. -----	74
Figura 38. Fotografia representativa do ensaio de Western blot, representando a expressão da enzima NADPH-oxidase (isoforma NOX4) em células HK2 em	

comparação com a expressão de β -actina em células expostas à isquemia/reperfusão (I/R). ----- 76

Figura 39. Expressão relativa de NOX4 em células HK2 submetidas à isquemia/reperfusão (I/R) e tratadas com Bisabolol. ----- 76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Lesão renal aguda por Isquemia e Reperfusão	14
1.2 Morte celular programada	15
1.3 A Molécula de Injúria Renal 1 (KIM-1)	18
1.4 Células HK2	20
1.5 O complexo enzimático NADPH-oxidase	21
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Fonte do (-)-α-Bisabolol	31
4.2 Manutenção e Cultivo de Células Tubulares Renais	31
4.3 Citotoxicidade do (-)-α-Bisabolol em Células Tubulares	32
4.4 Indução de I/R <i>in vitro</i>	34
4.5 Ensaios de Citometria de Fluxo	35
4.5.1 Avaliação do mecanismo de morte celular.	36
4.5.2 Análise da produção de ERO citoplasmáticas.	37
4.5.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	38
4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	39
4.7 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células renais	40
4.7.1. Mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	41
4.7.2. Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	42
4.8 Determinação dos níveis de KIM-1 no sobrenadante de células HK2	43
4.9 Investigação da inibição da enzima NADPH-oxidase	44
4.9.1 Determinação da atividade enzimática	44
4.9.2 <i>Docking</i> molecular	45
4.10 Western Blot	45
4.10.1 Extração e quantificação de proteínas	47
4.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência	47
4.10.3 Imunodeteção	48
4.11 Análise Estatística	49
5. RESULTADOS	51

5.1	Ensaio de viabilidade celular	51
5.2	Ensaio por citometria de fluxo	54
5.2.1	Avaliação do mecanismo de morte celular	54
5.2.1	Análise da produção de ERO citoplasmáticas	57
5.2.2	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	60
5.3	Microscopia eletrônica de varredura de células HK2	63
5.4	Determinação dos níveis de TBARS e GSH	66
5.5	Mensuração dos níveis de KIM-1	69
5.6	Inibição da enzima NADPH-oxidase	71
5.6.1	Ensaio de avaliação da atividade enzimática	71
5.6.2	Ensaio de <i>Docking</i> molecular	73
5.7	Avaliação da expressão de NOX4 em células HK2 por Western Blot	75
6.	DISCUSSÃO	79
7.	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesão renal aguda por Isquemia e Reperusão

A Lesão Renal Aguda (LRA) é caracterizada como uma perda súbita e inesperada da função renal, a qual caracteriza-se pela perda de capacidade de concentração da urina, levando inclusive ao acúmulo de substâncias nitrogenadas como a ureia e a creatinina na circulação sistêmica (PARIKH; MANSOUR, 2017). A LRA está associada a alta morbidade, com prevalência de até 25% e mortalidade superior a 50% (NOH et al., 2015), compondo a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, a qual afeta 20% dos pacientes hospitalizados e 67% daqueles em terapia intensiva, gerando custos de saúde pública, sendo um risco a longo prazo de doença renal crônica (LAMEIRE *et al.*, 2013).

A LRA compõe um quadro clínico especial o qual se define pela diminuição do fluxo sanguíneo renal, decréscimo da filtração glomerular e diminuição do coeficiente de ultrafiltração renal, além da disfunção tubular secundária à obstrução. O conjunto desses fatores oferece as condições para o estabelecimento da Síndrome de Isquemia e Reperusão (WENG et al., 2018).

Ademais, o binômio isquemia e reperusão (I/R) são eventos que muitas vezes levam à IRA por hipóxia tecidual causada pela diminuição do fluxo sanguíneo, formação de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e morte celular programada por apoptose (LAMEIRE et al., 2013; ZHAO et al., 2018). Um evento importante na I/R é a reoxigenação que acontece na reperusão, pois o aumento da oferta de oxigênio em um tecido que está ávido em sua demanda pode desviar o oxigênio molecular da respiração celular, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), causando danos mitocondriais, levando à disruptura da cadeia transportadora de elétrons, impedindo a fosforilação oxidativa e causando a diminuição na síntese de ATP (GRANATA et al., 2015; CHOI et al., 2016).

A fisiologia e homeostasia renais são dependentes da manutenção do equilíbrio oxido-redutor (REDOX). O dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato (NADPH) derivado da via das pentoses da respiração celular é essencial para o funcionamento adequado do equilíbrio REDOX e sistemas de defesa antioxidante. Estudos prévios indicam que as reservas intracelulares de NADPH são depletadas durante o dano

isquêmico e que este é responsável por proteger tecidos da injúria oxidativa (WENG et al., 2018).

Em paralelo, a isquemia leva à ativação do endotélio, migração celular e promoção do processo inflamatório. Fatores de transcrição como o NF- κ B são induzidos e ativados, levando à produção leucocitária de ERO, citocinas e vasoconstrictores, o que contribui para o estabelecimento da lesão e caracterização e agravamento do dano tubular, prolongando a hipoperfusão (SIMONS et al., 2005).

A disfunção tubular é a principal consequência relacionada à manutenção dos danos da LRA por I/R. A obstrução tubular associada ao aumento da pressão intratubular e o vazamento do filtrado tubular para o interstício renal. Nesse contexto, a I/R leva à indução da morte celular no epitélio, fibrose tubular e disfunção renal (JEONG et al., 2018; WENG et al., 2018). Logo, as células tubulares, por serem células epiteliais amplamente especializadas e funcionais responsáveis pela reabsorção, secreção ativa e regulação osmótica no néfron são mais propensas a disfunções acarretadas pelos diversos tipos de injúria (DUTTA et al., 2017; JEONG et al., 2018).

1.2 Morte celular programada

A ativação das vias de morte celular envolve moléculas mediadoras e sinalizadoras, as quais modulam a morte celular em condições fisiológicas (por exemplo controle da tolerância imunológica, desenvolvimento embrionário e formação de órgão e tecidos) e patológicas (câncer, intoxicações e radiação). Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em autofagia, senescência, necrose e apoptose (HERAULT et al., 1999).

A autofagia ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares, durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos, os quais se conjugam com lisossomos e direcionados à degradação, podendo estar relacionada a processos de reparo (RICCI; ZONG, 2006). A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular, liberando o conteúdo citoplasmático e causando inflamação. Já a senescência é um processo metabólico ativo essencial para o

envelhecimento que por programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais, comprometendo a capacidade proliferativa (WEAVER; CLEVELAND, 2005).

A morte celular programada por apoptose, é um processo essencial na manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, eliminando células senescentes ou defeituosas. Alterações morfológicas próprias do processo caracterizam tanto o gatilho quanto as consequências locais e sistêmicas da morte; tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA, ruptura da membrana externa mitocondrial, oxidação de lipídios de membrana e formação de prolongamentos citoplasmáticos e de corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos. A apoptose requer interação de inúmeros fatores bioquímicos, genéticos e funcionais (ARUMUGAM; FAIZAL; RAZIS, 2018).

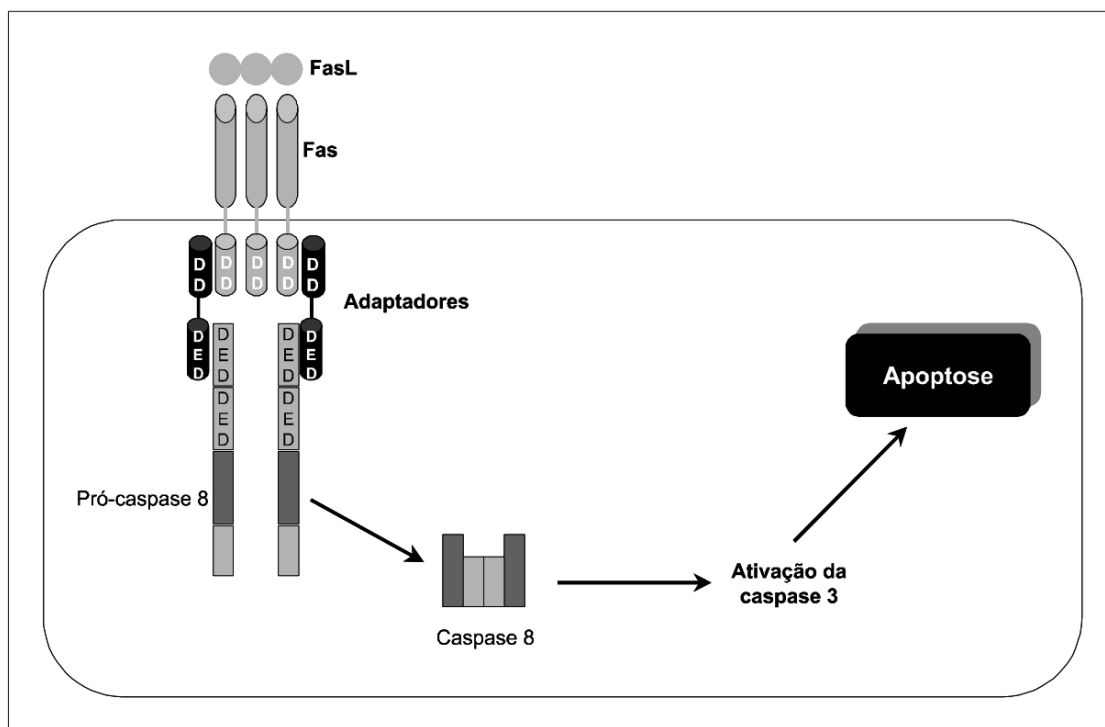
Dentre as moléculas sinalizadoras da apoptose destaca a participação das caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*), as quais pertencem à família das cisteínas proteases as quais reconhecem e clivam substratos, mediando a externalização de lipídios de membrana chamados de resíduos de fosfatidilserina, que sinalizam a fagocitose de células apoptóticas. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose (ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011).

Outras moléculas estão envolvidas com o controle e modulação da apoptose. Visto que a homeostasia é mantida quando há o equilíbrio entre proteínas promotoras e inibidoras da apoptose, as proteínas da família Bcl-2 são inibidoras da apoptose pois previnem a liberação das enzimas do citocromo c, inibindo a formação de ERO e estabilizando o potencial da membrana mitocondrial. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (MAGNELLI et al., 2010).

Os mais diversos fatores são capazes de desencadear a apoptose, a qual pode acontecer a partir de duas vias, uma extrínseca (citoplasmática) ou uma intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca está associada à ligação de ligantes específicos a um

grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (caspase-8 que irá clivar e ativar a caspase-3), executando a morte por apoptose (Figura 1).

Figura 1. Ativação da apoptose pela via citoplasmática.



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

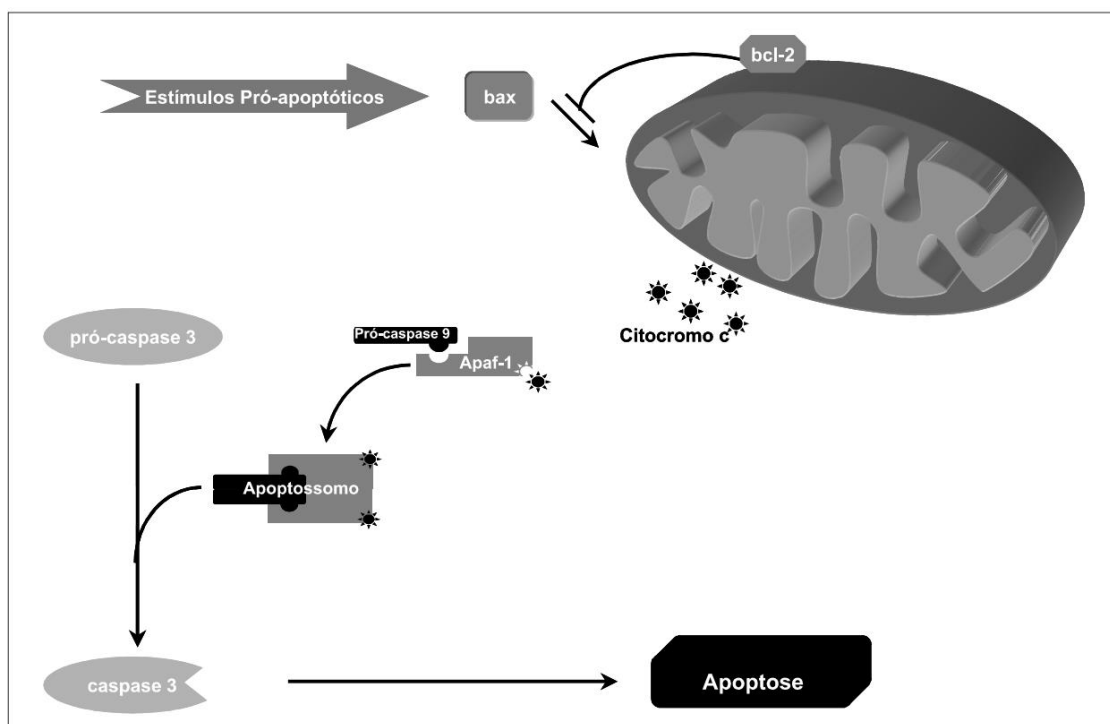
A via intrínseca é ativada por condições de estresse como a diminuição de fatores de crescimento, danos ao DNA e hipóxia, ocasionando uma disfunção e uma despolarização no potencial elétrico negativo das membranas mitocondrial, comprometendo a respiração celular. A ativação da via intrínseca ocasiona a ruptura osmótica da membrana mitocondrial, liberando proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, principalmente o citocromo c. Além disso, há um comprometimento da síntese de ATP, produção excessiva de ERO, os quais oxidam material genético, proteínas e lipídios; adicionalmente as ERO induzem a ativação das caspases -9 e -3 (MAGNELLI et al., 2010; CHEUNG; LUDWIG; VOUSDEN, 2012).

A figura 2 representa as etapas da via intrínseca da apoptose. O citocromo c liberado para o citoplasma pelo rompimento das mitocôndrias forma um complexo com

um fator ativador de proteases (APAF-1) e a caspase-9, o chamado apoptossomo. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (LIU et al., 2017).

Dessa forma, o estabelecimento do equilíbrio entre proliferação e morte das células caracteriza processos de renovação, lesão e recuperação. Logo, a apoptose é também um mecanismo de defesa, o qual é ativado quando houver uma injúria.

Figura 2. Via intrínseca de ativação da apoptose.



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

1.3 A Molécula de Injúria Renal 1 (KIM-1)

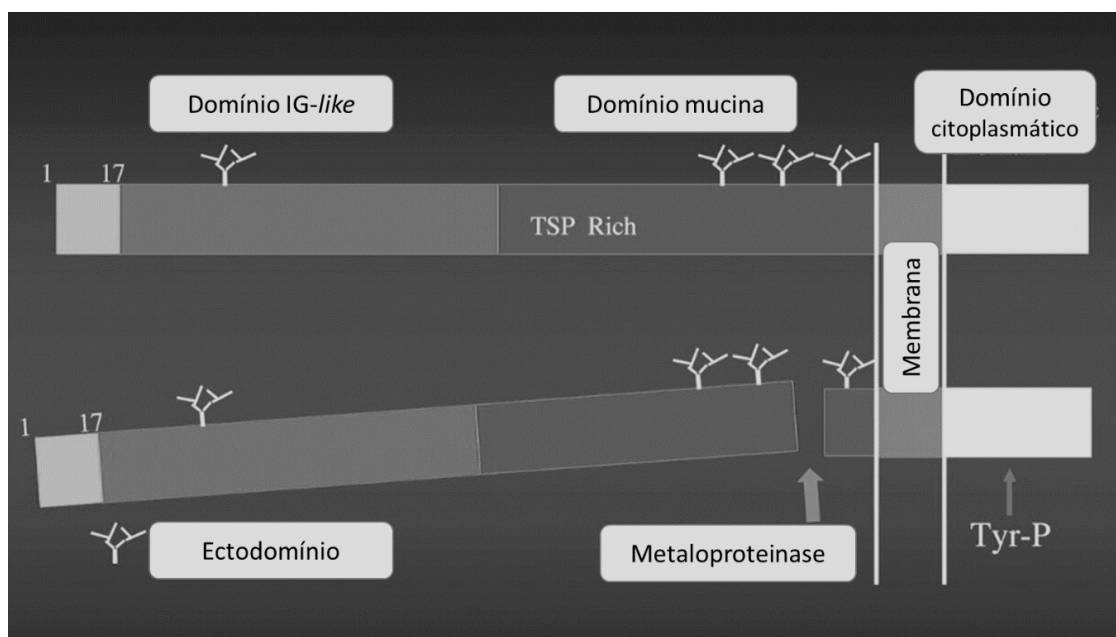
A fagocitose de células apoptóticas é necessária na resolução do dano ao órgão que está sofrendo a lesão e manutenção da tolerância imunológica. A molécula de injúria renal 1 (KIM1 – *Injury Kidney Molecule 1*) é um receptor de fosfatidilserina expresso em células epiteliais em estágios prévios da morte celular e pode transformar as células em fagócitos, mediando a fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados e sinalizando a morte celular programada (BROOKS et al., 2015). 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 (ICHIMURA et al., 2008).

O KIM-1 é uma glicoproteína transmembranar de adesão epitelial tubular proximal, de 38,7 KDa, com um domínio mucina e outro imunoglobulina-*like* composto por seis cisteínas, caracterizando o ectodomínio (Figura 3). KIM-1 é descrita como um biomarcador de sinalização da lesão no epitélio renal, uma vez que sua detecção na urina só é possível após a clivagem do ectodomínio extracitoplasmático por metaloproteínases (MCWILLIAM et al., 2014).

Estudos revelam que esta molécula é praticamente indetectável na urina de indivíduos saudáveis, no entanto ela está presente como o sinal de regeneração do tecido isquêmico (MCWILLIAM et al., 2014; WASUNG; CHAWLA; MADERO, 2015). A clivagem do KIM-1 está associada com a resposta imune, sinalizando a transição mesenquimal e consequente fibrose renal progressiva, além do risco de insuficiência renal crônica. Além disso, é considerada como um marcador único, com elevada sensibilidade e especificidade, acima de tudo, para diagnóstico de lesão renal aguda em estádios precoces (MOLEDINA; PARIKH, 2018).

Figura 3. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)



Fonte: Adaptado de ICHIMURA *al.* (2008).

Quando KIM-1 é expressa cronicamente, isso indica uma progressão da fibrose renal e falência renal crônica, o que, muitas vezes, pode estar relacionado com o dano tecidual mediado pela fagocitose de lipídios oxidados. Estudos mais aprofundados da KIM-1 correlacionam sua presença com o diagnóstico da doença já estabelecida, com o acompanhamento do avanço da patologia e com o risco de cronificação (HUMPHREYS *et al.*, 2013; LAHOUD *et al.*, 2015).

1.4 Células HK2

Estudos utilizando células em cultivo, sejam elas de fonte primária ou de linhagens imortalizadas, têm sido uma alternativa cada vez mais viável no contexto da pesquisa nos âmbitos da fisiologia e da farmacologia, sobretudo quando se pretende obter resultados com a mínima interferência da complexidade de sistemas ou órgãos inteiros sobre os resultados obtidos (LEVINE; MOMAND, 1991). Células obtidas de cultivo primário são amplamente utilizadas pelo fato de, na maioria das vezes, apresentarem um padrão de comportamento quando comparadas com as células em seu nicho natural; no entanto, o processo de isolamento pode levar à morte celular massiva, limitando a experimentação a poucas horas. Sendo assim, a busca por imortalização de linhagens celulares tem tomado grande destaque, apresentando como principal desafio a mutação do material genético alterando minimamente características primárias (KRAWCZYK *et al.*, 2018).

As células HK2 (*Human Kidney 2*) pertencem a uma linhagem de células epiteliais de túbulo proximal, proveniente de rins de humanos saudáveis. São utilizadas com grande frequência em estudos de fisiologia e farmacologia devido ao fato de apresentarem alto grau de semelhança com as células correspondentes *in vivo*, ou seja, o procedimento de imortalização e passagens pouco altera seu fenótipo e função; seja no metabolismo, expressão de proteínas de superfície ou conteúdo genético. Conseguem sobreviver até um ano e permanecem viáveis no nitrogênio líquido (RYAN, 1994).

A nível molecular, as células HK2 são imortalizadas através de um procedimento de transfecção, o qual consiste na introdução intencional de ácido nucleicos nas células de forma não espontânea, ao contrário do que ocorre na carcinogênese. A linhagem de células HK2 é imortalizada através da transfecção com o papiloma vírus (HPV 16), caracterizada pela inserção dos genes E6/E7, processo esse já utilizado na imortalização

de diversos tipos de células epiteliais(VOUSDEN, 1990). Acredita-se que a transformação HPV 16 E6/E7 ocorre porque as proteínas E6/E7 interagem com dois importantes reguladores negativos da proliferação celular: E6 liga-se e induz degradação da proteína P53 e E7 inativa o produto do gene supressor do tumor retinoblastoma, p105-RB (LEVINE; MOMAND, 1991).

Dessa forma, atualmente, as células HK2 são diversamente utilizadas; seu desenvolvimento e utilização permitiram um estudo aprofundado da fisiologia, farmacologia e toxicologia no contexto dos túbulos proximais, além de permitir uma análise criteriosa de mecanismos de morte celular, injúria e reparo. Pesquisas utilizando células HK2 já viabilizaram achados como a associação da presença de β -microglobulina nos túbulos renais com o desenvolvimento da transição epitelial-mesenquimal e a consequente fibrose renal (ZHANG et al., 2015); assim como foi utilizando células HK2 que traçou-se uma relação de causa-consequência entre a presença de albumina nos túbulos renais, causando aumento da produção de angiotensina II devido à desregulação da expressão da enzima conversora de angiotensina (LIU et al., 2009), dessa forma, promovendo um aumento dos níveis de aldosterona, a qual promove a apoptose por via mitocondrial em células proximais através do aumento de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas pela ação da enzima NADPH-oxidase (PATNI et al., 2007; LI et al., 2017).

1.5 O complexo enzimático NADPH-oxidase

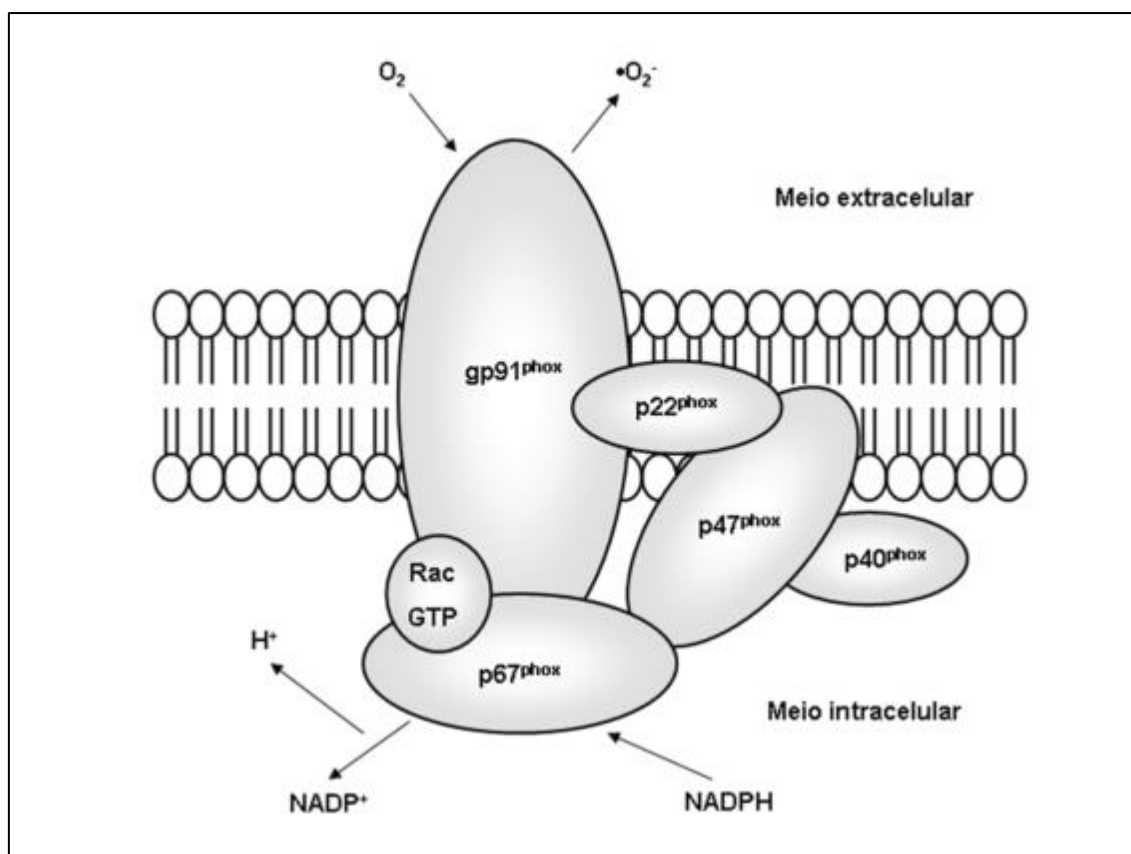
Diversas estratégias são utilizadas na prática clínica visando prevenir ou minimizar o dano de I/R e, dentre elas, destaca-se o uso de substâncias antioxidantes (ZHU et al., 2017). No entanto, estudos indicam que substâncias antioxidantes que atuam como sequestrantes de radicais livres não são totalmente eficientes na nefroproteção, elas precisam agir através de uma via enzimática, impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), ao invés de removê-las (YOUSEF et al., 2012; ALTENHO et al., 2015).

A NADPH-oxidase (NOX) é uma enzima transmembrana amplamente distribuída, que participa de vários processos fisiopatológicos. Basicamente, a subunidade gp91phox da NOX é o ligante do NADPH reduzido (nicotinamida e adenina dinucleotídeo fosfato), catalisando a transferência de elétrons para o oxigênio molecular,

produzindo ERO. A gp91phox é ativada pelo acoplamento do domínio citoplasmático p47phox à subunidade transmembrana p22phox, sendo esse acoplamento um alvo farmacológico destacado no estudo da inibição da enzima, conforme representado na figura 4 (KANEGAE et al., 2010; WENG et al., 2018).

Os radicais livres oriundos da enzima participam de vários processos celulares, atuando como segundos mensageiros, mediando os efeitos hormonais, controlando os canais iônicos, regulando a expressão gênica, o crescimento celular, a senescência e a apoptose (MACÍAS-PÉREZ et al., 2013). Nas células tubulares, a enzima regula funções como a gliconeogênese, transporte de glicose e eletrólitos e feedback tubuloglomerular. A inibição de NOX4, a isoforma NADPH-oxidase abundantemente expressa nos rins, é um mecanismo descrito de modulação das funções tubulares, sendo um provável mecanismo de prevenção e tratamento da LRA (CHEN et al., 2018).

Figura 4. Representação da enzima transmembrana NADPH-oxidase.



Fonte: Adaptado de SEDEEK et al. (2013).

Isoformas da enzima NADPH-oxidase estão distribuídas nos diversos tecidos participando de processos fisiológicos e patológicos. Basicamente, a NADPH-oxidase catalisa a transferência de elétrons do NADPH reduzido (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) ao oxigênio molecular, produzindo ERO. Espécies reativas originadas pela enzima participam de diversos processos celulares, agindo como segundos mensageiros, mediando efeitos hormonais, controlando canais iônicos, regulando expressão gênica, crescimento celular, senescência e apoptose (SEDEEK et al., 2013).

São descritas sete isoformas da enzima (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 e Duox2). As isoformas NOX1-4 são dependentes da subunidade p22-phox; NOX5, Duox1 e Duox2 possuem um domínio peroxidase dependente de cálcio adicional (WENG et al., 2018). No tecido renal, existe uma distribuição das isoformas da NOX exercendo diversas funções; NOX1 e 2, por exemplo, já foram isoladas do tecido renal, no entanto NOX4 é abundantemente expressa nos rins, sendo uma das principais fontes de ERO nesses órgãos. Essas ERO participam de processos como a gliconeogênese, transporte de glicose e eletrólitos e *feedback* tubuloglomerular (RAJARAM et al., 2018).

Em condições fisiológicas, a NOX4 possui um nível constitutivo suficientemente alto de expressão em células tubulares proximais, dada esta distribuição, ela foi inicialmente chamada oxidase renal (RENOX) (RAJARAM et al., 2018 apud. GEISZT et al., 2000). Diversas condições patológicas levam ao aumento da expressão da NOX4, incluindo hipóxia, inflamação e fatores profibróticos, como o fator de transformação de crescimento beta (TGF β); superexpressão e/ou atividade da enzima, portanto, levam ao desequilíbrio REDOX e disfunção mitocondrial, causando danos celulares expressivos (JEONG et al., 2018).

Inibidores da NOX4 são frequentemente propostos como terapias inovadoras ao elenco de distúrbios associados ao estresse oxidativo, sobretudo prevenindo a morte celular e garantindo a funcionalidade dos mais diversos tecidos nos quais essa enzima está distribuída (CHAVUSHYAN et al., 2017).

1.6 Atividades biológicas e Farmacológicas do (-)- α -Bisabolol

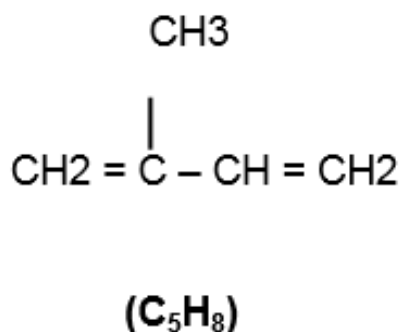
A busca por atividade farmacológica nas substâncias naturais, nas plantas, nos minerais e nos animais permeia o conhecimento popular e tem sido um desafio e fonte de

estudos nos mais diversos contextos. Substâncias naturais e seus derivados sintéticos são comercializados numa diversidade de formas farmacêuticas e com variadas indicações terapêuticas.

Os óleos essenciais são majoritariamente constituídos por terpenos, além de substâncias secundárias como álcoois, ésteres, aldeídos e cetona de cadeia curta. Os terpenos, ou terpenóides são oligômeros formados pela união de subunidades de cinco carbonos, chamadas isopreno (figura 5). O perfil terpênico apresenta, principalmente, substâncias constituídas por dez e quinze átomos de carbono, respectivamente monoterpenos e sesquiterpenos (KIM et al., 2016).

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 patologias.

Figura 5. Unidade básica de Isopreno.

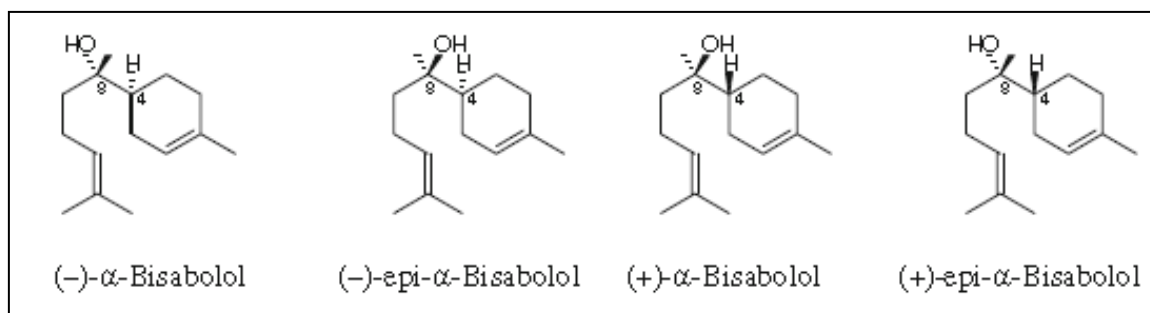


Fonte: KIM et al. (2016).

O (-)- α -bisabolol (alfa-4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol - 222,37 g/mol) - (C₁₅H₂₆O), também conhecido como levomenol (figuras 6 e 7), é um sesquiterpeno monocíclico insaturado natural, biologicamente ativo e presente em uma variedade de plantas (KAMATOU; VILJOEN, 2010; OTTO et al., 2017). Foi isolado pela primeira vez em 1951 por Isaac no óleo essencial de *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), ou seja, camomila (BRUNKE, E. J.; HAMMAERSCHMIDT, 1985), no entanto apresenta-se como componente secundário em diversas outras plantas, como a

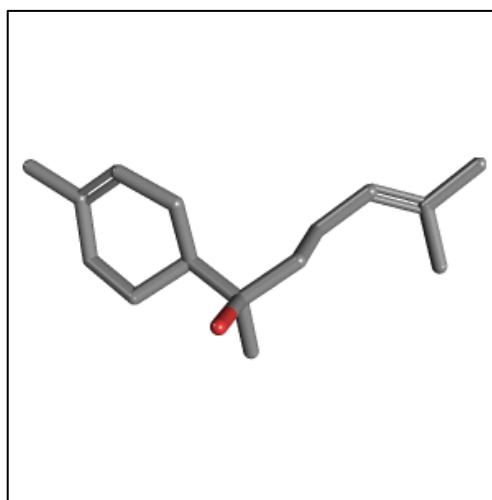
sálvia (*Salvia runcinata*), o candeeiro (*Vanillosmopsis arborea*) e a arnica (*Arnica chamissonis*) (BUIRAGO et al., 2015).

Figura 6. Estereoisômeros do bisabolol.



Fonte: Adaptado de KAMATOU; VILJOEN (2010).

Figura 7. Estrutura tridimensional do Bisabolol.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1201551>. Acesso em 01/07/2018.

Assim, produtos naturais antioxidantes e antiinflamatórios têm sido investigados para tratar e retardar a doença renal (DA COSTA et al., 2015; LU et al., 2015; SARSHAR et al., 2017; TAO et al., 2018). O Bisabolol já foi descrito previamente pelo nosso grupo como substância nefroprotetora na LRA (SAMPAIO, et al., 2016), Este estudo foi delineado visando dar continuidade aos resultados anteriores, estudando o mecanismo de ação do $(-)\text{-}\alpha\text{-bisabolol}$ mediado pelo seu potencial antioxidante (GANZERA; SCHNEIDER; STUPPNER, 2006).

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A I/R é um fenômeno complexo, o qual contribui para o estabelecimento do dano celular e disfunção tecidual renal, destacando-se como um fator predisponente para o estabelecimento da LRA. Em parte, Os danos são caracterizados pela hipóxia, no entanto, a reoxigenação, apesar de necessária, é um fator que induz a formação de ERO, estresse oxidativo e morte celular programada; necessitando, portanto, que esta aconteça de forma controlada (LI et al., 2015).

A prevenção da formação de ERO intracelulares através da utilização de alvos enzimáticos tem sido a abordagem de interesse dos grupos de pesquisa, uma vez que já foi demonstrado que é preferível bloquear a fonte de ERO ao invés de remover as espécies pré-formadas do microambiente celular (RAJARAM et al., 2018). Nesse contexto, a enzima NADPH-oxidase, a qual apresenta atividade geradora de ERO a nível constitutivo em condições fisiológicas e apresenta aumento de sua atividade e expressão em condições patológicas, destacando-se como um ferramenta farmacológica válida no estresse oxidativo ocasionado pela I/R (ALTENHO et al., 2015).

Dessa forma, destaca-se o (-)- α -Bisabolol, o qual apresenta diversificadas atividades biológicas, sobretudo um potencial antioxidante como estratégia de defesa no 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.

Adicionalmente, já foi demonstrado anteriormente que o Bisabolol possui um potencial nefroprotetor, agindo sobre a LRA e alterando biomarcadores bioquímicos, moleculares e histopatológicos (SAMPAIO et al., 2016). Essas afirmações ressaltam a importância de se estudar os mecanismos farmacológicos envolvidos nessa ação. Nesse contexto, o presente trabalho estuda o mecanismo de nefroproteção mediada por bisabolol em células renais tubulares humanas após indução de lesão por I/R *in vitro* analisando a participação de ERO, gerados pela enzima NOX4, na lesão e recuperação celular.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o mecanismo do efeito nefroprotetor do (-)- α -Bisabolol através do estudo do envolvimento da enzima NADPH-oxidase em células de túbulo proximal humano expostas a um protocolo de isquemia e reperfusão.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito do (-)- α -Bisabolol sobre a morte celular em células de túbulo proximal humano;
- Analisar a participação do (-)- α -Bisabolol no balanço REDOX citoplasmático e mitocondrial após injúria por isquemia e reperfusão;
- Avaliar a interação do (-)- α -Bisabolol com a enzima NADPH-oxidase em células renais tubulares;
- Correlacionar os efeitos nefroprotetores do (-)- α -Bisabolol com o funcionamento da enzima NADPH-oxidase;
- Investigar a influência do (-)- α -Bisabolol sobre a expressão da isoforma renal da enzima NADPH-oxidase em condições de hipóxia.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fonte do (-)- α -Bisabolol

O (-)- α -Bisabolol foi obtido da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha), com um grau de pureza > 95%. O Bisabolol foi armazenado respeitando as orientações do fabricante. A substância foi diluída na concentração de 0,2 M em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril visando a produção de uma solução-mãe. Em seguida, as soluções usadas no trabalho foram preparadas por diluição seriada em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; pH 7,4) com o objetivo de obter as concentrações de Bisabolol iguais a 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μ M nos experimentos. As diluições foram feitas de forma que a concentração final de DMSO nos experimentos nunca ultrapassasse 0,5%, concentração considerada não tóxica para a linhagem celular.

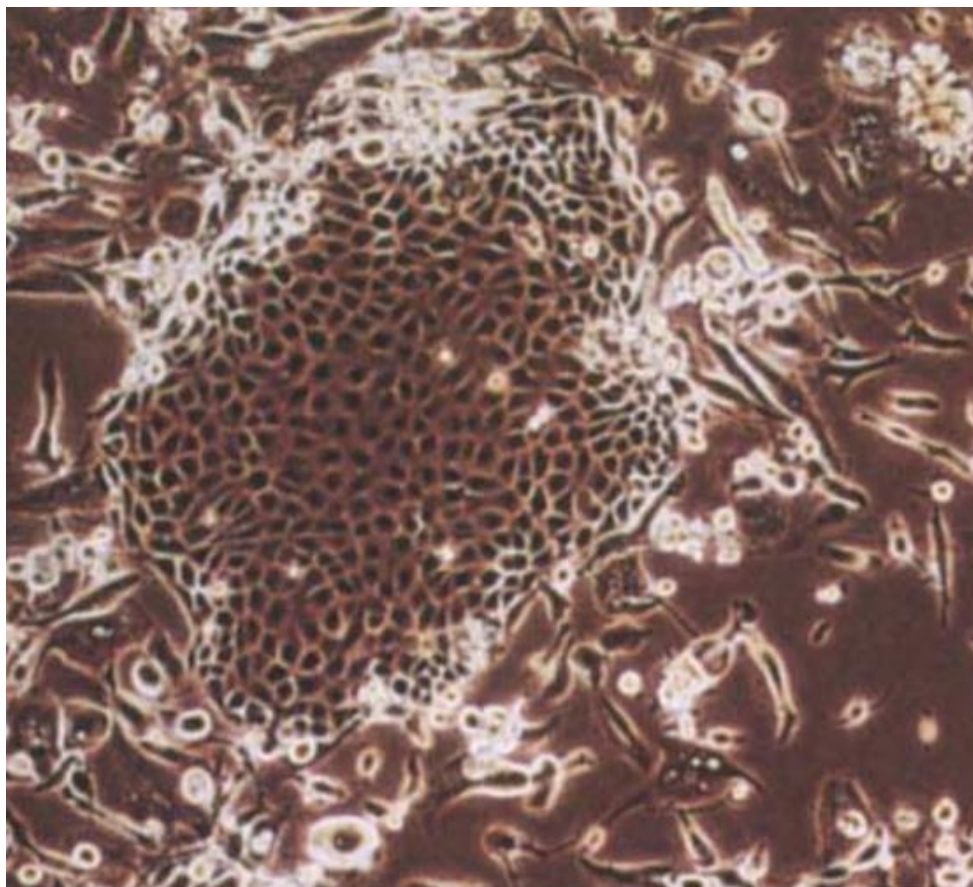
4.2 Manutenção e Cultivo de Células Tubulares Renais

As células HK2 são uma linhagem imortalizada de células epiteliais renais de túbulo proximal humano obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L). As células foram cultivadas em condições ideais em garrafas plásticas estéreis de 75 cm² em estufa de CO₂, mantendo as culturas a 37 °C e 5% de CO₂. O crescimento das células foi acompanhado diariamente através da observação por microscópio invertido, para verificação da densidade celular na monocamada (figura 8). Após atingirem confluência, o meio foi removido, as células foram lavadas com 5 mL de PBS estéril e deslocadas com 1 mL de tripsina/EDTA (0,25 %) por 5 a 10 minutos a 37°C. Alíquotas das células deslocadas foram transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM.

Na preparação dos experimentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, deslocadas para tubo cônico, centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos) para assim, permitir a contagem das células contidas no *pellet* em câmara de Neubauer nos campos de contagem de leucócitos a fim de se ajustar a densidade celular para 1×10^5 células/mL visando a disposição da suspensão celular em placas de acrílico de 96 (200 μ L/poço) ou 24 poços (1 mL/poço). Após o plaqueamento, as células foram incubadas overnight em condições ideais para garantir aderência e consequente tratamentos.

Para estocagem, culturas confluentes foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos). Em seguida, o meio foi removido e o pellet ressuspenso em meio DMEM suplementado com 10% de DMSO estéril. As células foram congeladas em frascos de criopreservação em nitrogênio líquido.

Figura 8. Visualização de células HK2 ao microscópio.



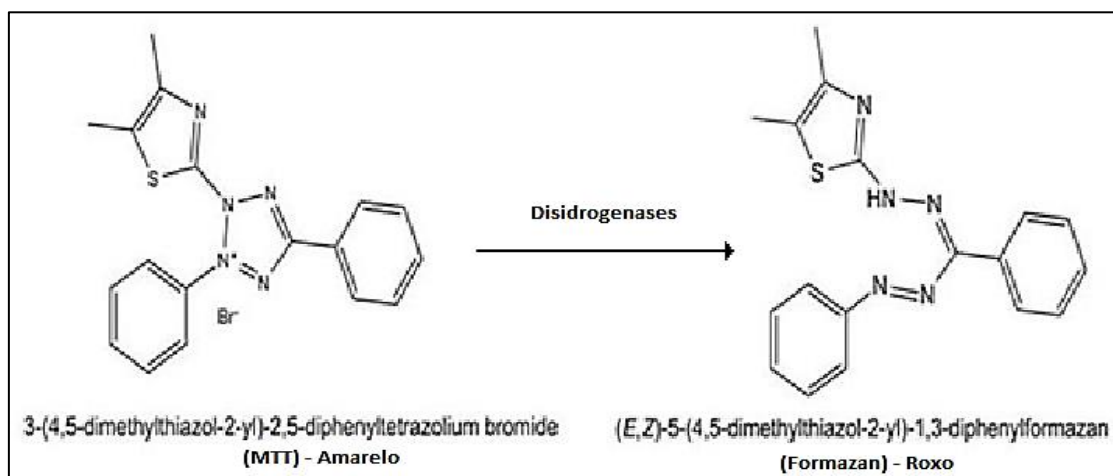
Fonte: RYAN et al. (1994).

4.3 Citotoxicidade do (-)- α -Bisabolol em Células Tubulares Renais

Para avaliação da citotoxicidade do Bisabolol na linhagem estudada foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT. O MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) é um sal de tetrazólio de cor amarela que, quando em contato com células viáveis, é internalizado por endocitose e clivado por desidrogenases do citoplasmáticas e mitocondriais, produzindo um sal de cor arroxeada chamado formazan (MOSMANN, 1983). Em seguida, os cristais de formazan são excitados e podem ser solubilizados pela adição de reagentes como DMSO ou

dodecilsulfato de sódio (SDS). Células não-viáveis perdem a capacidade metabólica de internalizar e clivar o MTT. A concentração de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e é medida pela leitura da absorbância a 570 nm. O princípio do ensaio do MTT está representado na figura 9.

Figura 9. Princípio do ensaio de redução do MTT.



Fonte: Adaptado de MOSMANN (1983).

Células HK2 dispostas em placas de 96 poços foram tratadas com as concentrações obtidas após a diluição seriada do Bisabolol. Após 24 horas, 100 μ L do sobrenadante foram retirados de cada poço e, em seguida, foram adicionados 10 μ L da solução de MTT (2,5 mg/mL em PBS) foi adicionado. As placas foram incubadas a 37°C no escuro por 4 horas e, em seguida, 90 μ L de uma solução de SDS (10 % p/v em HCL 0,1 N) foram adicionados. As placas ficaram em repouso por 17 horas para completa solubilização dos cristais de formazan e, por fim, foi realizada leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas. Como critério de correção foi usada a média do branco, formado por poços contendo apenas DMEM que receberam MTT e SDS semelhantemente aos grupos experimentais.

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

4.4 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 o qual mimetiza as condições de I/R (GINO & BRINDA, 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, ilustrada na figura 10, por 24 horas a 37 °C em uma condição de hipóxia (saturação de oxigênio < 5%). A reperfusão representada pela reoxigenação 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 a 37 °C.

Figura 10. Câmara de anaerobiose.



Fonte: <https://www.lojanetlab.com.br/plasticos/jarra-de-anaerobiose/jarra-de-anaerobiose-em-pvc-rigido>. Acesso em 01/07/2018.

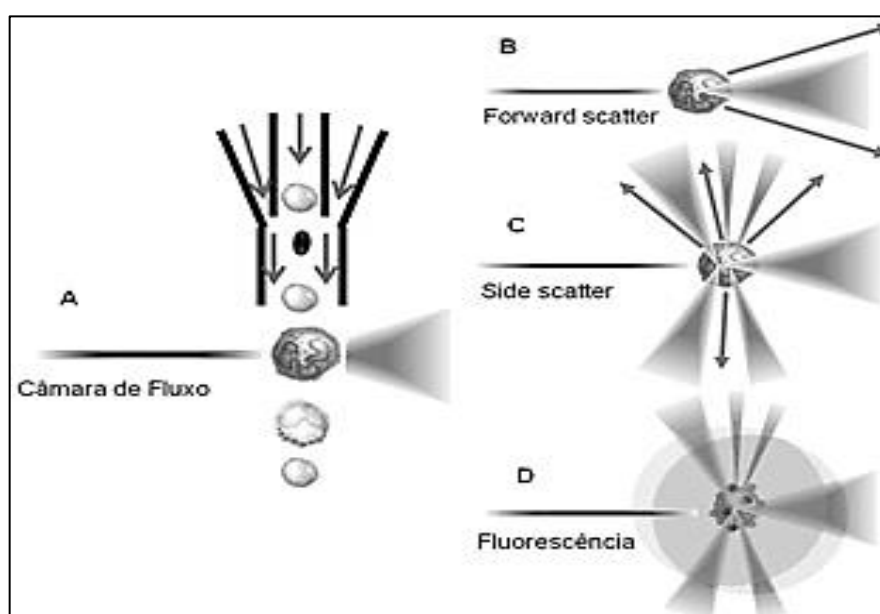
Após 3 horas, as placas foram tratadas com Bisabolol em várias concentrações. As células permaneceram condições de aerobiose em contato com o Bisabolol por 24 h utilizando como controle de isquemia um grupo de células HK2 tratado apenas com

veículo e um grupo que não foi exposto à anaerobiose como controle negativo. Ao fim da incubação, a viabilidade celular foi aferida utilizando-se o ensaio do MTT.

4.5 Ensaios de Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método em que as células em suspensão foram contadas por detecção fotoelétrica através de FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) – Contadores de Células Ativados por Fluorescência, permitindo alta sensibilidade do método. As células são injetadas no centro de um feixe de solução salina em fluxo contínuo. Dessa forma, elas são forçadas a passar individualmente pela câmara de leitura, atravessando um ou mais feixes de luz de comprimento de onda específicos. Ao passarem pela câmara de leitura, as células causam a dispersão frontal do feixe luminoso, criando uma sombra, esta é chamada dispersão frontal, ou FSC (Forward Scatter) – é usada como medida do tamanho da célula. A dispersão lateral de luz, chamada de Side Scatter (SSC), acontece devido ao encontro do feixe luminoso com as estruturas intracelulares, como organelas, núcleo e grânulos, permitindo a avaliação da complexidade ou granulosidade celular. Além disso, quando células ou outras partículas são marcadas com fluorocromos, o feixe luminoso provoca a excitação dessas moléculas e consequente emissão de luz detectada em leitores de fluorescência (FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5), o princípio da análise por citometria de fluxo está representado na figura 11 (HAN et al., 2015).

Figura 11. Princípio da análise por citometria de fluxo.



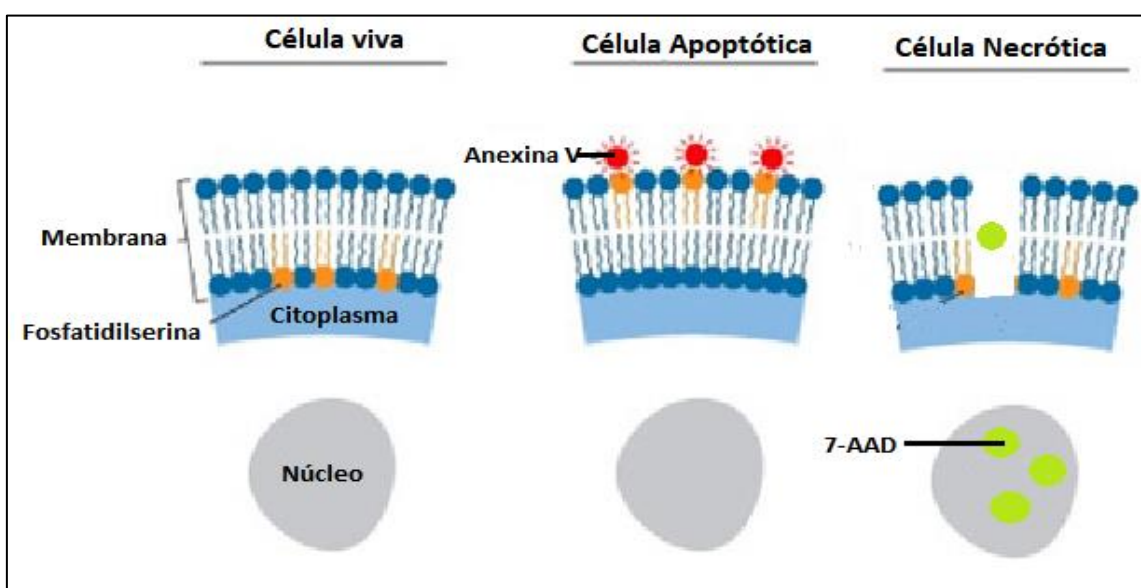
Fonte: Adaptado de HAN et al. (2015).

Previamente às análises por citometria de fluxo, células HK2 cultivadas em placas de 24 poços, em condições normais de aerobiose e/ou submetidas ao procedimento de I/R tratadas ou não com o Bisabolol foram lavadas com PBS, tripsinizadas, deslocadas. A fim de permitir a marcação fluorescente, o sobrenadante foi substituído por tampão de ligação (Hepes 10mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4). Finalmente, as células foram analisadas no equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, New Jersey, USA) utilizando o *CellQuest ProTM software*. Em cada tubo foram contadas 10⁴ células detectadas pelo laser de argônio.

4.5.1 Avaliação do mecanismo de morte celular.

A avaliação do mecanismo de morte celular foi realizada utilizando a marcação com as substâncias fluorescentes Anexina V-PE (conjugada com ficoeritrina) e 7-aminoactinomicina (7AAD), conforme representado na figura 12. O 7AAD é um intercalador capaz de complexar-se com o DNA, excitando-se com o laser de 488 nm e possuindo emissão máxima de 647 nm; O 7AAD não é capaz de penetrar em células com membrana íntegra. Dessa forma, células com alta marcação para 7AAD são consideradas células necróticas, por perda de integridade de membrana. A anexina V é uma proteína de 36 KDa, que, na presença de íons cálcio, tem alta afinidade pela fosfatidilserina, proteína externalizada como sinal da morte programada por apoptose.

Figura 12. Princípio da metodologia de avaliação do mecanismo de morte celular.



Fonte: O autor.

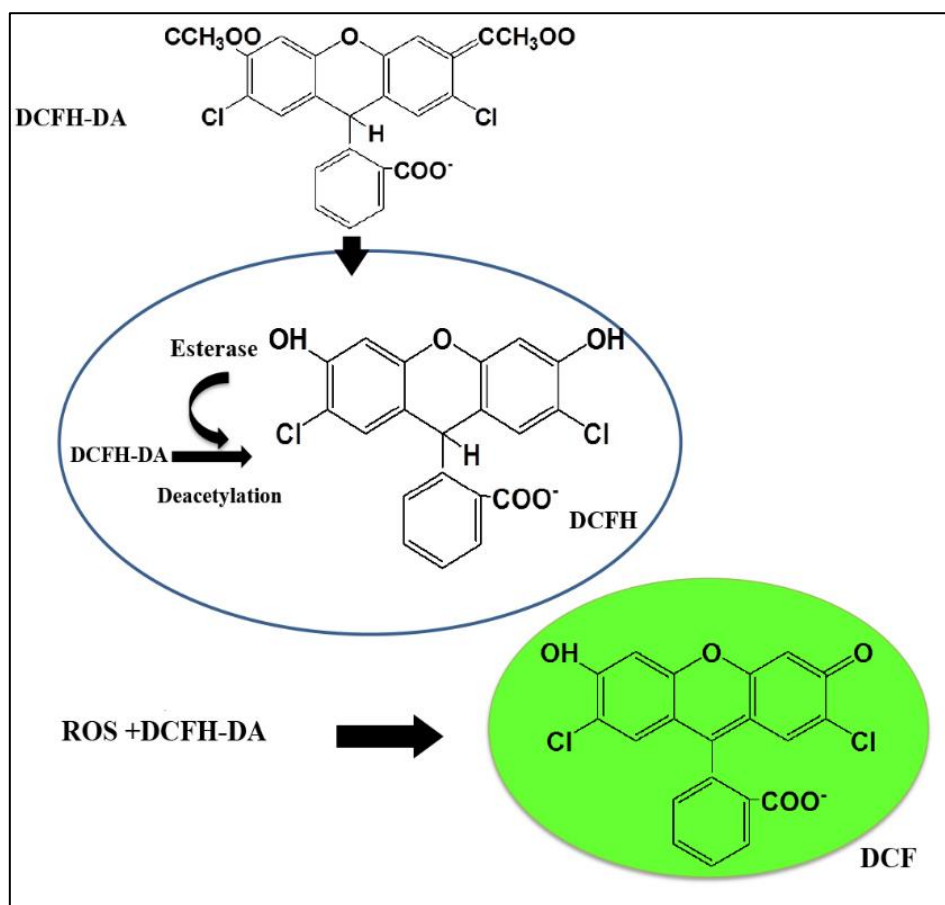
Para realização da análise, as células HK2 de cada poço foram suspensas em 100 μL de tampão de ligação; nos tubos foram adicionados 5 μL de 7AAD e 5 μL de Ax/PE (0,5 mg/mL cada). O procedimento foi realizado utilizando um kit comercial (Annexin V PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) e respeitando as orientações do fabricante. Após 15 minutos de incubação no escuro, foi adicionado 400 μL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no FACSCalibur (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em percentual de células não marcadas; células marcadas por 7AAD, indicativo de necrose; células marcadas por Anexina-V, indicativo de apoptose; e células duplamente marcadas, indicativo de apoptose tardia.

4.5.2 Análise da produção de ERO 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), como representado na figura 13. 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 excitação em 488 nm e detecção em 515-545 nm pelo sensor FL1. 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 (ARANDA et al., 2013).

Para a incorporação do DCFH no interior das células, 5 μL (concentração final 20 μM) 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 (ARANDA et al., 2013). 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.

Figura 13. Princípio do método de análise de ERO citoplasmáticas usando DCFH-DA.



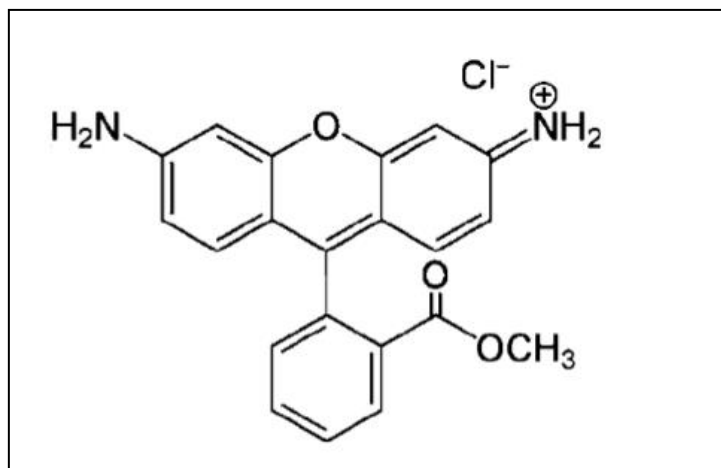
Fonte: Adaptado de ARANDA et al. (2013).

4.5.3 Avaliação 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 14). 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). 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) (O'CONNOR et al., 1998).

Figura 14. Estrutura da Rodamina.



Fonte: JOHNSON et al. (1980).

As células HK2 submetidas à lesão pelo modelo de 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 com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm.

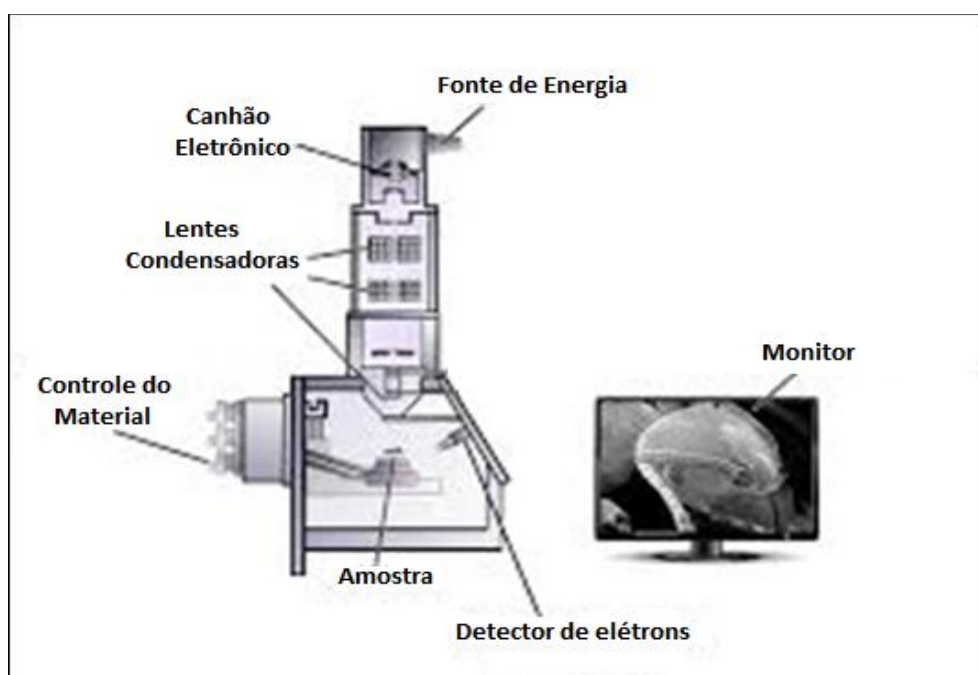
Os resultados do ensaio do DCFH-DA e da Rodamina foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, a qual foi obtida a partir dos valores absolutos de intensidade de fluorescência dos quais foi calculada uma média geométrica e atribuído valor 1,0 para o controle, as médias dos demais grupos receberam valores proporcionais calculados por regra de três simples, conforme previamente descrito (JOHNSON et al., 1980; POKORNÝ et al., 2014).

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o objetivo de se visualizar alterações ultraestruturais causadas nas células HK-2 após isquemia e reperfusão e visando confirmar os efeitos recuperativos do

Bisabolol, foi realizada a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual é capaz de gerar imagens tridimensionais em alta resolução da superfície de amostras. A figura 15 indica o princípio de funcionamento da MEV; essa microscopia não utiliza fótons, e sim um feixe de elétrons que incide a partir de um cátodo e é condensado sobre a amostra. Quando o feixe primário interage com as amostras, os elétrons perdem energia por dispersão e os elétrons dispersos são captados por um detector, o qual cria uma imagem virtual com o auxílio de um *software* (CHIHANGA et al., 2018).

Figura 15. Princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Adaptado de CHIHANGA et al., 2018.

Para a realização da MEV, células HK2 foram cultivadas em lamínulas de vidro circulares estéreis. As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em 0,1 M (pH 7,2 à temperatura ambiente, durante 2 horas) e desidratadas com concentrações crescentes de etanol, revestidas com uma camada de 20 nm de ouro em um dispositivo de pulverização de íons QT150 ES-Quorum e avaliadas com um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG-FEI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

4.7 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células renais

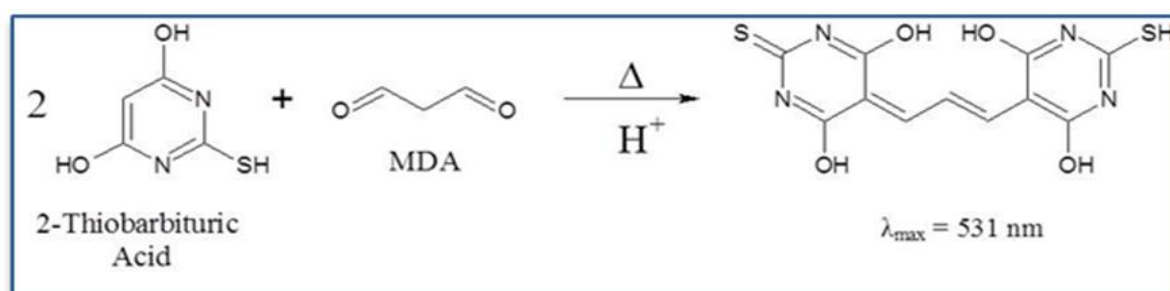
Com o objetivo de avaliar o potencial efeito do (-)- α -Bisabolol sobre o metabolismo oxido-redutor no modelo de lesão renal aguda utilizado, foram realizados dois ensaios bioquímicos: a mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS e a determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).

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

4.7.1. Mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

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 16) (KIL et al., 2014). A concentração de Malondialdeído (MDA) 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).

Figura 16. Reação do Malondialdeído (MDA) com substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).



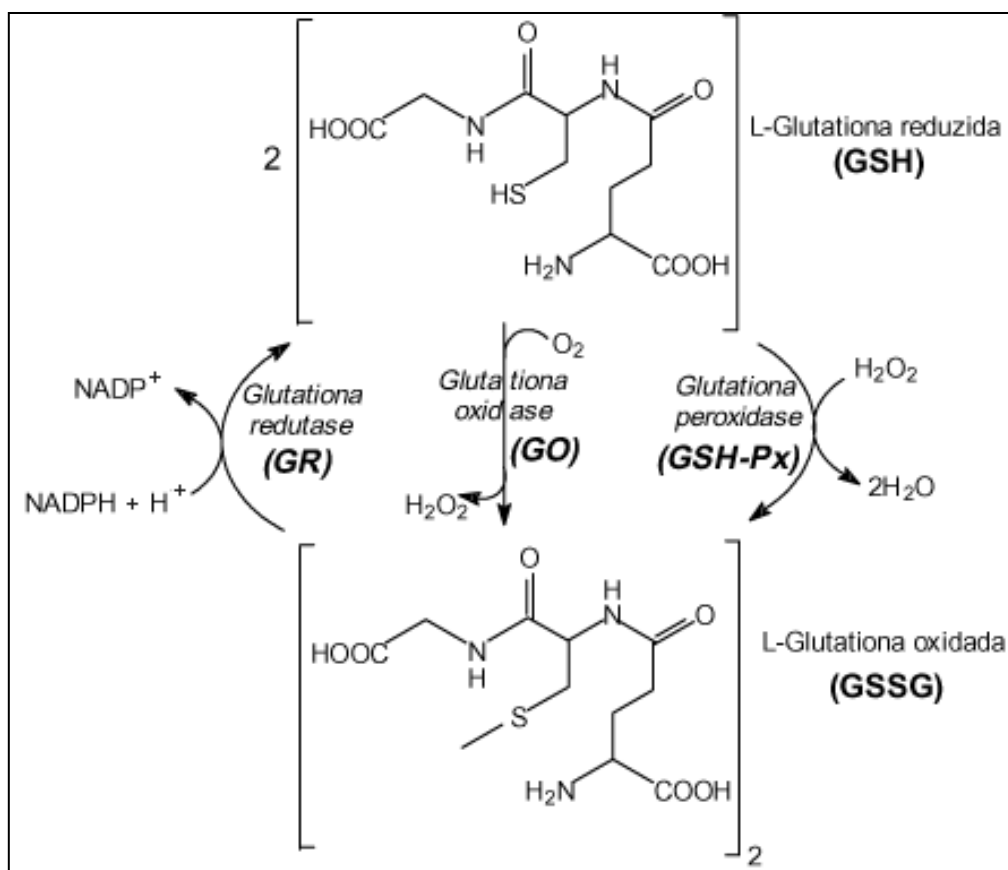
Fonte: MIHARA et al. (1980).

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

4.7.2. Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

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 17). 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, 2009).

Figura 17. Interconversão da glutathiona em suas duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).



Fonte: Adaptado de BALLATORI et al. (2009).

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

4.8 Determinação dos níveis de KIM-1 no sobrenadante de células renais HK2

Os níveis de KIM-1 foram determinados no sobrenadante de HK2 usando um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) comercial (R & D Systems, Inc - Cat. DY1750, Minneapolis, MN). Poços da placa de ELISA foram revestidos diluindo o anticorpo de captura (72 μ g/mL) para uma concentração de trabalho de 0,4 μ g/mL em PBS, obtendo-se o volume final de 100 μ L em cada poço. A placa foi selada e incubada

overnight à temperatura ambiente. Cada placa foi lavada duas vezes com 400 µL de tampão de lavagem (Tween-20 a 0,05% em PBS). As placas foram bloqueadas pela adição de 300 µL de BSA a 1% em PBS durante 2 horas. 100 µL de padrão de KIM-1 recombinante humano (nas concentrações de 0 a 20 ng / mL) e sobrenadante do cultivo das células HK2 foram adicionados aos seus respectivos poços e colocados temperatura ambiente durante 2 horas. A placa foi lavada novamente e 100 µl de anticorpo biotilado caprino anti-KIM-1 (400 ng/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 2 horas, o passo de lavagem foi repetido e, após, 100 µL de estreptavidina-HRP foram adicionados a cada poço e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após lavagem, 100 µL da solução de substrato foram adicionados a todos os poços e incubados à temperatura ambiente durante 7 minutos. A reação foi parada adicionando 50 de solução de paragem a todos os poços. A absorbância foi medida a 450 nm com uma correção de absorbância a 540 nm. A concentração de KIM-1 foi calculada com base na curva padrão e expressa em termos absolutos em ng/mL de sobrenadante.

4.9 Investigação da inibição da enzima NADPH-oxidase

No intuito de se avaliar a interação do Bisabolol com a enzima NADPH-oxidase, foi estudada a capacidade *in vitro* da enzima de converter o substrato em produtos na presença de Bisabolol e também foi investigada a interação teórica *in silico* do Bisabolol com a isoforma NOX4 da enzima.

4.9.1 Determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade enzimática de NADPH-oxidase, foi utilizado um kit comercial (Abcam®, Cambridge, UK) e respeitando as orientações do fabricante. Resumidamente, 4×10^6 células HK2 foram utilizadas para cada ensaio. Os grupos experimentais foram divididos em controle, que são as células não expostas ao BIS e grupos tratados com BIS (nas concentrações de 250 e 62,5 µM) por 2 horas, todos os testes foram realizados em duplicata. Em seguida, foram centrifugadas (4000 RPM, 5 minutos), lavadas com PBS gelado duas vezes e, em seguida, ressuspendidas em tampão de extração de NADP⁺/NADPH. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 60 °C por 30 minutos a fim de decompor o NADP⁺, restando apenas NADPH no meio reacional.

Finalmente, 50 μ L do sobrenadante de cada amostra foram adicionados a 50 μ L de mistura reacional em placas de 96 poços. As placas foram incubadas sob agitação a 37°C e lidas por espectrofotometria após 0, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos a 450 nm. Foi realizada a construção de uma curva-padrão, utilizando amostra referência fornecida pelo kit. As leituras de absorvância foram utilizadas para determinação da atividade enzimática nos grupos experimentais, seguindo as orientações do fabricante, indicando a concentração de NADPH (substrato) presente nas amostras.

4.9.2 *Docking* molecular

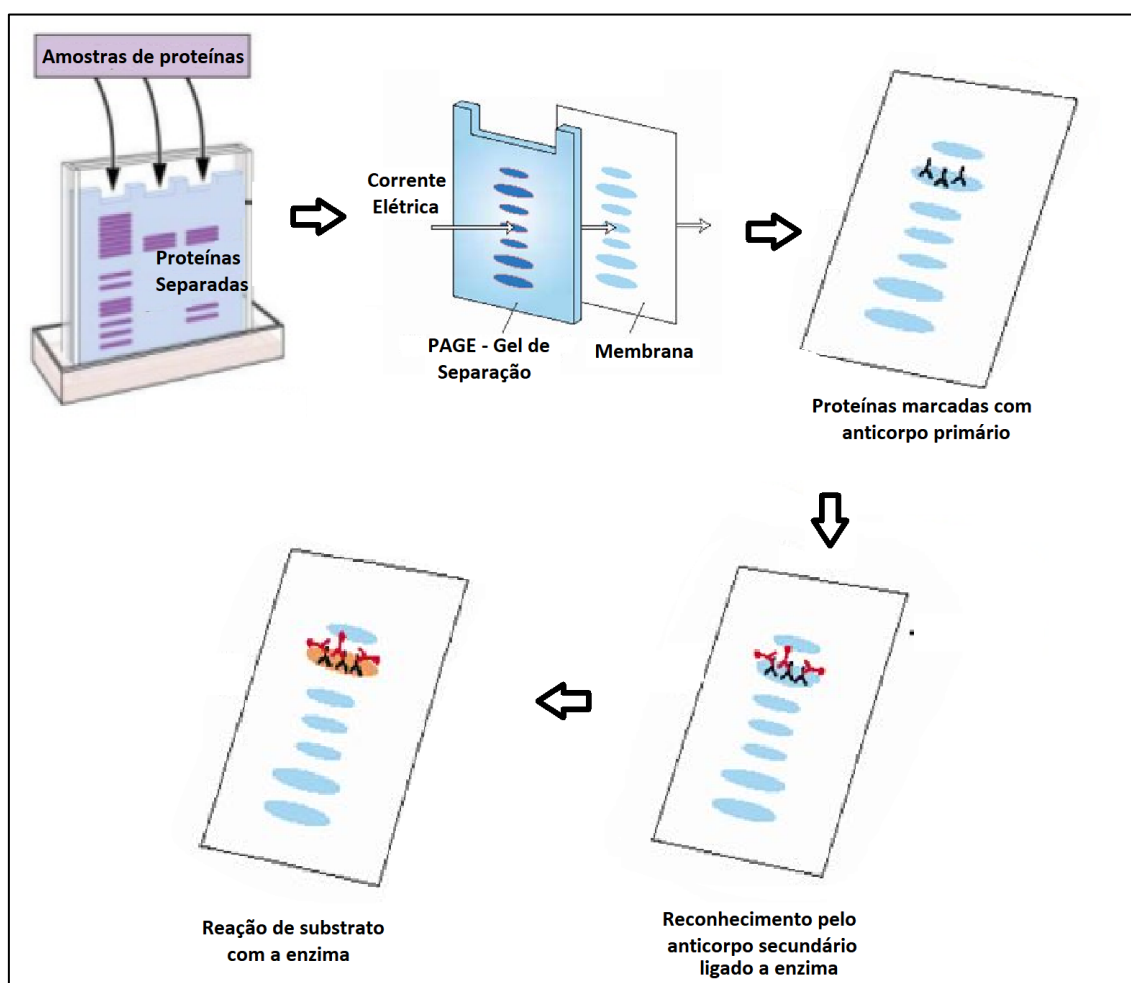
Os ensaios *in silico* foram realizados no Laboratório de Engenharia de Materiais e da Computação de Sobral (LEMCS), sob orientação do prof. Dr. Ricardo Santos. A avaliação da interação teórica do BIS com NADPH-oxidase foi realizada em comparação com o sítio ocupado pela Apocinina, um métoxi-catecol extraído de uma diversidade de plantas, a qual é um eficiente inibidor do complexo NADPH-oxidase e seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da agregação dos componentes enzimáticos e à oxidação catalisada por peroxidases (KANEGAE et al., 2010). Para isso, a estrutura tridimensional da subunidade p47 $phox$ da NADPH-oxidase (NOX4) (GenBank ID: P14598) foi obtida do RBSC Protein Data Bank, um website de livre acesso que contém informações sobre a estrutura tridimensional de diversas proteínas. A otimização geométrica da estrutura do (-)- α -Bisabolol (PUBCHEM CID 1549992) foi realizada utilizando um método semiempírico PM7 pelo programa MOPAC2012 (disponível em <http://openmopac.net>). A identificação dos potenciais sítios de ligação entre a molécula otimizada de BIS e NOX4 foi realizado pelo método de *docking* molecular, utilizando o programa *Autodocking* Vina (Molecular Graphics Lab). Nesse programa, é realizada a busca de todos os possíveis modos de ligação entre proteína-alvo e ligante. Cada possível conformação foi avaliada por escores baseados na energia, complementaridade e forças eletrostáticas. Gráficos moleculares foram construídos usando o software UCSF Chimera 1.8 package (PETTERSEN et al., 2004).

4.10 Western Blot

A identificação de proteínas em amostras é, com frequência, realizada através da técnica do Western blot. A técnica se baseia em duas etapas, cuja primeira é a separação

dos diferentes tipos de proteínas em uma cuba eletroforética, de acordo com seus pesos moleculares. A segunda etapa se caracteriza pela transferência das proteínas para uma membrana, permitindo a identificação destas utilizando-se um anticorpo que reconheça o epítopo da proteína de interesse, sendo, portanto, este um imunoensaio, uma representação das etapas do western blot está contida na figura 18.

Figura 18. Representação da análise de proteínas por Western blot.



Fonte: O autor.

Dessa forma, o presente trabalho utilizou a técnica do Western Blot a fim de analisar alterações na expressão da isoforma NOX4 da enzima NADPH-oxidase em células HK2 em condições normais e após passarem pelo modelo de I/R *in vitro*. Foi avaliado também se o tratamento com Bisabolol foi capaz de gerar alguma interferência no nível de expressão dessa enzima.

4.10.1 Extração e quantificação de proteínas

Visando a extração das proteínas das amostras, células HK2 em cultivo que foram submetidas ou não ao modelo de lesão por I/R e/ou foram tratadas com Bisabolol foram lavadas duas vezes com PBS gelado e, em seguida, adicionaram-se 300 µL de tampão RIPA (TrisHCl 50 mM; pH 7,4; NaCl 150 mM; deoxicolato de sódio 0,25%; NaF 10 µg/mL e EDTA 1 mM) gelado adicionado coquetel inibidor de protease (1:100 de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 2mM e o ortovanadato de sódio, um inibidor de fosfatase, a 1 mM). Em seguida, o material contido em placas de seis poços foi deslocado mecanicamente com um cell lifter nesta e transferiu-se o conteúdo para tubos tipo eppendorf. As amostras ficaram em gelo por 2 horas e a cada 20 min eram agitadas no vortex e sonicadas por 5 min, visando garantir a lise completa das células. Ao final, o material foi centrifugado a 8000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi separado e conservado a -20°C para posterior quantificação das proteínas totais.

A quantificação de proteínas totais foi realizada por método colorimétrico (LOWRY et al., 1951) segundo metodologia do fabricante do kit comercial (*BioRad Laboratories*). Para calibração do método foi realizada uma curva padrão de proteína utilizando a albumina sérica bovina (BSA) em diluições que iam de 2,5 a 0,25 mg/mL, diluída em tampão RIPA. Em seguida, 5 µL de cada amostra ou BSA diluída, foram colocados em triplicata na placa de 96 poços. Adicionou-se, então, 25 µL da solução A e 200 µL do reagente B, ambos contidos no kit comercial. A placa foi incubada no escuro sob agitação leve por 10 min e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. A concentração de proteína em cada amostra foi determinada por meio de regressão linear da curva gerada pelo BSA, ao ser plotado o gráfico da absorbância versus quantidade de proteínas.

Precedendo os experimentos, os volumes das amostras foram ajustados à concentração de 1 mg de proteína/ml e desnaturadas em banho a 96°C em tampão de amostra contendo SDS (dodecilsulfato de sódio) por 5 minutos.

4.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência

Para a separação das proteínas por peso molecular, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em sistema vertical BioRad Laboratories mini-PROTEAN® Tetra Cell, conforme padronizado anteriormente (TOWBIN et al., 1979). Foi utilizado um gel composto por 10% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH

8,8 (BioRad Laboratories). Foi adicionado acima deste gel, um “*stacking gel*”, ou gel de empacotamento com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

Precedendo o início da corrida eletroforética, em um dos poços do gel foi adicionado um marcador de peso molecular (Full-Range Rainbow Marker: 12 – 225 kDa; GE Healthcare) e nos demais poços foram adicionados 20 µL da proteína extraída desnaturada de cada amostra (correspondente a 20 µg de proteína total por poço). Foi realizada a separação utilizando um potencial elétrico gerado por uma voltagem constante de 125 V e amperagem livre (Fonte elétrica modelo PowerPac™, modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora e meia, até o marcador de peso molecular se mostrar completamente separado no gel.

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana nitrocelulose (BioRad Laboratories). A membrana foi previamente molhada em metanol e colocada em contato com o gel em suporte apropriado para a eletrotransferência pelo método de imersão (BioRad Laboratories, modelo MiniTrans Plot Modulo), contendo papéis de filtro e esponjas molhados com tampão de transferência gelado (Tris-HCl 25 mM; pH 8,3; glicina 192 mM e metanol 20%). A eletrotransferência foi realizada sob diferença de potencial elétrico gerado por amperagem constante de 400 mA, voltagem livre e temperatura de 4 °C durante 2 h.

4.10.3 Imunodeteção

Com o término da transferência, as membranas ficaram incubadas *overnight* com solução de BSA 5% em tampão Tris salina contendo 0,1% de tween 20 (TBST, pH 8,0) visando bloqueio de interações inespecíficas do anticorpo com a membrana. Em seguida, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo primário de reconhecimento da isoforma Nox4 (~65 kDa) da NADPH-oxidase (Abcam, Cambridge, UK) diluído 1:1000 em BSA 5% em TBST. O anticorpo primário anti β-actina (Abcam, Cambridge, UK) foi utilizado como padrão endógeno de proteína constitutiva.

As membranas foram novamente submetidas a 5 lavagens com TBST 1x sob agitação moderada (5 minutos/lavagem) e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com enzima peroxidase (Abcam, Cambridge, UK), diluído na proporção de 1:3000 em BSA 5% em TBST. Para detecção por quimioluminescência, foi utilizado o reagente Clarity™ ECL (BioRad Laboratories). O reagente foi incubado com

as membranas no escuro por 5 minutos e a aquisição de imagens foi realizada no equipamento ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad Laboratories). Para análise das imagens foi utilizado o Software Image Lab™ Software versão 5.1 (BioRad Laboratories). Após a normalização com a expressão da proteína constitutiva β -actina, foi atribuída à média do grupo controle um score de valor 1,0 e os resultados dos demais grupos foram expressos como unidades arbitárias de expressão relativa.

4.11 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).

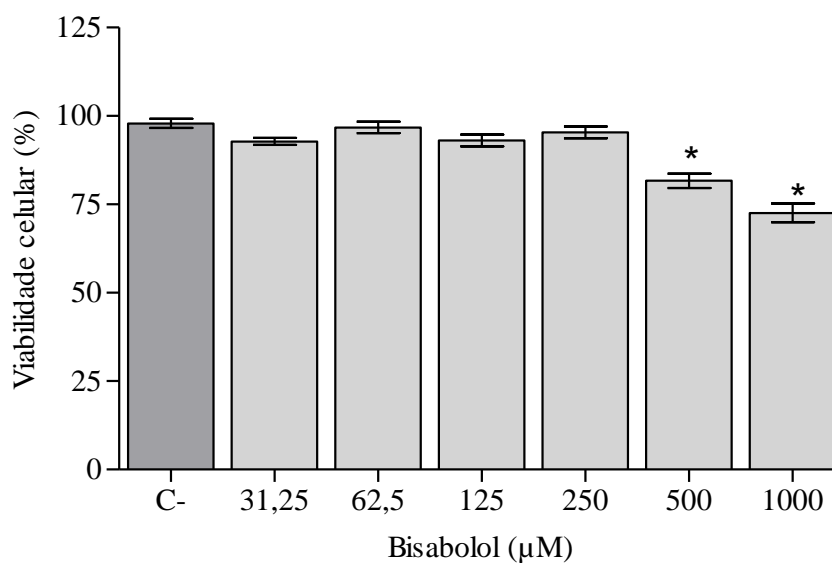
Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Ensaios de viabilidade celular

Inicialmente, com o objetivo de avaliar a citotoxicidade do Bisabolol nas células renais HK2, foi realizado o ensaio MTT visando traçar uma faixa de concentrações adequadas para trabalho, ou seja, concentrações que não sejam consideradas tóxicas. Foi observado que, nas concentrações avaliadas, o Bisabolol diminuiu a viabilidade celular nas concentrações de 500 e 1000 μM em condições normais de aerobiose, portanto, essas concentrações foram descartadas dos ensaios posteriores (Figura 19 e tabela 1).

Figura 19. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade do Bisabolol em células renais HK2.



Os resultados são mostrados como média \pm SEM. $p < 0,05$ comparado aos grupos de controle de veículo. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, C- = Controle negativo; * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1. Percentual de viabilidade das células renais HK2 submetidas a I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).

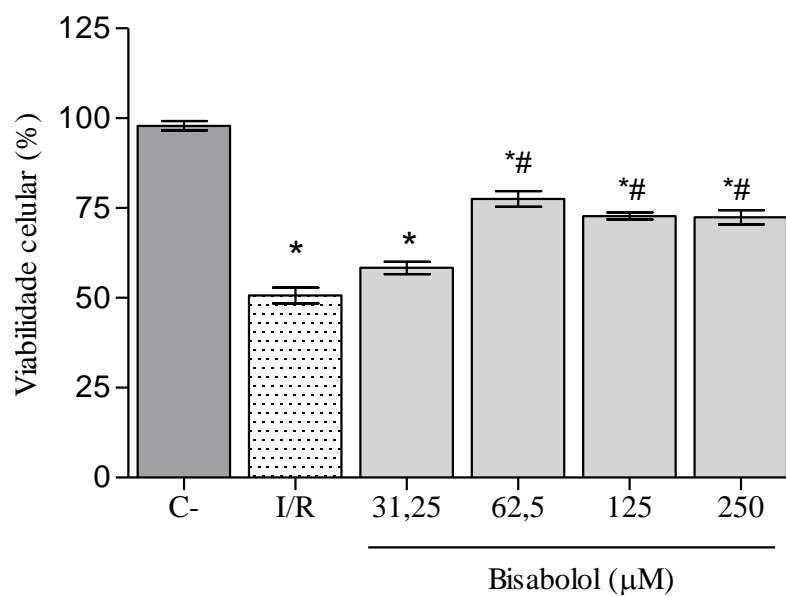
	Viabilidade Celular (%)
Controle negativo	97,9 \pm 1,3
Bisabolol 31,25 μM	92,8 \pm 0,9
Bisabolol 62,5 μM	96,7 \pm 1,2
Bisabolol 125 μM	93,2 \pm 1,5
Bisabolol 250 μM	95,4 \pm 1,2
Bisabolol 500 μM	81,7 \pm 1,8*
Bisabolol 100 μM	72,6 \pm 1,5*

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A hipóxia associada à rápida oxigenação e consequente desequilíbrio redox é uma característica pronunciada de lesões por isquemia/reperfusão. Nesse contexto, na figura 20 e tabela 2 é possível observar que a I/R foi capaz de reduzir a viabilidade celular para aproximadamente 50% quando comparado ao controle. Além disso, células que foram submetidas a I/R e foram subsequentemente tratadas com Bisabolol mostraram um efeito protetor, indicado pelo aumento ou manutenção da viabilidade, especialmente na concentração de 62,5 μM , que após 24 horas de tratamento mostrou uma viabilidade de 77,5% em relação ao grupo controle, sendo considerada a mais baixa concentração a apresentar efeito protetor. Na concentração de 250 μM apresentou-se uma viabilidade de 72,5%; então essas duas concentrações foram escolhidas para os próximos experimentos.

Figura 20. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células renais HK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após a exposição ao Bisabolol.



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Percentual de viabilidade das células renais HK2 submetidas a I/R e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).

	Viabilidade Celular (%)
Controle negativo	98,3 \pm 1,3
Isquemia/reperfusão	50,7 \pm 2,1*
Bisabolol 31,25 μM	58,3 \pm 1,7#
Bisabolol 62,5 μM	77,5 \pm 1,9*#
Bisabolol 125 μM	72,8 \pm 0,9*#
Bisabolol 250 μM	72,5 \pm 1,8*#

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Ensaio por citometria de fluxo

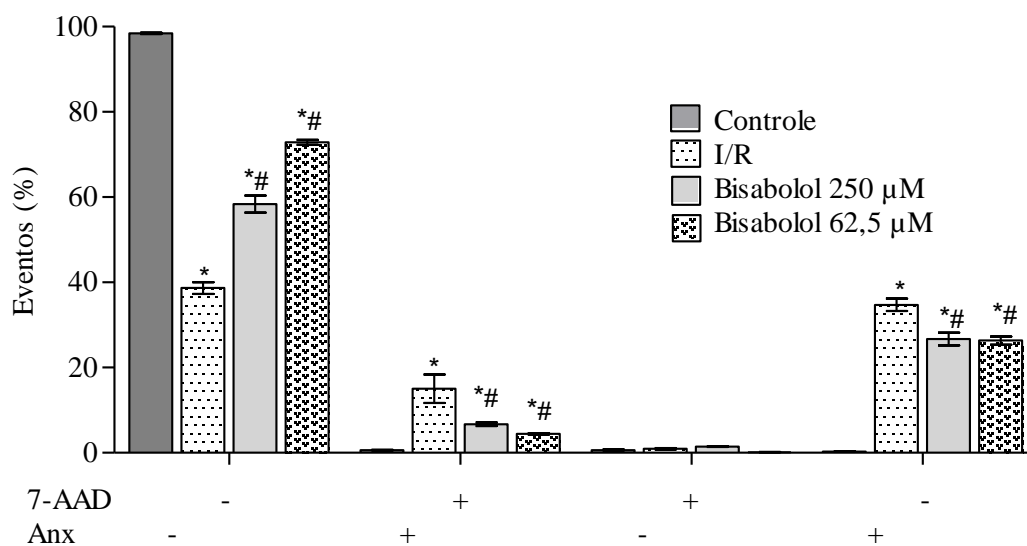
5.2.1 Avaliação do mecanismo de morte celular

A morte dos diversos tipos celulares que compõem o tecido renal é o processo envolvido com o estabelecimento da LRA por I/R. De modo a avaliar o mecanismo de morte celular envolvido no modelo de I/R utilizado, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo utilizando marcação com 7AAD/Anexina V-PE, cujos resultados numéricos são representados na figura 21 e expressos na tabela 3.

As células submetidas a I/R mostraram marcação significativa com Anexina-V (7AAD⁻/Anx⁺) (35,9% dos eventos) quando comparadas ao controle, indicando que o mecanismo de morte celular poderia ter ocorrido por apoptose, uma vez que a anexina reconhece a fosfatidilserina externalizada como sinalização da morte celular programada. Além disso, uma população de células duplamente marcadas (7AAD⁺/Anx⁺) estava presente no grupo I/R, indicando apoptose tardia ou necrose secundária (16,17% dos eventos); o gráfico de densidade comparativa são mostrados na Figura 22. Nas concentrações utilizadas, o Bisabolol foi capaz de reduzir a morte celular, pois o grupo

tratado com 250 μM de Bisabolol reduziu a população marcada com Anexina-V em 26,9% dos eventos e a população de células duplamente marcadas em 6,9%. Adicionalmente, o grupo tratado com Bisabolol 62,5 μM apresentou um padrão semelhante, reduzindo a população marcada com Anexina V para 26,3% e a população duplamente marcada para 4,4%.

Figura 21. Representação do ensaio de avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por Anx (anexina V).



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

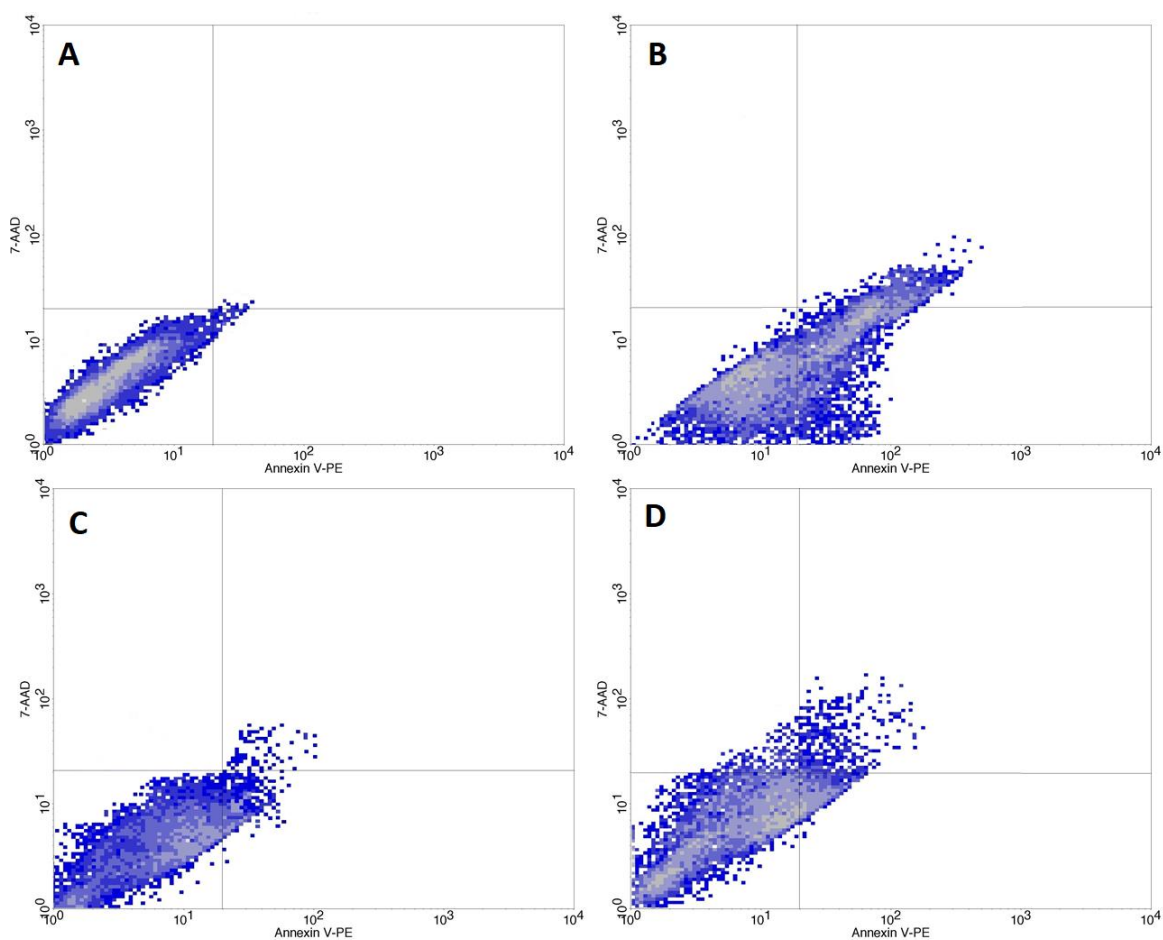
Tabela 3. Análise do percentual de células marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina) e/ou anexina V no ensaio de citometria de fluxo, usando células submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol (μM).

Eventos (%)	7AAD ⁻ /Anx ⁻	7AAD ⁺ /Anx ⁺	7AAD ⁺ /Anx ⁻	7AAD ⁻ /Anx ⁺
Controle	98,4 ± 0,8	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,05	0,4 ± 0,09
I/R	39,7 ± 1,2*	16,2 ± 1,9*	0,9 ± 0,06	35,8 ± 1,2*
Bisabolol 250 μM	58,9 ± 1,7*#	6,9 ± 0,3*#	1,5 ± 0,1	26,9 ± 1,0*#
Bisabolol 62,5 μM	72,6 ± 2,0*#	4,4 ± 0,09*#	0,4 ± 0,05	26,3 ± 0,6*#

BIS = (-)- α -Bisabolol; I/R = Isquemia/Reperusão; 7AAD⁻/Anx⁻ = células viáveis; 7AAD⁺/Anx⁻ = células necróticas; 7AAD⁻/Anx⁺ = células apoptóticas; 7AAD⁺/Anx⁺ = células em apoptose tardia. Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle; #p<0,05 em relação ao grupo I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22. Gráficos *density plot* representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD (7-aminoactinomicina), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V.



(A) Grupo controle; (B) grupo Isquemia/Reperusão (I/R); (C) células tratadas com Bisabolol a 250 μM ; (D) células tratadas com Bisabolol a 62,5 μM .

Fonte: Elaborado pelo autor.

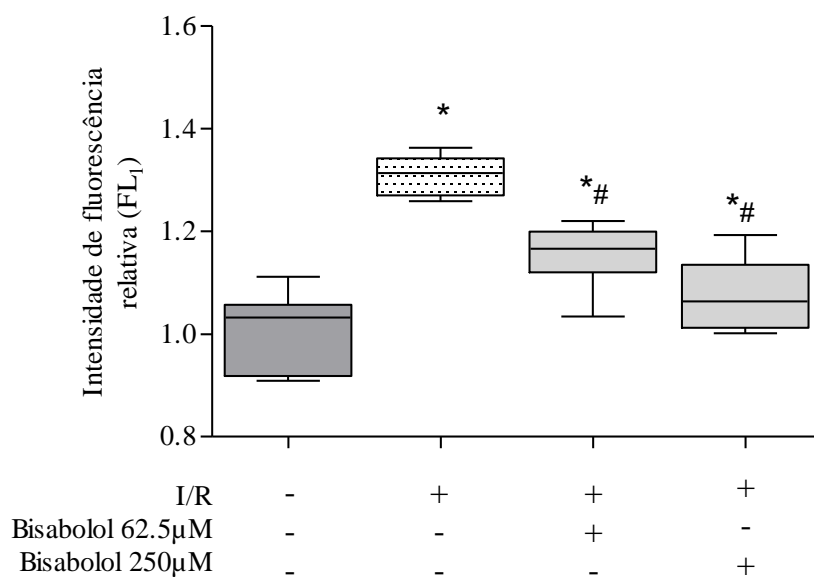
5.2.1 Análise da produção de ERO citoplasmáticas.

Uma das principais causas de morte celular por apoptose é o estresse oxidativo causado pelo acúmulo intracitoplasmático de ERO, o que leva à oxidação de lipídios de membrana, degradação do DNA, formação de corpos apoptóticos e Apoptose. Nesse sentido, a aferição da produção de ERO intracitoplasmática foi realizada através da medição da fluorescência relativa à oxidação do DCFH-DA.

Inicialmente, a figura 23 e a tabela 4 mostram, em termos de intensidade de fluorescência relativa, que o protocolo I/R foi capaz de aumentar a produção de ERO em

30% dentro da célula. Além disso, o tratamento com Bisabolol após I/R reduziu essa elevação para 15,1% no grupo de 250 μM e para 7,4% no grupo de 62,5 μM . Histogramas representativos das populações celulares são mostrados nas figuras 24 e 25.

Figura 23. Análise do estresse oxidativo e produção de ERO citoplasmáticas em células renais HK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando o DCFH-DA.



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

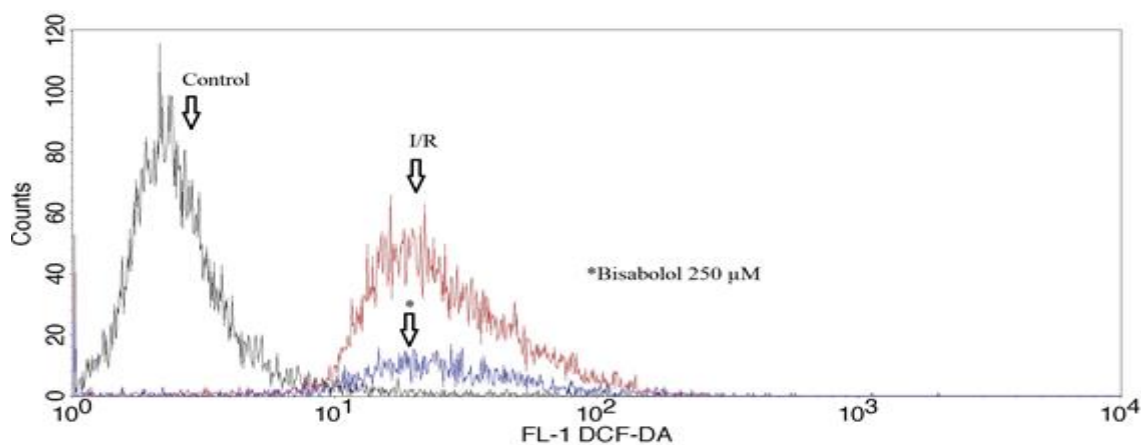
Tabela 4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células renais HK2 submetidas ao modelo de I/R e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol.

	Controle	I/R	31,25 μ M	62,5 μ M
IFR	1,00 \pm 0,02	1,31 \pm 0,01*	1,15 \pm 0,02*#	1,07 \pm 0,02*#

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo I/R. I/R = Isquemia/reperfusão.

Fonte: Elaborado pelo autor.

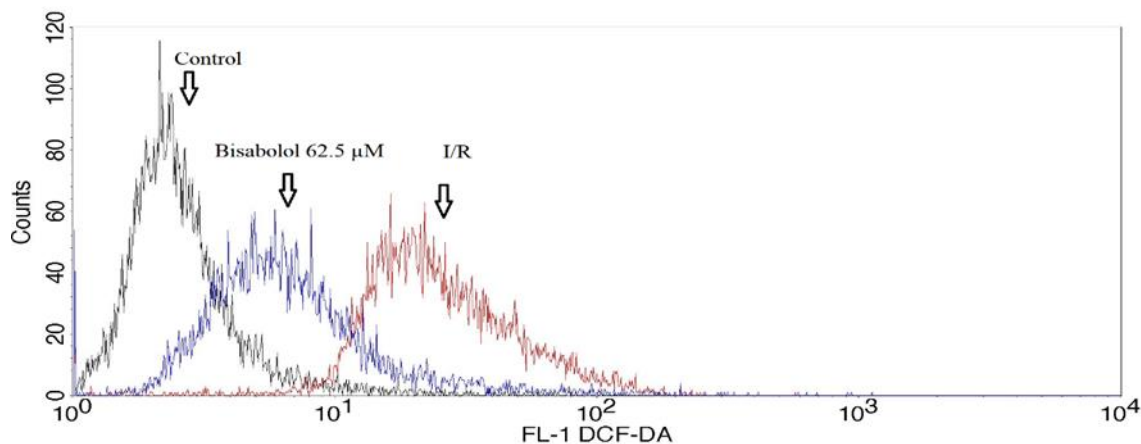
Figura 24. Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentando o grupo tratado com Bisabolol na concentração de 250 μ M.



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25. Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentando o grupo tratado com Bisabolol na concentração de 62,5 μ M.



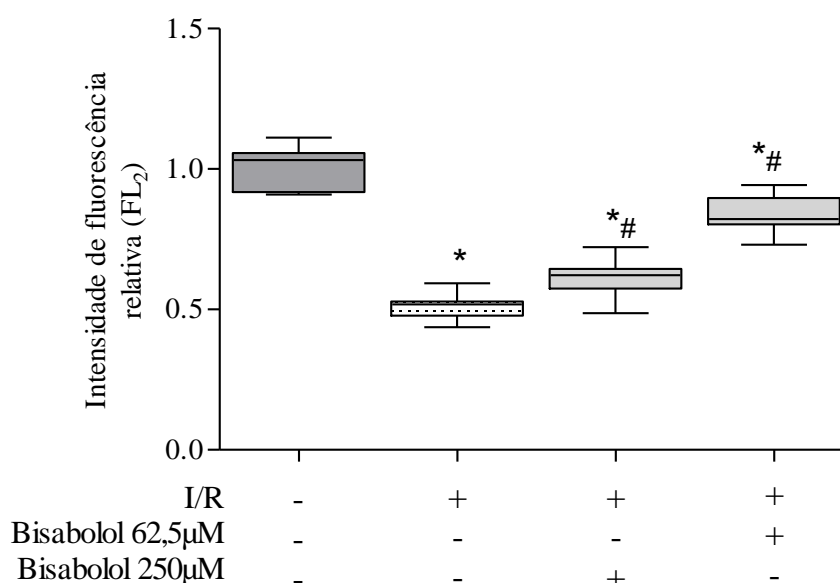
Estão apresentados o grupo controle, I/R (isquemia/reperfusão) e tratado com Bisabolol 62,5 μ M. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Situações de hipóxia ou acúmulo de ERO podem levar à disfunção mitocondrial, especialmente no contexto do potencial elétrico transmembrana, essencial para a respiração celular. O $\Delta\Psi_m$ foi medido usando uma sonda fluorescente chamada Rhodamine-123. A figura 26 e a tabela 5 mostram os resultados em termos de intensidade de fluorescência relativa. Os dados permitem observar que o grupo I/R mostrou aproximadamente apenas metade do potencial mitocondrial comparado ao grupo controle, indicado pela diminuição no acúmulo e, conseqüentemente, na marcação de Rho-123. Além disso, o Bisabolol aproximou o $\Delta\Psi_m$ dos grupos tratados com o do grupo controle. O grupo tratado com Bisabolol 250 μ M apresentou 61,2 % de $\Delta\Psi_m$ e o grupo tratado com Bisabolol 62,5 μ M apresentou um resultado melhor, aumentando $\Delta\Psi_m$ para 83,5 % com relação ao controle. Histogramas representativos das populações celulares são mostrados nas Figuras 27 e 28.

Figura 26. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células renais HK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

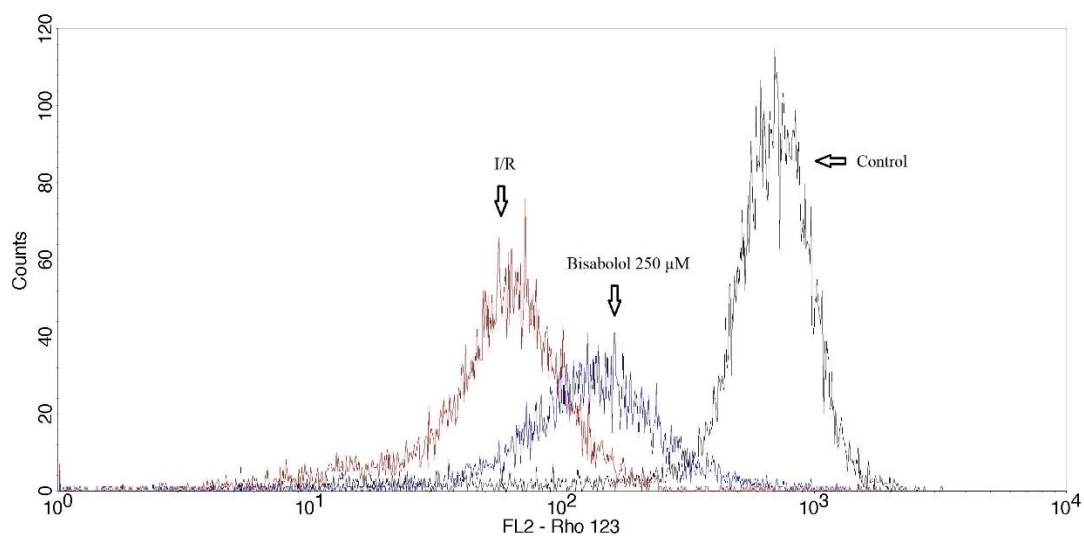
Tabela 5. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células renais HK2 submetidas ao modelo de I/R e tratadas com diferentes concentrações de Bisabolol.

	Controle	I/R	Bisabolol 31,25 μ M	Bisabolol 62,5 μ M
IFR	1,00 \pm 0,02	0,51 \pm 0,01*	0,61 \pm 0,01*#	0,83 \pm 0,02*#

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo I/R. I/R = Isquemia/reperfusão.

Fonte: Elaborado pelo autor.

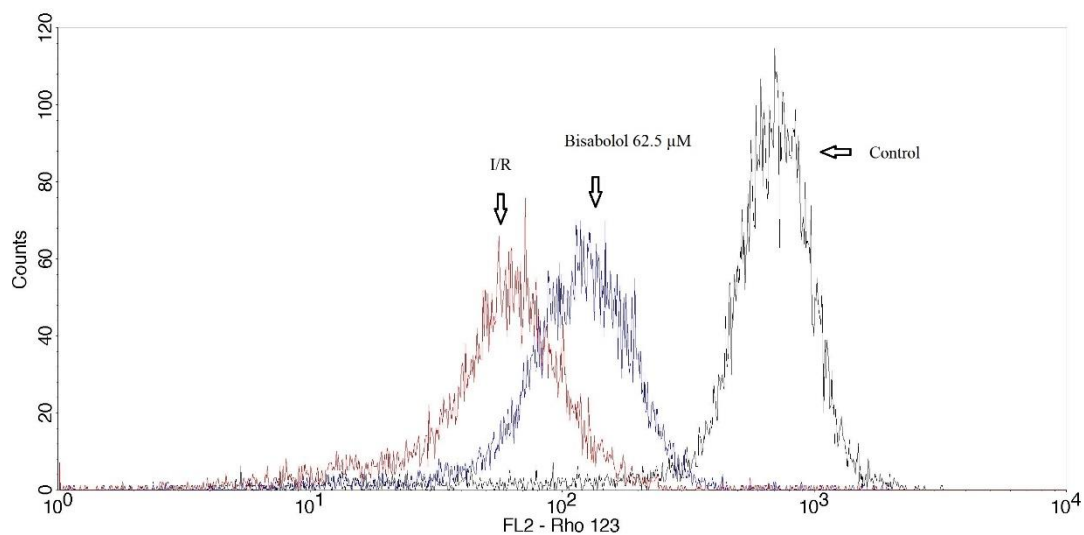
Figura 27. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com Bisabolol na concentração de 250 μM .



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com Bisabolol na concentração de 62,5 μM .



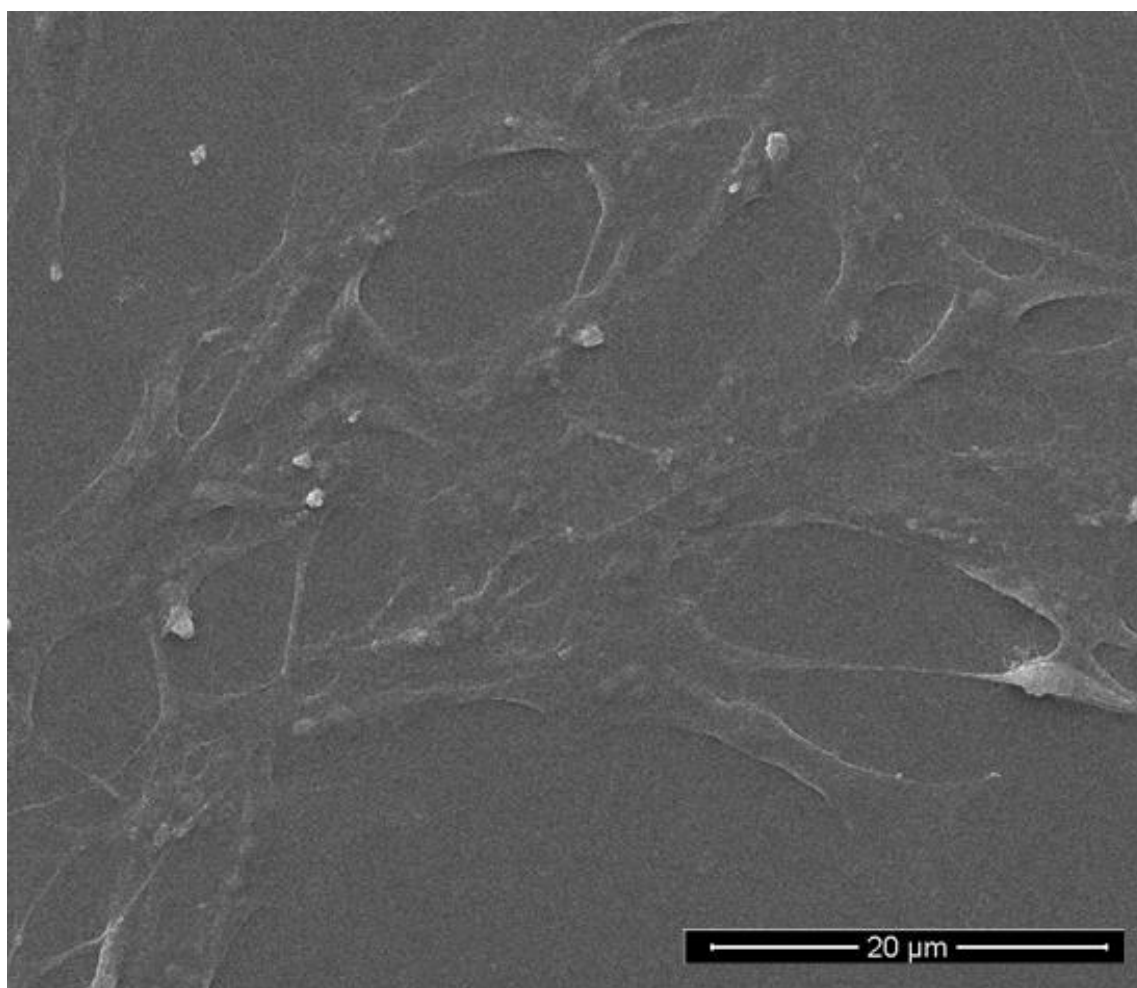
Estão apresentados o grupo controle, I/R (isquemia/reperfusão) e tratado com Bisabolol 62,5 μM . Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura de células renais HK2

No sentido de associar os resultados celulares e bioquímicos obtidos com a avaliação do dano celular direto, alterações qualitativas nas células HK2 foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostrado nas Figuras 29, 30, 31 e 32. Células normais foram utilizadas como controle, enquanto as células submetidas ao protocolo de lesão de I/R apresentaram alterações ultraestruturais, como retração do volume celular, formação de corpos apoptóticos por fragmentação citoplasmática e diminuição adesão à matriz extracelular. Os tratamentos com Bisabolol nas concentrações de 250 e 62,5 μ M foram capazes de reverter parcialmente as alterações.

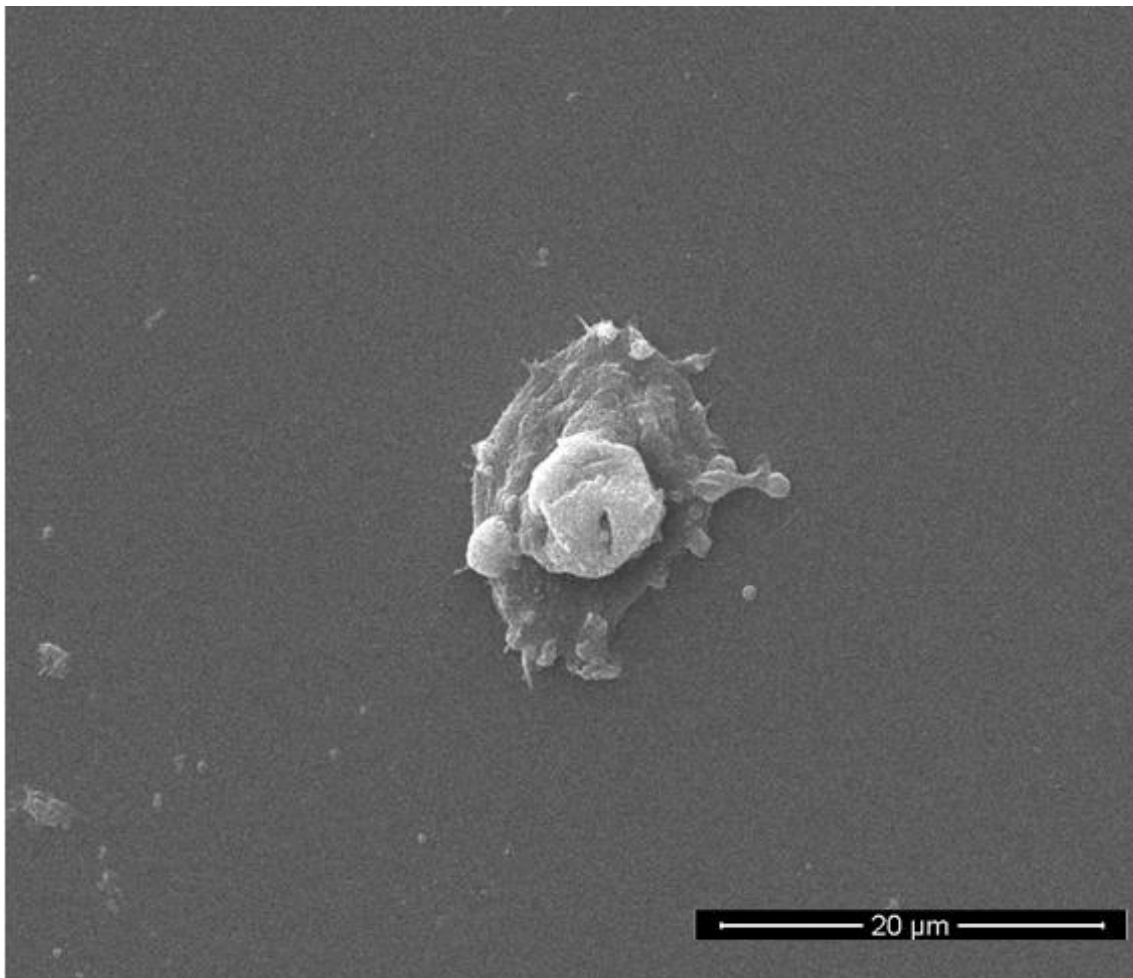
Figura 29. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células renais HK2 do grupo controle.



As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ($\times 50.000$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

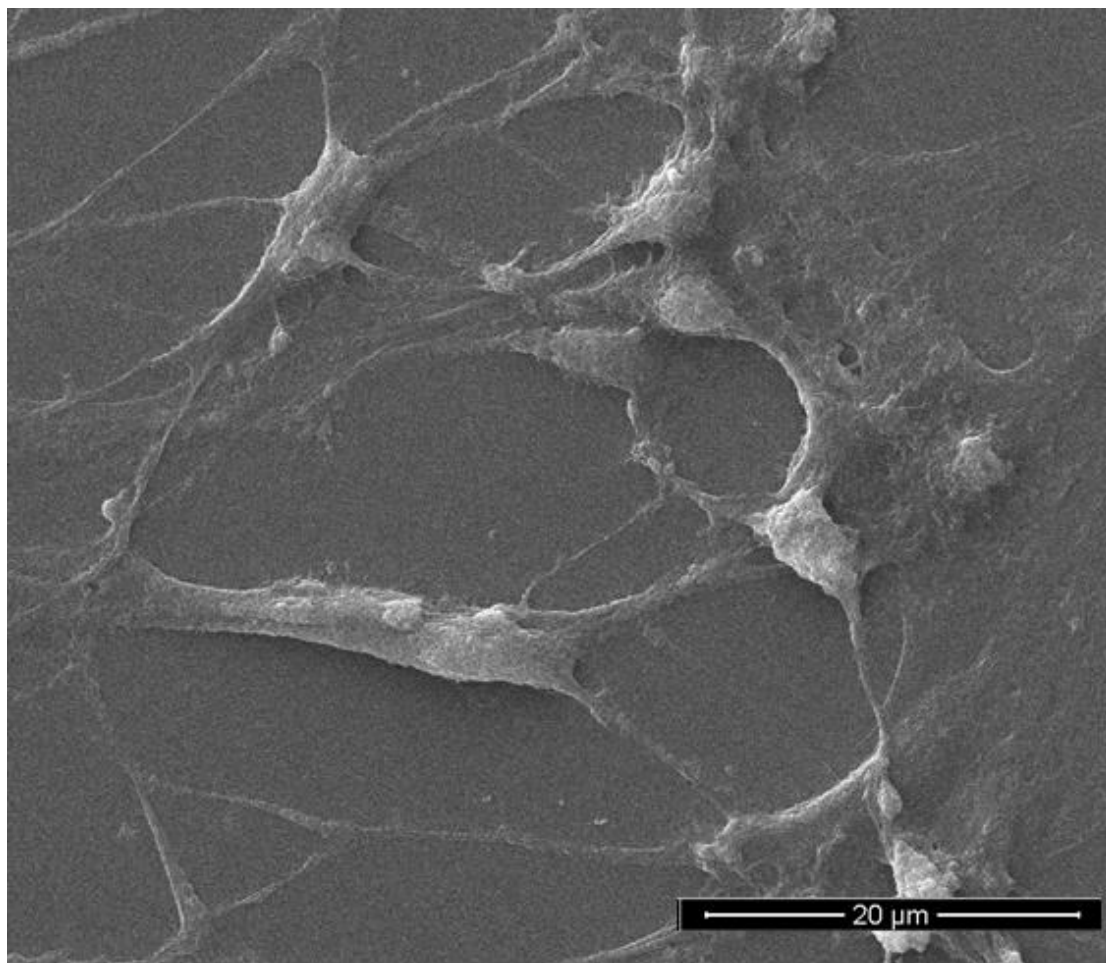
Figura 30. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células renais HK2 submetidas à isquemia/reperfusão.



As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ($\times 50.000$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

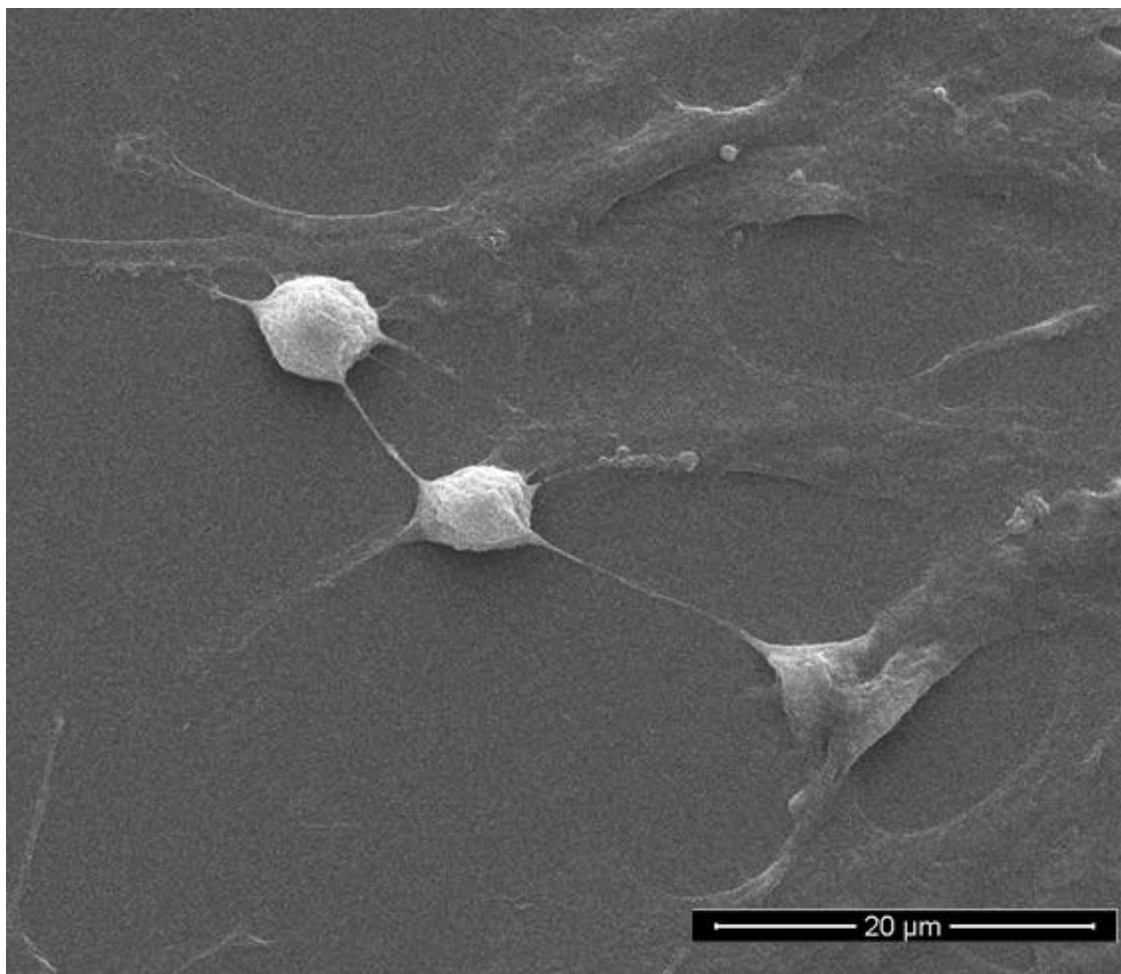
Figura 31. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células renais HK2 submetidas à isquemia/reperfusão e tratadas com Bisabolol na concentração de 250 μM .



As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ($\times 50.000$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células renais HK2 submetidas à isquemia/reperfusão e tratadas com Bisabolol na concentração de 62,5 μM .



As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ($\times 50.000$).

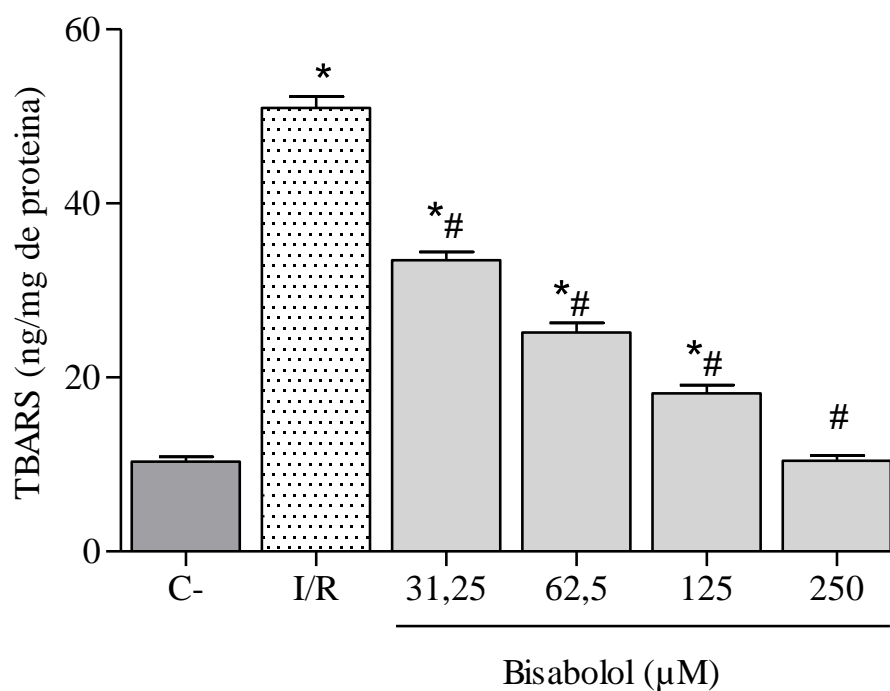
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Determinação dos níveis de TBARS e GSH

A fim de avaliar a presença de ERO e os danos causados pelo estresse oxidativo nas células, os níveis de TBARS e GSH foram medidos. No grupo I/R foi observado um aumento significativo da concentração de TBARS (Figura 33), e uma diminuição nos níveis da forma reduzida da glutathiona (GSH) (Figura 34) quando comparados com o controle. Além disso, o tratamento com Bisabolol foi capaz de reduzir essas alterações de forma dependente da concentração, sugerindo que o Bisabolol tem um efeito antioxidante direto nas células HK2, impedindo a oxidação de lipídios, especialmente os fosfolipídios

da membrana e aumentando as defesas antioxidantes das células, como é o caso da GSH. Os dados numéricos estão expressos na tabela 6.

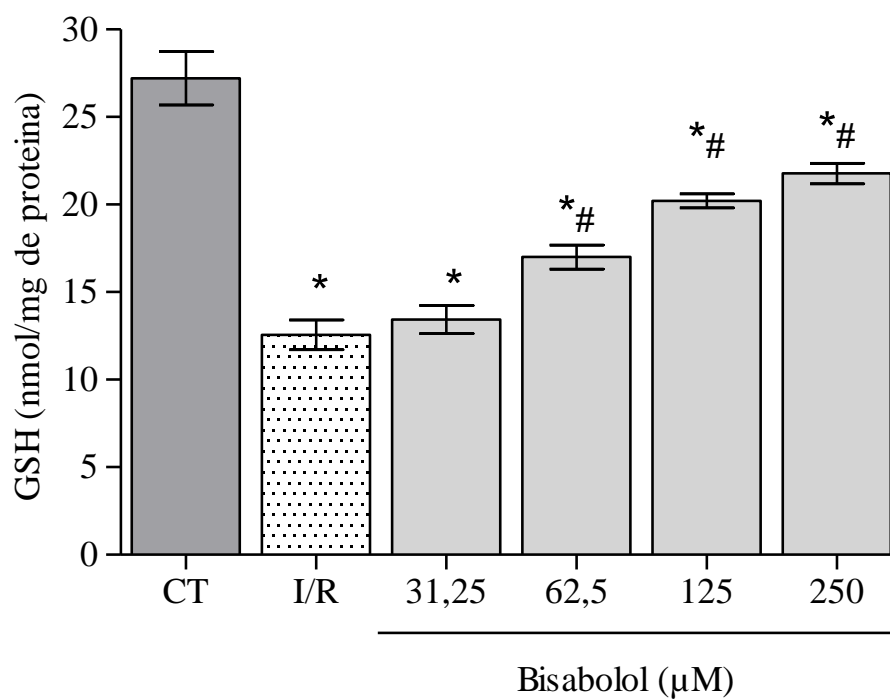
Figura 33. Avaliação do estresse oxidativo através da medida das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células renais HK2.



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34. Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em células renais HK2.



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6. Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de glutathiona reduzida (GSH) em células renais HK2.

	TBARS (ng/mg)	GSH (nmol/mg)
Controle negativo	10,3 ± 0,5	27,2 ± 1,5
Isquemia/reperfusão	50,1 ± 1,3*	12,6 ± 0,8*
Bisabolol 31,25 µM	33,4 ± 0,9*#	13,45 ± 0,8*
Bisabolol 62,5 µM	25,2 ± 1,1*#	17,0 ± 0,7*#
Bisabolol 125 µM	18,2 ± 0,9*#	20,2 ± 0,4*#
Bisabolol 250 µM	10,4 ± 0,6*#	21,8 ± 0,6*#

Os dados estão expressos como média padrão ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs. I/R.

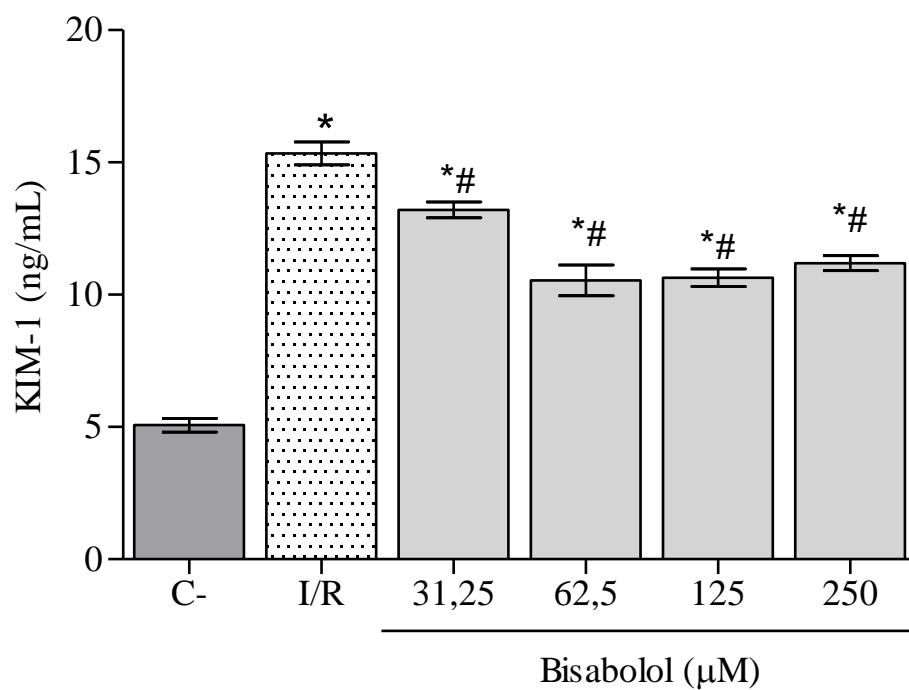
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Mensuração dos níveis de KIM-1

Células tubulares proximais são potencialmente propensas a sofrer os danos oxidativos por serem acentuadamente funcionais. Com o objetivo de analisar o dano específico nas células renais, avaliou-se a liberação de KIM-1 no sobrenadante da cultura, uma vez que, sabendo-se que este é um tipo de receptor fosfatidilserina, pode-se inferir que sua liberação apresente uma especificidade relacionada ao dano epitelial no túbulo proximal.

A figura 35 e a tabela 7 mostram que o protocolo de I/R foi capaz de triplicar os níveis basais de KIM-1 encontrados no grupo controle. Adicionalmente, O Bisabolol reduziu os níveis de KIM-1 no sobrenadante em todas as concentrações avaliadas, indicando que o tratamento pode proteger as células renais tubulares dos danos causados pela I/R.

Figura 35. Níveis de Molécula de Lesão Renal (KIM-1) no sobrenadante de células renais HK2.



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7. Níveis de Molécula de Lesão Renal (KIM-1) no sobrenadante de células HK2.

	KIM-1 (ng/mL)
Controle negativo	5,1 ± 0,2
Isquemia/reperfusão	15,3 ± 0,4*
Bisabolol 31,25 µM	13,2 ± 0,3*#
Bisabolol 62,5 µM	10,5 ± 0,6*#
Bisabolol 125 µM	10,6 ± 0,3*#
Bisabolol 250 µM	11,2 ± 0,3*#

Os dados estão expressos como média padrão ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs. I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

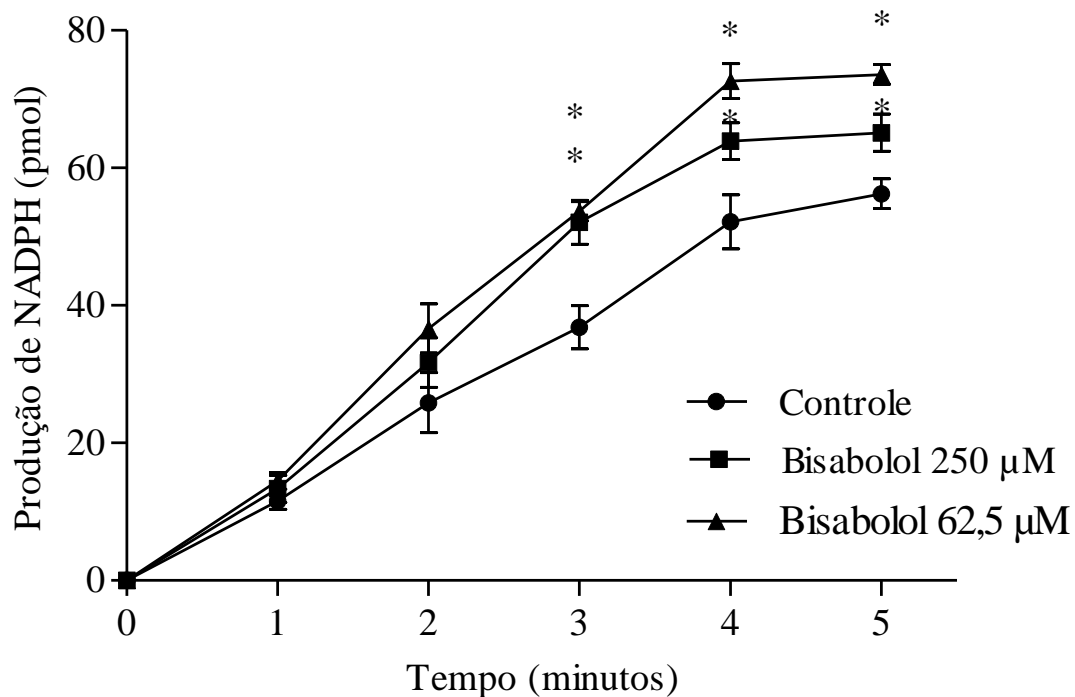
5.6 Inibição da enzima NADPH-oxidase

Substâncias antioxidantes, no microambiente celular, podem agir diretamente nas ERO pré-formadas ou prevenindo a formação destas em vias enzimáticas. Visando compreender melhor o mecanismo de proteção contra os danos relacionados à I/R, a inibição da enzima NADPH-oxidase foi investigada, uma vez que esta é uma das principais fontes de ERO em condições fisiológicas e patológicas no epitélio tubular. Para tanto, foram utilizadas duas metodologias: a primeira foi a avaliação da atividade enzimática *in vitro* através da medição da produção do substrato NADPH; a segunda foi a análise *in silico* do acoplamento molecular visando analisar a interação molecular do Bisabolol com a enzima.

5.6.1 Ensaio de avaliação da atividade enzimática

NADPH exerce um importante papel na regulação do equilíbrio redox nas células e previne contra danos oxidativos, portanto o NADPH funciona como um antioxidante endógeno. Como demonstrado na figura 36 e na tabela 8, em nossos experimentos, o Bisabolol nas concentrações estudadas mostrou-se capaz de induzir a produção de NADPH possivelmente através da inibição de sua oxidação pela enzima NADPH-oxidase, indicando, portanto, um potencial antioxidante e protetor no contexto da lesão renal por isquemia/reperfusão.

Figura 36. Efeito do Bisabolol sobre a produção de NADPH em células renais HK2.



Os dados são expressos como média \pm SEM. Os dados analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8. Produção de NADPH em células renais HK2 na presença de Bisabolol.

Tempo (minutos)	Controle	BIS 250 μ M	BIS 62,5 μ M
1	11,5 \pm 0,02	13,3 \pm 0,09	14,5 \pm 0,03
2	25,8 \pm 0,2	31,7 \pm 0,4	36,6 \pm 0,3
3	36,8 \pm 0,4	52,1 \pm 0,3*	53,7 \pm 0,4*#
4	52,1 \pm 0,3	63,9 \pm 0,6*	72,6 \pm 0,9*#
5	56,2 \pm 0,7	65,1 \pm 0,5*	73,7 \pm 0,3*#

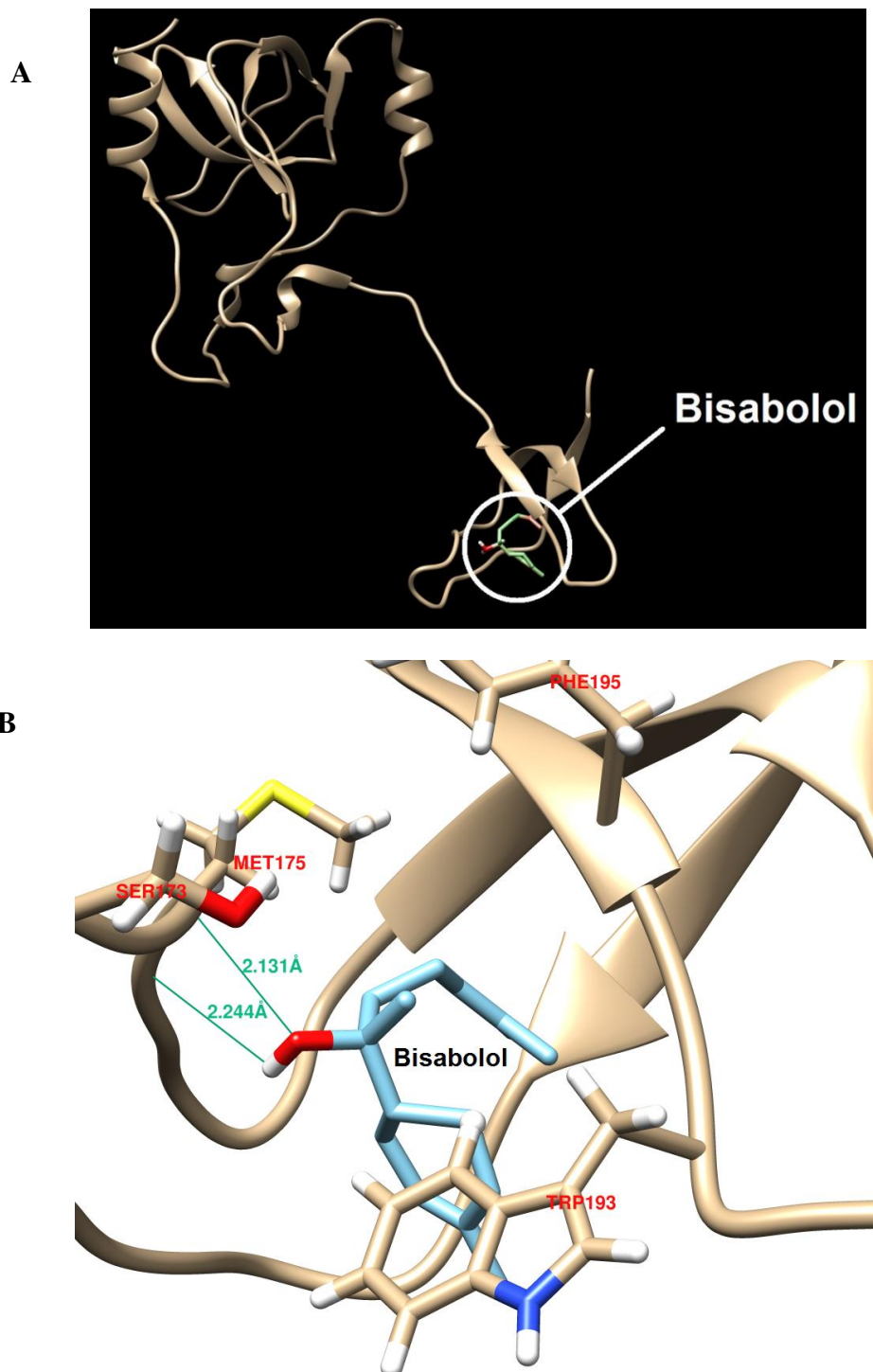
Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle; #p<0,05 em relação ao grupo I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.2 Ensaio de *Docking* molecular

No ensaio *in silico* de previsão teórica por *docking* molecular, o Bisabolol interagiu com o domínio SH3A, contido no sítio p47phox presente na isoforma Nox4 e que é o mesmo sítio de ligação da apocinina, inibidor enzimático amplamente descrito na literatura. A figura 37 apresenta detalhe do sítio de ligação do Bisabolol com a enzima, mostrando os principais resíduos envolvidos (considerando uma distância de 2.5 Å) e a presença de duas ligações de hidrogênio entre o ligante e o resíduo de metionina MET175. Adicionalmente, os principais resíduos envolvidos são metionina (MET175), serina (SER173), fenilalanina (PHE195) e triptofano (TRP193), presentes no sítio catalítico da enzima, sugerindo que essas interações com o Bisabolol podem interferir na atividade da enzima NADPH-oxidase.

Figura 37. Simulação de acoplamento molecular do Bisabolol com a isoforma NOX4 por *Docking* molecular.



(A) Representação do acoplamento molecular do Bisabolol com a isoforma NOX4 da enzima NADPH-oxidase; (B) indicação em perspectiva da interação do Bisabolol com os aminoácidos do sítio p47phox presente na isoforma NOX4.

Fonte: Elaborado pelo autor.

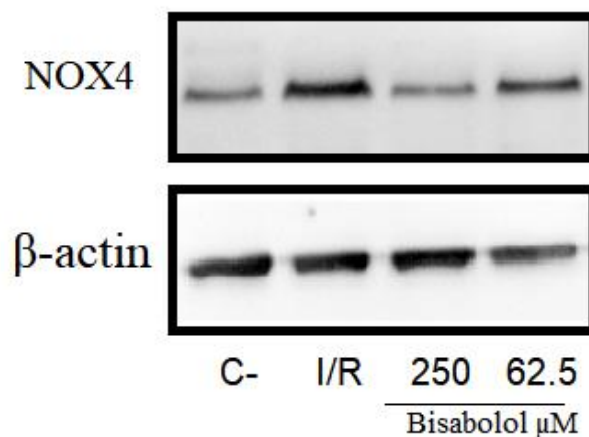
5.7 Avaliação da expressão de NOX4 em células renais HK2 por Western Blot

Com o intuito de se avaliar nas células HK2 a influência do processo de I/R e do tratamento com o Bisabolol, foi feita a análise da expressão de proteínas por Western Blot. Foram extraídas as proteínas das células não tratadas, referentes ao grupo controle, as células que passaram pelo procedimento de I/R, chamado grupo lesão e aquelas células que, além de serem submetidas a I/R, foram tratadas com Bisabolol nas concentrações de 250 e 62,5 μM , respectivamente, essas concentrações foram escolhidas por terem mostrado efeito protetor no ensaio de viabilidade celular.

Dessa forma, foi analisada a expressão da isoforma NOX4 da enzima NADPH-oxidase normalizada pela análise concomitante da expressão da proteína constitutiva β -actina, conforme demonstrado na figura 38. A isoforma NOX4 é a mais abundante no tecido renal e é uma das responsáveis pelos efeitos fisiológicos e patológicos da enzima nesses órgãos. Conforme dados contidos na figura 39 e na tabela 9, as análises permitiram observar que, nas células que passaram pela lesão por I/R os níveis intracelulares da NOX4 praticamente triplicaram quando comparados com os do grupo controle. Ademais, o tratamento com o Bisabolol se mostrou capaz de reduzir os níveis de NOX4 após I/R, indicativo de proteção celular. Na concentração de 250 μM , o Bisabolol reduziu em 50,2% a expressão da enzima quando comparado com o grupo I/R; já na concentração de 62,5 μM , a redução foi de 20%.

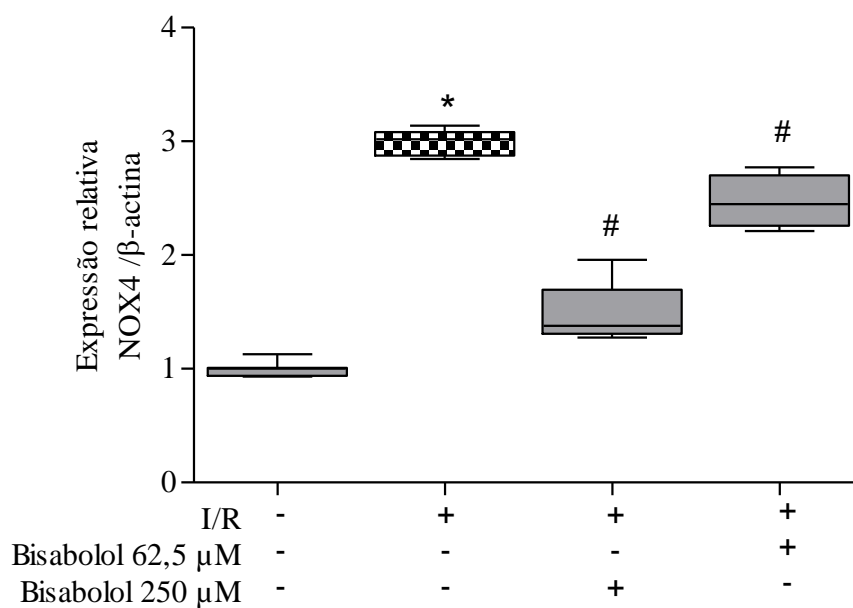
Juntos, esses dados sugerem que o efeito nefroprotetor do Bisabolol pode se dar através na inibição da expressão da enzima NADPH-oxidase, sobretudo a isoforma NOX4, sendo essa uma das principais responsáveis pela geração de ERO intracelular.

Figura 38. Fotografia representativa do ensaio de Western blot, representando a expressão da enzima NADPH-oxidase (isoforma NOX4) em células renais HK2 em comparação com a expressão de β -actina em células expostas à isquemia/reperfusão (I/R).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 39. Expressão relativa de NOX4 em células renais HK2 submetidas à isquemia/reperfusão (I/R) e tratadas com Bisabolol.



Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9. Valores de densidade relativa obtidos no ensaio de Western Blot.

	Densidade Relativa			
	Controle	Isquemia/reperfusão	31,25	62,5
NOX4/B-actina	0,99 ± 0,02	2,99 ± 0,04*	1,49 ± 0,08#	2,48 ± 0,07#

Os dados estão expressos como média padrão ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs. I/R.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A LRA causada por I/R é um fenômeno multifatorial e complexo que pode levar a diversos desfechos, inclusive, em muitos casos, à falência múltipla de órgãos e morte (PARIKH et al., 2017). Os mecanismos que dão início à LRA ainda não estão claros; contudo, já é bem descrito que, durante a I/R renal, as ERO produzidas pelas mitocôndrias desempenham um papel importante na lesão tecidual. Os mecanismos subjacentes aos danos renais costumam ser multifatoriais e interdependentes, envolvendo hipóxia, dano por estresse oxidativo e resposta inflamatória. Nesse contexto, o estresse oxidativo pode levar à oxidação da membrana fosfolipídica e consequente inflamação (ZHAO et al., 2018).

Devido à relevância dessa condição patológica, se faz necessária a descoberta de novas moléculas capazes de proteger o rim deste tipo de lesão. Previamente, nosso grupo de pesquisa demonstrou o potencial nefroprotetor do (-)- α -Bisabolol (SAMPAIO et al., 2016) em modelo de I/R. Assim, decidimos investigar o mecanismo do efeito nefroprotetor de Bisabolol em um modelo *in vitro* de LRA.

Nesse estudo, foram utilizadas células renais HK2, visto que são uma linhagem celular imortalizada de túbulos proximais de humanos saudáveis e são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade, da função renal e de efeitos de fármacos em estudos translacionais (RYAN et al., 1994).

A metodologia experimental utilizada neste estudo é um modelo bem descrito e estabelecido, que mimetiza a hipóxia e a reoxigenação que ocorrem no processo de I/R (CHOI et al., 2016; YOON et al., 2017; WENG et al., 2018). No presente estudo, foi avaliada a recuperação de células renais humanas após a lesão por I/R e consecutivo tratamento com Bisabolol. Esse método permite a avaliação isolada das células sem interferência de mecanismos teciduais compensatórios ou de mediadores biológicos extrarrenais.

Quando submetidas ao ensaio do MTT, as células tratadas com Bisabolol apresentaram redução da viabilidade celular apenas nas duas maiores concentrações testadas. Assim, essas duas concentrações foram excluídas dos demais ensaios, mantendo-se no estudo as concentrações subtóxicas. A baixa citotoxicidade do Bisabolol sobre células normais de mamíferos tem sido descrita por diferentes autores (MENEZES, 2017; DIAS et al., 2018; HAJAJI et al., 2018), e essa característica permitiu seu uso em

modelos *in vivo* por diversos autores, para estudo de suas bioatividades (BEZERRA et al., 2009; DE O. LEITE et al., 2011; ROCHA et al., 2011; SAMPAIO et al., 2016).

Após a indução de I/R, foi observado redução da viabilidade celular, concordando com nossos estudos prévios com células tubulares de rim de macaco (SAMPALIO et al., 2016). Foi observado ainda que as células HK2 apresentaram maior sensibilidade a essa lesão, com morte de aproximadamente 50%. As células tratadas com Bisabolol apresentaram recuperação parcial da viabilidade, demonstrando que essa substância exerce efeito nefroprotetor sobre essa linhagem celular.

Foi também demonstrado o efeito protetor do Bisabolol em outros modelos experimentais. Shanmuganathan et al. (2018) demonstraram que o Bisabolol exerce efeito protetor em células de feocromocitoma, reduzindo a população de células apoptóticas, esses efeitos podem ser mediados por mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios (ROCHA et al., 2011). Adicionalmente, essa substância foi capaz de reduzir inflamação cutânea e a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelos murinos *in vivo* e *in vitro* (MAURYA et al., 2014).

A partir dos dados obtidos no ensaio do MTT, decidiu-se avaliar as células por citometria de fluxo, com o objetivo de observar alterações morfológicas e funcionais características de necrose e/ou apoptose. Esse método tem a vantagem de ser de fácil execução e interpretação e possuir alta reprodutibilidade (CHRISTENSEN et al., 2013). As células expostas à I/R apresentaram aumento na externalização de fosfatidilserina. Essa molécula está relacionada à sinalização de células para fagocitose e remoção.

Os resultados do presente trabalho mostraram uma diminuição significativa no número de células viáveis associado à marcação característica de apoptose nos grupos submetidos à I/R. Um estudo recente demonstrou que a administração de um flavonoide antioxidante, chamado hydroxysafflor yellow A, melhorou a injúria causada por I/R, aumentando a recuperação e atenuando a apoptose das células renais. Os autores descrevem ainda que esse efeito está associado à diminuição da expressão do fator pró-inflamatório TNF- α e aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (BAI et al., 2018). Além disso, a relação entre os efeitos antioxidantes e antiapoptóticos de várias substâncias tem sido descritas para diversas substâncias (CARPENTIERI et al., 2014; ZHU et al., 2014; RESCIGNO; TECCE; CAPASSO, 2018).

Um estudo *in vivo* mostrou por microscopia eletrônica que os rins submetidos a I/R apresentavam microvilosidades do túbulo proximal encurtados, perda mitocondrial no epitélio do túbulo distal, retração do volume celular e emergência de corpos multivesiculares de endossomos, gerando uma conexão translacional com os resultados *in vitro* do presente trabalho (CHIHANGA et al., 2018). No presente trabalho, foi realizada a avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura, com o objetivo de se identificar as alterações ultraestruturais induzidas pela I/R e o efeito do Bisabolol. As células expostas a I/R apresentaram alterações morfológicas características relacionadas à apoptose e a exposição ao Bisabolol foi capaz de reverter, embora parcialmente, essas alterações. Os achados reforçam os indícios experimentais de que o Bisabolol exerce efeito antiapoptótico, podendo agir como protetor da lesão causada por eventos isquêmicos.

Além disso, o efeito do Bisabolol sobre mecanismos oxidorreductores durante a I/R foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando o DCFH-DA e a Rho123 como marcadores de estresse oxidativo citoplasmático e mitocondrial, respectivamente. A presença de Bisabolol causou diminuição do acúmulo de ERO induzido pela I/R, além de melhorar o potencial transmembrânico mitocondrial, como observado pelo aumento do acúmulo mitocondrial de Rho123. Esses resultados apontam para o envolvimento da respiração celular e do equilíbrio redox nos processos de morte e de recuperação, bem como do mecanismo de ação da substância em estudo.

Uma das principais e mais eficientes estratégias teciduais para controle do balanço redox é o controle enzimático; enzimas constitutivas têm sua expressão aumentada durante a injúria e, conseqüentemente atuam inibindo a formação de ERO ou as reduzindo a substâncias menos nocivas (CHOI et al., 2016). A NADPH-oxidase é uma enzima com atividade constitutiva, contribuindo para o equilíbrio redox numa diversidade de tecidos. No tecido renal, a transferência de elétrons catalisada pela isoforma NOX4 tem sido mostrada como uma fonte de ERO em concentrações fisiológicas. Entretanto, a superexpressão dessa enzima está relacionada à fisiopatologia da LRA, através da produção exacerbada de ERO e indução de morte celular por apoptose (WENG et al., 2018).

A apoptose é um fenômeno complexo que determina as complicações da lesão de I/R, principalmente relacionadas à oxidação de lipídios e danificação dos ácidos nucleicos (CHIHANGA et al., 2018). Estudos anteriores mostraram que a presença

intracelular de substâncias antioxidantes após I/R, incluindo o NADPH, reduz a expressão de moléculas pró-apoptóticas, como Bax e Caspase 3 clivada, e aumenta a concentração da proteína anti-apoptótica Bcl-2, além de melhorar a função mitocondrial. Assim, o consumo do NADPH causado pelo estresse oxidativo sugere o desenvolvimento de apoptose pela via intrínseca, enquanto que o aumento de NADPH estimulado por substâncias antioxidantes pode representar o mecanismo de proteção (ZHU et al., 2014; CHOI et al., 2016; WENG et al., 2018).

Evidências sugerem que a disfunção mitocondrial é um ponto chave nas disfunções dos túbulos renais, bem como das comorbidades relacionadas à doença renal crônica e desempenham um importante papel como novos alvos terapêuticos. Uma variedade de agentes (incluindo endógenos e alimentos antioxidantes naturais, extratos de plantas naturais e moléculas com especificidade mitocondrial), combinados com terapias convencionais e um estilo de vida apropriado poderia ajudar na preservação das funções renais. Entretanto, para uma correta utilização destes agentes é extremamente importante entender seus efeitos e identificar um alvo para as intervenções (GRANATA et al., 2015).

O desequilíbrio na função mitocondrial é um dos mecanismos que leva à disfunção e à apoptose celular. Estudos de apoptose induzida por LPS (lipopolissacrídeo) bacteriano em células HK2 demonstram que a disfunção do balanço da dinâmica mitocondrial e do potencial transmembrânico mitocondrial são revertidos pela utilização de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias, diminuindo a formação de ERO e a consequente acumulação de TBARS, além da diminuição da externalização da fosfatidilserina sinalizada pela anexina, achados esses associados à potencialização da função tubular (LIU et al., 2018).

Em vista disso, o estresse oxidativo nas células foi avaliado através da quantificação de GSH e TBARS. Sob condições oxidantes, as moléculas de GSH doam um elétron, formando GSSG. Essa molécula pode ser reduzida de volta para GSH pela enzima GSSG redutase. Microambientes celulares e teciduais oxidantes tendem a consumir os estoques de GSH, aumentando a relação GSSG/GSH (WU *et al.*, 2004). Estudos demonstram que as substâncias antioxidantes são capazes de atenuar alterações nos níveis de GSH induzidos pela lesão de I/R (BALLATORI, 2009; COSTA et al., 2015)

Além disso, ERO são produzidas durante a reintrodução de oxigênio a um tecido previamente isquêmico, resultando em alterações na relação entre fatores pró e

antioxidantes (WU et al., 2004; KADKHODAEI; NAJAFI; SEIFI, 2014). A formação de ERO desempenha um papel importante no desenvolvimento da LRA. Níveis aumentados de TBARS após isquemia renal têm sido descritos como marcador de estresse oxidativo (KADKHODAEI; NAJAFI; SEIFI, 2014; NAJAFI et al., 2014). A utilização de substâncias antioxidantes, tais como própolis vermelho (COSTA et al., 2015) e extrato de *Tribulus terrestris* (NAJAFI et al., 2014) na melhora da lesão renal são exemplos de como mecanismos oxidativos podem estar envolvidos em danos renais, sobretudo na LRA. Foi observado no presente estudo um aumento significativo do MDA e uma diminuição de GSH nas células submetidas à I/R, quando comparado ao grupo controle. Além disso, o tratamento com bisabolol foi capaz de reduzir estas alterações.

Recentemente, um estudo realizado com células renais HK2 usando um modelo de I/R mostrou que o tratamento com o substrato NADPH reduz o estresse oxidativo e apoptose pelo aumento da GSH, diminuindo os níveis de TBARS resultantes da peroxidação lipídica e prejudicando a inflamação sinalizada por NF- κ B, resultados estes comprovados *in vivo*, sobretudo na observação histológica dos rins de roedores submetidos à hipóxia (WENG et al., 2018). O GSH, juntamente com a glutatona peroxidase, bloqueia a peroxidação, reduzindo os níveis de TBARS e protegendo a proteína da oxidação não enzimática (ALTENHO et al., 2015). Alguns estudos mostram que a presença de NADPH nas células pode prevenir a oxidação da GSH (LI et al., 2015), apoiando nossos resultados de medição do nível de TBARS e GSH nas células. Além disso, já foi descrito que o NADPH pode proteger o tecido renal tubular contra I/R renal, reduzindo o acúmulo de ERO (DUTTA et al., 2017; WENG et al., 2018).

Um trabalho recente mostrou que substâncias antioxidantes formuladas em sistemas especiais de entrega mitocondrial melhoraram a disfunção nessa organela e o processo inflamatório na LRA *in vivo* e, conseqüentemente, atenuaram o dano tubular renal após a I/R, incluindo efeito antiapoptótico e diminuição da liberação de KIM-1 (ZHAO et al., 2018). Assim, nossos resultados de citometria de fluxo corroboram com o aumento da liberação de KIM-1 encontrado em células HK2 submetidas a I/R e com a melhora após o tratamento com Bisabolol.

O KIM-1, uma glicoproteína (90 kDa) transmembrânica, está localizado na membrana apical das células tubulares proximais. É conhecido que o seu domínio extracelular é clivado durante a injúria renal, o que é capaz de transformar células locais em fagócitos para remoção de corpos apoptóticos. O domínio clivado é então eliminado

na urina e se torna detectável. No presente trabalho, o sobrenadante das células HK2 foi colhido para determinar a concentração de KIM-1 e correlacioná-la com a injúria renal por I/R e o efeito protetor do Bisabolol.

No presente estudo, foi observado um aumento estatisticamente significativo de KIM-1 nas células submetidas à I/R. Este resultado é corroborado por estudos *in vivo* realizados previamente por nosso grupo de pesquisa (LIMA, 2016; SAMPAIO et al., 2016; DANTAS et al., 2018) e por outros autores (KHANDRIKA et al., 2012; LUO et al., 2014; L. YANG, C. R. BROOKS, S. XIAO, V. SABBISSETTI, M. Y. YEUNG, 2015). A detecção urinária de KIM-1 tem sido estudada como um potencial biomarcador precoce, sensível e específico do dano celular no epitélio tubular, uma vez que é detectável durante o início da LRA e sua presença nessa amostra representa sua produção intrarrenal (PARIKH; MANSOUR, 2017).

O estresse oxidativo e a formação de ERO a ele associada são descritos como mecanismos de disfunção epitelial na LRA induzida por I/R (TAO et al., 2018). No entanto, as ERO têm funções essenciais nos processos de sinalização celular, como a regulação da proliferação, diferenciação e migração celular (JEONG et al., 2018). Assim, a NADPH-oxidase catalisa a formação de ERO em condições fisiológicas e fisiopatológicas (ALTENHO et al., 2015). Portanto, essa enzima pode ser considerada um alvo para o tratamento do desequilíbrio redox no tecido epitelial (CHEN et al., 2018).

A busca farmacológica de substâncias antioxidantes com efeitos farmacológicos tem sido um desafio para os pesquisadores. No entanto, estudos anteriores mostraram que a suplementação com substâncias que combatem a formação de ERO, como vitamina C e E, glutatona e acetilcisteína, se tornaram ineficazes na redução total de danos após lesões isquêmicas (YOUSEF et al., 2012; WENG et al., 2018). Assim, a abordagem atual no contexto do estresse oxidativo é o uso de moléculas direcionadas às fontes enzimáticas das ERO fisiopatológicas, impedindo sua formação ao invés de remover espécies pré-formadas (ALTENHO et al., 2015).

No presente estudo, foram realizados ensaios de interação teórica *in silico*, os quais sugerem que o Bisabolol é capaz de interagir com a subunidade citosólica p47phox de NOX4, uma das principais fontes enzimática de ERO renais, que funcionam como segundo mensageiros e transportadores de elétrons intracitoplasmáticos. A subunidade p47phox é essencialmente importante para os mecanismos fisiopatológicos da NOX4,

pois induz a ativação da enzima pela ligação a outra subunidade, a proteína transmembrana p22phox (DUTTA et al., 2017).

Em nosso ensaio de atividade enzimática, o Bisabolol foi capaz de inibir a oxidação catalítica de NADPH. Este substrato pode prevenir danos renais oxidativos e desempenha um papel importante na regulação do status de redox celular. Estudos prévios mostram que a redução na atividade dos NOX confere menor vulnerabilidade às linhagens celulares, tornando-as mais resistentes (ZHU et al., 2017). A apocinina é uma substância conhecidamente inibidora das enzimas NOX e é usada em diversos protocolos experimentais. Ela age bloqueando a subunidade p47phox, ligando-se ao domínio SH3A (uma região rica em lisina/arginina). Esse domínio é fundamental para a interação p47phox- p22phox e consequentemente para a atividade catalítica da enzima (KANEGAE et al., 2010; MART et al., 2013).

Estudos prévios demonstram que a utilização de substâncias antioxidantes pode influenciar na expressão proteica, incluindo proteínas envolvidas no processo inflamatório, como a COX-2 (ciclooxigenase do tipo 2) e a NF- κ B (fator nuclear kappa B), estando esses eventos relacionados à concentração intracelular de NADPH (WENG et al., 2018). Esses mecanismos celulares podem acontecer a nível de transcrição do material genético. Em seu estudo, Pendyala et al. (2009) demonstrou que geração de ERO induzida por hiperóxia em células endoteliais de pulmão humano aumentou a expressão de RNA mensageiro (mRNA) direcionado à expressão das proteínas NOX4 e NOX2, influenciando em funções celulares básicas, como crescimento celular e migração.

Uma vez que o Bisabolol se mostrou capaz de inibir a enzima NOX4, decidiu-se estudar a influência desse terpeno na expressão da enzima por Western Blot. A I/R causou aumento da expressão dessa enzima, enquanto o tratamento com Bisabolol foi capaz de atenuar esse aumento. Assim, esses dados corroboram e complementam os achados anteriores do trabalho, postulando que o Bisabolol age inibindo a formação de ERO através da redução da expressão e atividade de NOX4. Assim, seu mecanismo protetor está associado à prevenção do dano causado por ERO, e não simplesmente removendo ERO pré-formadas.

De fato, substâncias bioativas, principalmente os terpenos, são descritas como agentes antioxidantes, sendo uma característica comum entre os compostos fenólicos (GANZERA et al., 2006). O Bisabolol é descrito como uma substância citoprotetora contra as ERO geradas em diversas situações, inclusive após exposição à radiação

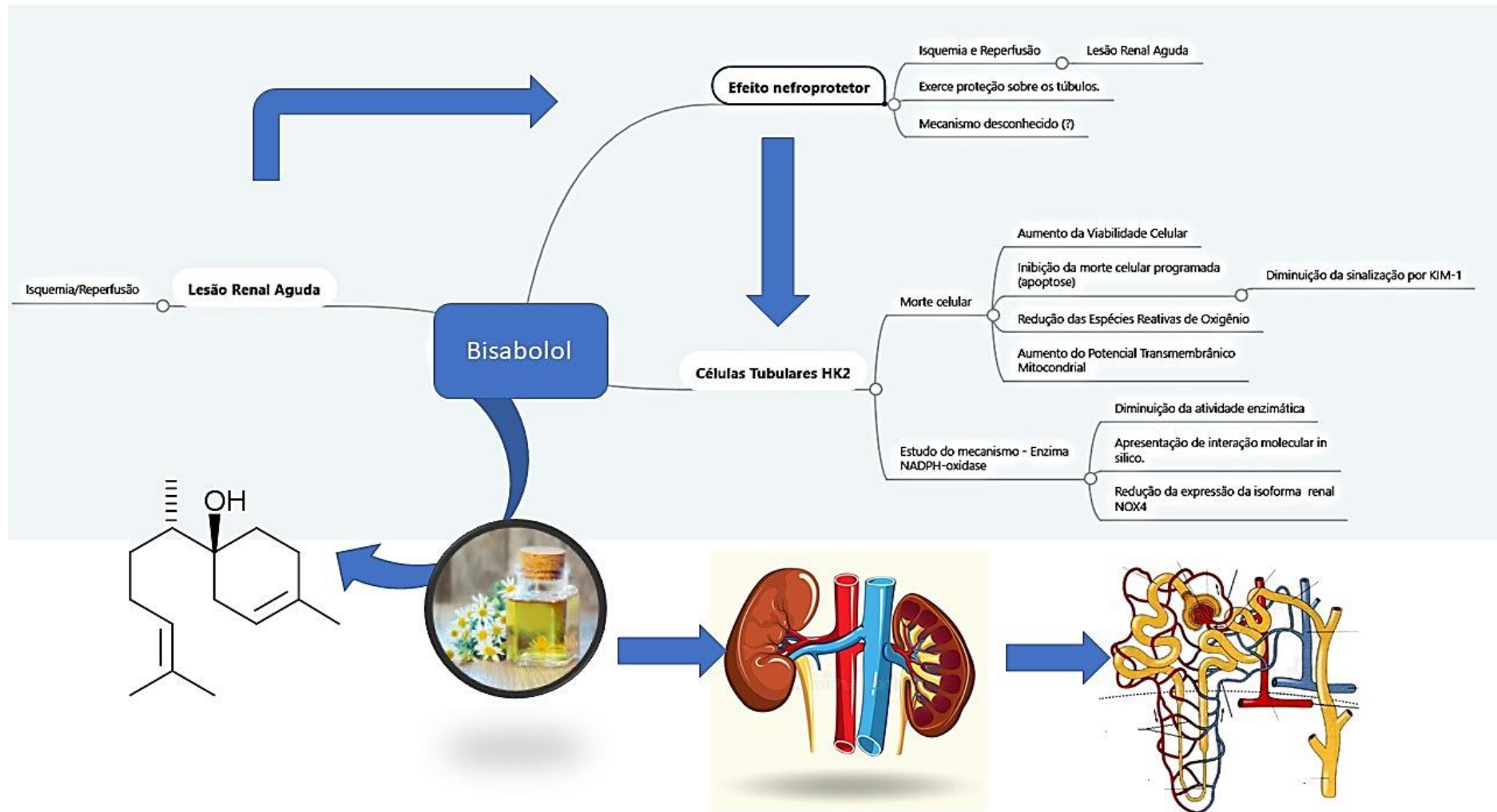
ultravioleta (BIGAGLI et al., 2017), drogas citotóxicas (PRADO et al., 2017) e hipóxia (DA COSTA et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016). Além disso, suas propriedades antiapoptóticas já foram estudadas (SHANMUGANATHAN et al., 2018).

Já foi demonstrado que, em tecidos submetidos a I/R, há um *upregulation* da expressão da isoforma NOX4, relacionada com o stress causado pelo acúmulo de ERO. Adicionalmente, o tratamento com compostos fenólicos antioxidantes diminui a expressão da enzima, decaindo os níveis teciduais de ERO, sobretudo peróxido de hidrogênio. Esses eventos estão associados ao efeito antiapoptótico dessas substâncias (LU et al., 2017).

Os compostos fenólicos foram previamente descritos como tendo afinidade com as isoformas de NOX, prejudicando a formação do ânion catalítico superóxido (O_2^-) (CHAVUSHYAN et al., 2017) e envolvendo a regulação da expressão de NOX, incluindo a subunidade p47phox (KIKUCHI et al., 2018). Portanto, o presente estudo corrobora tal informação, demonstrando que o Bisabolol tem um papel protetor nas células HK2 tubulares através da interação com a enzima NADPH-oxidase, regulando o equilíbrio redox.

Nossos resultados contribuem para o conhecimento da LRA induzida por I/R, destacando o Bisabolol e as isoformas da enzima NADPH-oxidase como fontes de futuras abordagens clínicas, estratégias diagnósticas e ferramentas farmacológicas na pesquisa e no desenvolvimento de terapias. A seguir, na figura 40, é apresentado um mapa mental que correlaciona os achados do presente trabalho.

Figura 4040. Fluxograma com a correlação dos achados do presente trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento com Bisabolol protege as células epiteliais tubulares renais humanas (HK2) contra o dano oxidativo causado pela hipóxia e reoxigenação na LRA causada por I/R. Este efeito está relacionado à inibição da apoptose, a qual pode ser causada pelo acúmulo de ERO, com consequente alteração mitocondrial e sinalizada pela liberação de KIM-1 em células tubulares. Por se tratar de uma das principais fontes de ERO em condições fisiológicas constitutivas e patológicas, a enzima NADPH-oxidase (isoforma NOX4) é um alvo farmacológico em potencial no contexto da nefroproteção; dessa forma, foi demonstrado que o Bisabolol inibiu a atividade da enzima NOX4 nas células tubulares, prejudicando a síntese de ERO, melhorando a função mitocondrial e aumentando a viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

- ALTENHO, S.; RADERMACHER, K. A.; KLEIKERS, P. W. M.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. H. W. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors : Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 23, n. 5, p. 406–427, 2015.
- ARANDA, A.; SEQUEDO, L.; TOLOSA, L.; QUINTAS, G.; BURELLO, E.; CASTELL, J. V.; GOMBAU, L. Toxicology in Vitro Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay : A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 954–963, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.016>>.
- ARUMUGAM, A.; FAIZAL, A.; RAZIS, A. Apoptosis as a Mechanism of the Cancer Chemopreventive Activity of Glucosinolates : a Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, p. 1439–1448, 2018.
- BAI, J.; ZHAO, J.; CU, D.; WANG, F.; SONG, Y.; CHENG, L.; GAO, K. Protective effect of hydroxysafflor yellow A against acute kidney injury via the TLR4 / NF- κ B signaling pathway. **Sci Rep.**, v. 8, n. 1, p. 9173, 2018.
- BALLATORI, N. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.**, v. 390, p. 191–214, 2009.
- BEZERRA, S. B.; LEAL, L. K. a M.; NOGUEIRA, N. a P.; CAMPOS, a R. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP+ channels. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 6, p. 1403–1406, 2009.
- BIGAGLI, E.; CINCI, L.; AMBROSIO, M. D.; LUCERI, C. Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology Pharmacological activities of an eye drop containing Matricaria chamomilla and Euphrasia o ffi cinalis extracts in UVB-induced oxidative stress and in fl ammation of human corneal cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 173, n. June, p. 618–625, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.031>>.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976.

- BROOKS, C. R.; YEUNG, M. Y.; BROOKS, Y. S.; CHEN, H.; ICHIMURA, T.; HENDERSON, J. M.; BONVENTRE, J. V.; BROOKS, C. R. KIM-1-/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. **EMBO J**, v. 34, n. 19, p. 2441–2464, 2015.
- BRUNKE, E. J.; HAMMAERSCHMIDT, F. J. Constituents of the essential oil of *Salvia stenophylla*—first identification of the (?)-a-bisabolol in nature. In: **Essential oils and aromatic plants**. [s.l: s.n.]p. 37–43.
- BUITRAGO, A.; ROJAS, J.; ROJAS, L.; VELASCO, J.; MORALES, A.; PEÑALOZA, Y.; C, D. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Vismia macrophylla* leaves and fruits collected in Táchira-Venezuela. **Nat Prod Commun**, v. 10, n. 2, p. 375–377, 2015.
- CARPENTIERI, A.; MARCHIONATTI, A.; ARECO, V.; PEREZ, A.; CENTENO, V.; TOLOSA DE TALAMONI, N. Antioxidant and antiapoptotic properties of melatonin restore intestinal calcium absorption altered by menadione. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 387, n. 1–2, p. 197–205, 2014.
- CHAVUSHYAN, V. A.; SIMONYAN, K. V.; SIMONYAN, R. M.; ISOYAN, A. S.; SIMONYAN, G. M.; BABAKHANYAN, M. A. Effects of stevia on synaptic plasticity and NADPH oxidase level of CNS in conditions of metabolic disorders caused by fructose. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 1–13, 2017.
- CHEN, YONGLIANG; YE, LIHONG ; LI, WANGJIAN; LI, DONGZHANG; LI, F. Hyperoside protects human kidney-2 cells against oxidative damage induced by oxalic acid. **Mol Med Rep.**, p. (ahead of print), 2018.
- CHEUNG, E. C.; LUDWIG, R. L.; VOUSDEN, K. H. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20491–20496, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1206530109>>.
- CHIHANGA, T.; MA, Q.; NICHOLSON, J. D.; RUBY, H. N.; EDELMANN, R. E.; DEVARAJAN, P.; KENNEDY, M. A. NMR spectroscopy and electron microscopy identification of metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. **AJP-Renal Physio**, v. 314, n. 2, p. 154–166, 2018.
- CHOI, H.; JEONG, J. Y.; LEE, K. W.; CHOI, D. E. Nafamostat Mesilate Attenuates Ischemia-Reperfusion e Induced Renal Injury. v. 2199, p. 2192–2199, 2016.

CHRISTENSEN, M. E.; JANSEN, E. S.; SANCHEZ, W.; WATERHOUSE, N. J. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 138–145, 2013.

COSTA, M. F. B. da; BRAGA, A.; TELES, F.; MARTINS, S.; MARCOS, P.; SOARES, G.; MENESES, G. C.; ADELVANE, F.; RODRIGUES, D. P.; KALYNE, L.; MOREIRA, A.; MIRON, D.; HOLANDA, A.; MARIA, A.; MARTINS, C. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 22, p. 787–795, 2015.

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

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

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

DIAS, A. L. B.; BATISTA, H. R. F.; ESTEVAM, E.; ALVES, C.; FORIM, M.; NICOLELLA, H.; FURTADO, R.; TAVARES, D.; SILVA, T.; MARTINS, C.; MIRANDA, M. Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae). **Nat Prod Res**, v. 3, p. 1–5, 2018.

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

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

GEISZT, M.; KOPP, J. B.; VÁRNAI, P.; LETO, T. L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p. 8010–4, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16661&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>.

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

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.

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

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

HAJAJI, S.; SIFAOU, I.; LÓPEZ-ARENCEBIA, A.; REYES-BATLLE, M.; JIMÉNEZ, I. A. Leishmanicidal activity of α -bisabolol from Tunisian chamomile essential oil. **Parasitology Research**, 2018.

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

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1201551#section=Top>. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1201551#section=Top>>.

ICHIMURA, T.; ASSELDONK, E. J. P. V.; 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. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 5, p. 1657–1668, 2008.

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

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

KADKHODAEI, M.; NAJAFI, A.; SEIFI, B. Classical and remote post-conditioning effects on ischemia/reperfusion-induced acute oxidant kidney injury. **International Journal of Surgery**, v. 12, n. 11, p. 1162–1166, 2014.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1–7, 2010.

KANEGAE, MP; CONDINO-NETO, A; PEDROZA, LA; DE ALMEIDA, AC; REHDER, J; DA FONSECA, LM; XIMENES, V. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 393, n. 3, p. 551–554, 2010.

KHANDRIKA, L.; KOUL, S.; MEACHAM, R. B.; KOUL, H. K. Kidney Injury Molecule-1 Is Up-Regulated in Renal Epithelial Cells in Response to Oxalate In Vitro and in Renal Tissues in Response to Hyperoxaluria In Vivo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 3–9, 2012.

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

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

KIM, S. K.; HAN, G. H.; SEONG, W.; KIM, H.; KIM, S. W.; LEE, D. H.; LEE, S. G. CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases

terpenoid production. **Metabolic Engineering**, v. 38, p. 228–240, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.08.006>>.

KRAWCZYK, K. M.; MATAK, D.; SZYMANSKI, L.; SZCZYLIK, C.; PORTA, C.; CZARNECKA, A. M. Culture in embryonic kidney serum and xeno-free media as renal cell carcinoma and renal cell carcinoma cancer stem cells research model.

Cytotechnology, v. 70, n. 2, p. 761–782, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10616-017-0181-5>>.

L. YANG, C. R. BROOKS, S. XIAO, V. SABBISSETTI, M. Y. YEUNG, L. L. H. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. **J. Clin. Invest.**, v. 125, p. 1620–1636, 2015.

LAMEIRE, N. H.; BAGGA, A.; CRUZ, D.; MAESENEER, J. De; ENDRE, Z.; KELLUM, J. A.; LIU, K. D.; MEHTA, R. L.; PANNU, N. Global Kidney Disease 2 Acute kidney injury : an increasing global concern. **The Lancet**, v. 382, n. 9887, p. 170–179, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60647-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60647-9)>.

LEVINE A, MOMAND J, F. C. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453—456, 1991.

LI, M.; ZHOU, Z.; SUN, M.; CAO, L.; CHEN, J. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, a Pentose Phosphate Pathway Product, Might Be a Novel Drug Candidate for Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 47, n. 1, p. 187–195, 2015.

LI Y, YE Z, LAI W, RAO J, HUANG W, ZHANG X, YAO Z, L. T. Activation of Sirtuin 3 by Silybin Attenuates Mitochondrial Dysfunction in Cisplatin-induced Acute Kidney Injury. **Front Pharmacol.**, v. 8, p. 178–185, 2017.

LIMA, E. G. G. R. **Análise comparativa dos efeitos renais causados pelos contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar: papel do KIM-1 como detector precoce de injúria renal.** 2016. Universidade Federal do Ceará, 2016.

LIU, BI-CHENG; GAO, JUN; LI, QING; XU, L.-M. Albumin caused the increasing production of angiotensin II due to the dysregulation of ACE/ACE2 expression in HK2 cells. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, p. 23–30, 2009.

LIU, N.; JIANG, Z.; LIU, Y.; NIE, Y.; CHEN, J.; OUYANG, B.; GUAN, X.; CHEN, M. Human trypsin inhibitor reduces the apoptosis of lipopolysaccharide-induced human kidney-2 cells by promoting mitochondrial fusion. **Mol Med Rep.**, v. 16, n. 3, p. 2899–

2906, 2017.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 – 275, 1951.

LU, P.; ZHANG, C. chen; ZHANG, X. min; LI, H. ge; LUO, A. lin; TIAN, Y. ke; XU, H. Down-regulation of NOX4 by betulinic acid protects against cerebral ischemia-reperfusion in mice. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v. 37, n. 5, p. 744–749, 2017.

LU, Q.; ZUO, W.; JI, X.; ZHOU, Y.; LIU, Y.; YAO, X.; ZHOU, X.; LIU, Y.; ZHANG, F.; YIN, X. Ethanolic Ginkgo biloba leaf extract prevents renal fibrosis through Akt / mTOR signaling in diabetic nephropathy. **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, p. 1071–1078, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.08.010>>.

LUO, Q. H.; CHEN, M. L.; SUN, F. J.; CHEN, Z. L.; LI, M. Y.; ZENG, W. KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 397, p. 53–60, 2014.

MACÍAS-PÉREZ, M. E.; MARTÍNEZ-RAMOS, F.; PADILLA-MARTÍNEZ, I. I.; CORREA-BASURTO, J.; KISPERS, L.; MENDIETA-WEJEBE, J. E.; ROSALES-HERNÁNDEZ, M. C. Ethers and esters derived from apocynin avoid the interaction between p47phox and p22phox subunits of NADPH oxidase: evaluation in vitro and in silico. **Biosci Rep**, v. 33, n. 4, p. 605–616, 2013.

MAGNELLI, L.; CALDINI, R.; SCHIAVONE, N.; SUZUKI, H.; CHEVANNE, M. Differentiating and apoptotic dose-dependent effects in (-)-alpha-bisabolol-treated human endothelial cells. **Journal of natural products**, v. 73, n. 4, p. 523–526, 2010.

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. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 173–81, 2014.

MCWILLIAM, S. J.; ANTOINE, D. J.; SABBISSETTI, V.; PEARCE, R. E.; JORGENSEN, A. L.; LIN, Y.; LEEDER, J. S.; BONVENTRE, J. V.; SMYTH, R. L.; PIRMOHAMED, M. Reference intervals for urinary renal injury biomarkers KIM-1 and NGAL in healthy children. **Biomarkers in Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1189–1197, 2014.

MENEZES, R. R. P. P. B. de. **EFEITO TRIPANOCIDA DO (-) -ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y DE Trypanosoma cruzi RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES EFEITO TRIPANOCIDA DO (-) -ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y DE Trypanosoma cruzi.** 2017.

Universidade Federal do Ceará, 2017.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. **Biochem Med.**, v. 23, n. 3, p. 302–311, 1980.

MJ. RYAN, G. JOHNSON, J. KIRK, SM. FUERSTENBERG, R. ZAGER, B. TOROK-STORB, B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. **Kidney Int.**, v. 45, p. 48–57, 1994.

MOLEDINA, D. G.; PARIKH, C. R. Phenotyping of Acute Kidney Injury: Beyond Serum Creatinine. **Seminars in Nephrology**, v. 38, n. 1, p. 3–11, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2017.09.002>>.

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.; ASHTIYANI, S. C.; HOSSEINI, N. Protective effects of Tribulus terrestris l extract against acute kidney injury induced by reperfusion injury in rats. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 8, n. 4, p. 292–298, 2014.

NOH, M.R.; KIM, J.I.; HAN S.J.; LEE, T.J.; PARK, K. M. C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1852, p. 1895–1901, 2015.

O’CONNOR, JE; VARGAS, JL; KIMLER, BF; HERNANDEZ-YAGO, J; GRISOLIA, S. Use of rhodamine-123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 151, p. 568–573, 1998.

OTTO, L.; MONDAL, P.; BRASSAC, J.; PREISS, S.; DEGENHARDT, J.; HE, S.; REIF, J. C.; SHARBEL, T. F. Use of genotyping-by-sequencing to determine the genetic structure in the medicinal plant chamomile , and to identify flowering time and alpha-bisabolol associated SNP-loci by genome-wide association mapping. **BMC**

Genomics, v. 18, n. 1, p. 599, 2017.

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

PATNI, HITESH; MATHEW, JAYANT T.; LUAN, L.; FRANKI, NICHOLAS; CHANDER, PRAVEEN N.; SINGHAL, P. C. Aldosterone promotes proximal tubular cell apoptosis: role of oxidative stress. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 293, n. 4, p. 1065–1071, 2007.

PENDYALA, S.; GORSHKOVA, I. A.; USATYUK, P. V.; HE, D.; PENNATHUR, A.; LAMBETH, J. D.; THANNICKAL, V. J.; NATARAJAN, V. Role of Nox4 and Nox2 in Hyperoxia-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Migration of Human Lung Endothelial Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 747–764, 2009. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2008.2203>>.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

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

PRADO, N.; MIRANDA, S.; FREIMAN, M.; RAMOS, D. S.; CAMPOS, N.; MIGUEL, D. O.; BERNADETE, M.; PIERRE, R. Journal of Photochemistry & Photobiology, B : Biology α -Bisabolol improves 5-aminolevulinic acid retention in buccal tissues : Potential application in the photodynamic therapy of oral cancer. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 174, n. August, p. 298–305, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.08.013>>.

RAJARAM, R. D.; DISSARD, R.; JAQUET, V.; SEIGNEUX, S. de. Potential benefits and harms of NADPH oxidase type 4 in the kidneys and cardiovascular system. **Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, n. July, p. 1–10, 2018.

RESCIGNO, T.; TECCE, M. F.; CAPASSO, A. Protective and Restorative Effects of Nutrients and Phytochemicals Abstract : **The Open Biochemistry Journal**, v. 12, p.

46–64, 2018.

RICCI, M.; ZONG, W. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist.**, v. 11, p. 342–357, 2006.

ROCHA, N. F. M.; OLIVEIRA, G. V. De; ARAÚJO, F. Y. R. De; RIOS, E. R. V.; CARVALHO, A. M. R.; VASCONCELOS, L. F.; MACÊDO, D. S.; SOARES, P. M. G.; SOUSA, D. P. De; SOUSA, F. C. F. De. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 455–461, 2011.

S. SARSHAR, S. BRANDT, MR. ASADI KARAM, M. HABIBI, S. BOUZARI, M. LECHTENBERG, U. DOBRINDT, X. QIN, FM. GOYCOOLEA, A. H. Aqueous extract from *Orthosiphon stamineus* leaves prevents bladder and kidney infection in mice. **Phytomedicine**, v. 28, p. 1–9, 2017.

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

SAMPAIO, T. L.; MENEZES, R. R. P. P. B. de; DA COSTA, M. F. B.; MENESES, G. C.; ARRIETA, M. C. V.; CHAVES FILHO, A. J. M.; DE MORAIS, G. B.; LIBÓRIO, A. B.; ALVES, R. S.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; MARTINS, A. M. C. Nephroprotective effects of (-)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1843–1852, 2016.

SEDEEK, M.; NASRALLAH, R.; TOUYZ, R. M.; HEBERT, R. L. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 10, p. 1512–1518, 2013. Disponível em: <<http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2012111112>>.

SHANMUGANATHAN, B.; SURYANARAYANAN, V.; SATHYA, S.; PANDIMA, K. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic effect of α -bisabolol against A β induced neurotoxicity in PC12 cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1196–1207, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.017>>.

SHARMA S., NEMECZ S.K., ZHU S., S. V. Identification of chemopreventive agents

by screening for identification of glutathione-S-transferase as a biomarker. **Methods Cell Sci.**, v. 19, p. 49–52, 1997.

SIMONS, P. J.; VAN DEN PANGAART, P. S.; VAN ROOMEN, C. P. A. A.; AERTS, J. M. F. G.; BOON, L. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: Evidence that tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -treated human preadipocytes are potent leptin producers. **Cytokine**, v. 32, n. 2, p. 94–103, 2005.

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

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350–4354, 1979.

ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? **Cell Biochem Funct**, v. 29, p. 468–480, 2011.

VOUSDEN, K. Human papilloamvirus oncoproteins. **Semin Cancer Biol**, v. 1, p. 415–424, 1990.

WASUNG, M. E.; CHAWLA, L. S.; MADERO, M. Biomarkers of renal function , which and when ? **Clinica Chimica Acta**, v. 438, n. 1, p. 350–357, 2015.

WEAVER, B.; CLEVELAND, D. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell.**, v. 8, p. 7–12, 2005.

WENG, X.; LI, S.; QIN, Z.; XIE, Y.; SONG, Q.; ZHU, Q.; SONG, D. Protective Effect of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate on Renal Ischemia-Reperfusion Injury. **Kidney Blood Press Res.**, v. 43, n. 3, p. 651–663, 2018.

WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. **Environmental Health**, v. 134, n. December 2003, p. 489–492, 2004.

YOON, Y. E.; LEE, K. S.; LEE, Y. J.; LEE, H. H.; HAN, W. K. Renoprotective Effects of Carbon Monoxide-Releasing Molecule 3 in Ischemia-Reperfusion Injury and

Cisplatin-Induced Toxicity. **Transplantation Proceedings**, v. 49, n. 5, p. 1175–1182, 2017.

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

YUANYUAN HAN, YI GU, ALEX CE ZHANG, Y.-H. Lo. Review: Imaging Technologies for Flow Cytometry. **Anal Chem.**, v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.

ZHANG, AIQING; WANG, BIN; YANG, MIN; SHI, HUIMIN; GAN, W. β 2-microglobulin induces epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubule epithelial cells in vitro. **BMC Nephrology**, v. 16, p. 60–68, 2015.

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

ZHU, H.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; QIU, J.; HUANG, K. IDH1 R132H Mutation Enhances Cell Migration by Activating AKT-mTOR Signaling Pathway, but Sensitizes Cells to 5-FU Treatment as NADPH and GSH Are Reduced. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. 1–13, 2017.

ZHU, Y.; SUN, X.; GONG, T.; HE, Q.; ZHANG, Z. Antioxidant and antiapoptotic effects of 1,1'-(Biphenyl-4,4'- diyl)-bis(3-(dimethylamino)-propan-1-one) on protecting PC12 cells from $\alpha\beta$ -induced injury. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 428–435, 2014.