



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

NATACHA TERESA QUEIROZ ALVES

**EFEITOS RENAIIS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO E SUA AÇÃO NA PROTEÇÃO
DA LESÃO AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

FORTALEZA

2018

NATACHA TERESA QUEIROZ ALVES

**EFEITOS RENAIIS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO E SUA AÇÃO NA PROTEÇÃO
DA LESÃO AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

Tese de Doutorado em Farmacologia submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Helena Serra Azul Monteiro

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)

- A481e Alves, Natacha Teresa Queiroz.
Efeitos Renais de complexos de rutênio e sua ação na proteção da lesão aguda induzida por isquemia e reperfusão / Natacha Teresa Queiroz Alves. – 2018.
108 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.
1. complexos de rutênio. 2. isquemia/reperfusão. 3. perfusão renal. 4. FOR 811 A. 5. óxido nítrico. I.
Título.

CDD 615.1

NATACHA TERESA QUEIROZ ALVES

EFEITOS RENAIIS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO E SUA AÇÃO NA PROTEÇÃO DA
LESÃO AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Tese de Doutorado em Farmacologia
submetida à coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em
Farmacologia.

Aprovada em 04/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, Luiz Carlos e Valdísia, meus irmãos, Victor e Andrezza, e minha sobrinha, Valentina, pela confiança e o apoio que sempre me deram principalmente durante essa difícil jornada da pós-graduação. Muito obrigada!

À professora Helena Serra Azul Monteiro por ter colaborado com a minha formação profissional, pela compreensão e ajuda desde a Iniciação Científica e durante toda a pós-graduação.

À banca, Profa. Nylane Maria Nunes de Alencar, Prof. Thyago Moreira de Queiroz, Prof. Luiz Gonzaga de França Lopese Profa. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes por terem aceitado o convite e pelas valiosas colaborações.

A todos os integrantes do LFAVET, Professora Renata Alves, Aline Marinho, Sílvia Helena, às alunas de Iniciação Científica Amanda Oliveira, Paloma Araújo e Tays Neves e, principalmente aos amigos, Profa. Roberta Jeane, Pedro Henrique Sá, Paula Letícia, Rafael Jorge, João Alison e Nogueira Júnior pelas ajudas nos experimentos, companheirismo durante tantos anos nesse laboratório e a grande amizade que espero levar pra vida!

Aos amigos Hívila Moreira, Jéssica Galíndez, Danilo Galvão e João Victor Almeida pela amizade e apoio.

À Vilanir e à técnica em histologia, Débora, pela assistência concedida durante os experimentos, como também, ao Pedro Everson, uma vez que algumas metodologias só foram realizadas graças a sua presteza e paciência, muito obrigada!

Ao professor Luiz Gonzaga e a seu aluno, Florêncio Gouveia, por terem cedido a substância que deu origem a esse trabalho.

À professora Janaína Serra Azul que contribuiu com a análise histopatológica e sempre se mostrou muito solícita, como também, aos alunos do Laboratório de Morfologia Experimental Comparada (MEC), Félix Júnior, Maria Landin, Isadora Carvalho e Marrie Dutra.

À professora Alice Maria Costa Martins por disponibilizar seu laboratório para a realização de experimentos e a seu aluno Tiago Sampaio por toda assistência.

Ao professor Alexandre Havte aos alunos do Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM), principalmente a Herlice Veras pelo suporte durante a realização dos experimentos de biologia molecular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC.

RESUMO

EFEITOS RENAIIS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO E SUA AÇÃO NA PROTEÇÃO DA LESÃO AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Nas células endoteliais, o óxido nítrico (NO) é o principal reponsável pela manutenção da homeostase vascular. A lesão de isquemia/reperfusão (I/R) é uma causa comum de lesão renal aguda (LRA) em contextos clínicos. Estudos realizados com nitrosilo complexos de rutênio mostraram proteção em modelo de I/R cerebral, bem como propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em modelo de lesão gástrica. Portanto, com o intuito de buscar novas alternativas terapêuticas para patologias renais que envolvam o comprometimento da via NO/GCs/GMPc, o trabalho buscou investigar os efeitos renais de complexos de rutênio (FOR 811 A e FOR 011 A) e seus possíveis efeitos nefroprotetores em modelo LRA. Para avaliação dos efeitos hemodinâmicos renais dos complexos de rutênio, foram realizados experimentos de perfusão de rim isolado, análises de parâmetros bioquímicos das amostras coletadas e quantificação de GMPc por ELISA. Realizaram-se também experimentos em modelo de I/R *in vitro* em linhagens de células tubulares renais LLC-MK2 e ensaio de respiração celular por citometria de fluxo. Modelo de I/R *in vivo* com nefrectomia direita e clampeamento da artéria renal esquerda foi realizado, além de dosagens bioquímicas, de estresse oxidativo e imunohistoquímica para iNOS e TNF- α . O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animais CEUA/UFC sob o número de protocolo 83/2017. Na perfusão, os compostos FOR 811 A (1,0 $\mu\text{mol/L}$) e FOR 011 A (1,0 $\mu\text{mol/L}$) promoveram aumento da pressão de perfusão, resistência vascular renal e fluxo urinário. O FOR 811 A (0,3 $\mu\text{mol/L}$, 1,0 $\mu\text{mol/L}$) diminuiu os transportes totais e proximais de sódio, potássio e cloreto. O FOR 011 A diminuiu os transportes totais e proximais de sódio e cloreto. Os grupos NPS e FOR 811 A (em ambas as concentrações) aumentaram os níveis de GMPc nos rins perfundidos. Em linhagem de células LLC-MK2, apenas o FOR 811 A demonstrou potencial efeito protetor da disfunção respiratória causada pela lesão por I/R. Em modelo de I/R *in vivo*, o tratamento com FOR 811 A (10mg/kg) diminuiu níveis séricos de creatinina, ureia e fração de excreção de sódio e potássio. Em comparação ao grupo I/R, o grupo I/R 811 A não alterou os níveis de nitrito/nitrato, aumentou os níveis de GSH, e diminuiu a marcação de iNOS e TNF- α por imunohistoquímica. Portanto, o FOR 811 A mostrou alterações na hemodinâmica renal que parecem ser mediadas pela ativação de GCs, propriedades antioxidantes e efeito protetor diante de parâmetros de nefrotoxicidade.

Palavras-chave: Complexos de rutênio. Isquemia/reperfusão. Perfusão renal. FOR 811 A. Óxido nítrico.

ABSTRACT

RENAL EFFECTS OF RUTHENIUM COMPLEXES AND THEIR ACTION IN THE PROTECTION OF ACUTE INJURY INDUCED BY ISCHEMIA AND REPERFUSION

In endothelial cells, the nitric oxide (NO) is the main responsible for the maintenance of vascular homeostasis. Ischemia/reperfusion injury (I/R) is a common cause of acute renal injury in clinical settings. Studies with nitrosyl ruthenium complexes have shown protection in the cerebral ischemia/reperfusion model, as well as anti-inflammatory and antioxidant properties in a gastric lesion model. The aim of this study was to investigate the renal effects of ruthenium complexes (FOR 811A and FOR 011 A) and its possible nephroprotective effects in the treatment of renal pathologies involving the NO/GCs/cGMP pathway. In order to evaluate the renal hemodynamic effects of ruthenium complexes, isolated kidney perfusion experiments were performed and biochemical parameters were analyzed for the samples collected and quantification of cGMP by ELISA. I/R model *in vitro* were performed in LLC-MK2 renal tubule cells line and cell respiration assay by flow cytometry. *In vivo* I/R model with right nephrectomy and renal artery clamping was performed, besides biochemical analyses, oxidative stress and immunohistochemistry for iNOS and TNF- α . The project was approved by the Ethics Committee on Use of Animals (CEUA)/UFC under protocol number 83/2017. In isolated kidney perfusion, the compounds FOR 811 A (1,0 $\mu\text{mol/L}$) and FOR 011 A (1,0 $\mu\text{mol/L}$) promoted increase perfusion pressure, renal vascular resistance and urinary flow. The FOR 811 A (0,3 $\mu\text{mol/L}$, 1,0 $\mu\text{mol/L}$) decreased the total and proximal transports of sodium, potassium and chloride. The SNP and FOR 811 A groups (both concentrations) increased cGMP levels in the perfused kidneys. Therefore, the FOR 011 decreased in total and proximal transport of sodium and chloride. In LLC-MK2 cells line, only FOR 811 A demonstrated potential protective effect of respiratory dysfunction caused by I/R injury. In I/R model *in vivo*, the treatment with FOR 811 A decreased serum creatinine levels, urea and fraction of excretion of sodium and potassium. In comparison to group I/R, the I/R 811 A did not alter the nitrite/nitrate levels, increased GSH levels, decreased marking iNOS and TNF- α by immunohistochemistry. Therefore, the 811 A showed changes in renal hemodynamics that appear to be mediated by the activation of GCs, antioxidant properties and protective effect against nephrotoxicity parameters.

Key words: Ruthenium complex. Ischemia reperfusion. Renal perfusion. FOR 811A. Nitric oxide (NO).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos envolvidos no processo de LRA por I/R	16
Figura 2– Mecanismo da formação de hipoxantina na LRA por I/R.....	18
Figura 3 – Estrutura plana do complexo de rutênio (<i>cis</i> - [Ru(bpy) ₂ (2-MIM)Cl] ⁺ (FOR011A).....	29
Figura 4 – Estrutura plana do nitrosilocomplexo de rutênio <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (2-MIM)(NO)] ³⁺ (FOR 811A).....	30
Figura 5–Esquema do sistema de perfusão de rim isolado.....	32
Figura 6– Valores de Pressão de Perfusão (mmHg), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	33
Figura 7– Valores de Volume de NaCl 0,9% (mL/min), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	33
Figura 8 – Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h), relacionados à velocidade da bomba, durante a calibração do sistema (n=6).....	34
Figura 9 – Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos.....	35
Figura 10 – Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos.....	44
Figura 11 – Pressão de perfusão (PP) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	51
Figura 12 – Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	52
Figura 13 – Fluxo urinário (FU) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0 μmol/L.....	53
Figura 14 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	54
Figura 15 – Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	55

Figura 16 – Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	56
Figura 17 – Percentual de transporte tubular de potássio (%TK ⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	57
Figura 18 – Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	58
Figura 19 – Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	59
Figura 20 – Percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl ⁻) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0 μmol/L.....	60
Figura 21 – Dosagem de GMPc (pmol/mL) em amostras de urina da perfusão de rim isolado de rato nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 μmol/L, FOR811A 1,0 μmol/L e FOR011A 1,0μmol/L.....	62
Figura 22– Fotomicrografias representativas de rins de ratos, demonstrando o córtex, junção córtex-medular e medula interna. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0.....	64
Figura 23–Fotomicrografias representativas de rins de ratos, demonstrando o córtex, junção córtex-medular e medula interna. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0.....	65
Figura 24– Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR 811 A.....	66
Figura 25– Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR 011 A.....	67
Figura 26 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com várias concentrações de FOR 811 A.....	68
Figura 27 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com várias concentrações de FOR 011 A.....	68
Figura 28 – Análise da respiração celular do FOR 811 A (31,25 μmol/L) com o uso do corante rodamina.....	69

Figura 29 – Análise da respiração celular do FOR 011 A (31,25 $\mu\text{mol/L}$) com o uso do corante rodamina.....	70
Figura 30– Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial pela utilização do corante de rodamina.....	70
Figura 31 – Efeito do tratamento com FOR 811 A nos níveis de creatinina plasmática em animais que sofreram LRA por I/R.....	71
Figura 32 – Efeito do tratamento com FOR 811 A nos níveis de ureia plasmática em animais que sofreram LRA por I/R.....	72
Figura 33 – Efeito do tratamento com FOR 811 A na taxa de filtração glomerular em animais que sofreram LRA por I/R.....	73
Figura 34 – Efeito do tratamento com FOR 811 A na fração de excreção de sódio em animais que sofreram LRA por I/R.....	74
Figura 35 – Efeito do tratamento com FOR 811 A na fração de excreção de potássio em animais que sofreram LRA por I/R.....	75
Figura 36 – Níveis de GSH em tecido renal.....	76
Figura 37 – Níveis de nitrito/nitrato tecidual em tecido renal.....	77
Figura 38 – Fotomicrografias (200x) de imunohistoquímica para TNF- α	78
Figura 39 – Fotomicrografias (200x) de imunohistoquímica para iNOS.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de RIFLE para classificação da LRA	12
Tabela 2– Critérios de AKIN para classificação da LRA	13
Tabela 3– Critérios segundo KDIGO para classificação da LRA.....	13
Tabela 4 – Pressão de perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	51
Tabela 5 – Resistência Vascular Renal (RVR) em $\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	52
Tabela 6 – Fluxo urinário (FU) em ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	53
Tabela 7 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	54
Tabela 8 – Percentual de transporte tubular de sódio ($\%T\text{Na}^+$) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	55
Tabela 9 – Percentual de transporte proximal de sódio ($\%pT\text{Na}^+$) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	56
Tabela 10 – Percentual de transporte tubular de potássio ($\%TK^+$) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	57
Tabela 11 – Percentual de transporte proximal de potássio ($\%pTK^+$) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	58
Tabela 12 – Percentual de transporte tubular de cloreto ($\%T\text{Cl}^-$) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	59
Tabela 13 – Percentual de transporte proximal de cloreto ($\%pT\text{Cl}^-$) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	60
Tabela 14 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR 811 A.....	62
Tabela 15 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i>	66

Tabela 16—Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i>	67
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase

AKIN – *Acute kidney injury network*

ATP – Trifosfato de adenosina

CrS – Creatinina sérica

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilssulfóxido

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FEK⁺ – Fração de excreção de potássio

FENa⁺ – Fração de excreção de sódio

FOR 011 A – Complexo de rutênio (*CIS*- [RU(BPY)2(2-MIM)CL]⁺

FOR 811 A – Complexo de nitrosilo rutênio *CIS*-[RU(BPY)2(2-MIM)(NO)]³⁺

FU – Fluxo urinário

GCs – Guanilato ciclase solúvel

Glc – Glicose

GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico

GSH – Glutathiona reduzida

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

I/R – Isquemia/reperfusão

IFN – Interferon

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

KIDGO – *Kidgo disease improving global outcomes*

KIM-1 – Molécula de lesão renal

LLC-MK2 – Células tubulares epiteliais renais

LRA – Lesão renal aguda

LRC – Lesão renal crônica

MTT –3-(4,5-Dimetiltiazol-2-IL)-2,5-Difeniltetrazólio

NAD(H) – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NF κ b – Fator nuclear kappa b

NGAL – Lipocaína associada à gelatinase neutrofílica

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NO $_2^-$ – Nitrito

NO $_3^-$ – Nitrato

NOS – Óxido nítrico sintase

NO $_x$ – Nitrito/nitrato

O $_2^-$ – Ânion superóxido

OH – Hidroxila

OH $^\cdot$ – Radical hidroxila

ONOO $^-$ – Peroxinitrito

PDEs – Fosfodiesterases

PGE2 – Prostaglandina E2

RFG – Ritmo de filtração glomerular

Rho 123 – Rodamina 123

RIFLE –*Risk, injury, failure, loss, end-stage*

RVR – Resistência vascular renal

SHAM – Falso-operado

SNC – Sistema nervoso central

NPS – Nitroprussiato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

SBF – Soro bovino fetal

SDS– dodecil-sulfato de sódio

TFG – Taxa de filtração glomerular

TCI⁻– Transporte de cloreto

%TCI⁻– Percentual do transporte tubular total de cloreto

%pTCI⁻– Percentual do transporte tubular proximal de cloreto

TK⁺– Transporte de potássio

%TK⁺ – Percentual do transporte tubular total de potássio

%pTK⁺ – Percentual do transporte tubular proximal de potássio

TNa⁺– Transporte de sódio

%TNa⁺ – Percentual do transporte tubular total de sódio

%pTNa⁺– Percentual do transporte tubular total de sódio

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	10
1.1Lesão renal aguda (LRA)	10
1.2 Fisiopatologia da disfunção endotelial	15
1.3Disfunção endotelial na LRA	19
1.4 Óxido nítrico	21
1.5 Complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos	23
2JUSTIFICATIVA	26
3OBJETIVOS	28
3.1Objetivo geral	28
3.2Objetivos específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Síntese dos complexos de rutênio	29
4.2 Animais de Experimentação	30
4.3 Aspectos éticos	30
4.4 Perfusão Renal em Modelo de Rim Isolado de Rato	30
<i>4.4.1 Sistema utilizado</i>	30
<i>4.4.2 Calibração do sistema</i>	32
<i>4.4.3 Solução Perfusora</i>	34
<i>4.4.4 Procedimento cirúrgico</i>	34
<i>4.4.5 Protocolo experimental</i>	36
<i>4.4.6Grupos experimentais</i>	36
<i>4.4.7 Análises Bioquímicas</i>	37
<i>4.4.8 Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais</i>	37
<i>4.4.9 Determinação de GMPc por ELISA</i>	38

4.4.10 <i>Análise Histológica</i>	38
4.5 Avaliação do efeito dos complexos de rutênio em cultura de células tubulares renais	39
4.5.1 <i>Cultivo de células renais</i>	39
4.5.2 <i>Indução de I/R in vitro</i>	40
4.5.3 <i>Ensaio de Viabilidade Celular por Redução do MTT</i>	41
4.5.4 <i>Ensaio de Respiração Celular por Citometria de Fluxo</i>	41
4.5.5 <i>Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial</i>	42
4.6 Lesão Renal Aguda por Isquemia seguida de Reperfusão (I/R)	43
4.6.1 <i>Avaliação Bioquímica dos Animais</i>	45
4.6.2 <i>Procedimentos realizados nas amostras de sangue</i>	45
4.6.3 <i>Dosagem de creatinina plasmática e urinária</i>	45
4.6.4 <i>Cálculo da taxa de filtração glomerular</i>	45
4.6.5 <i>Determinação de ureia plasmática</i>	46
4.6.6 <i>Determinação da fração de excreção de sódio e potássio</i>	46
4.6.7 <i>Determinação dos Níveis de Glutathione Reduzida (GSH)</i>	47
4.6.8 <i>Determinação da produção de Nitrito/nitrato (NOx)</i>	47
4.6.9 <i>Imunohistoquímica para TNF-α e iNOS</i>	48
4.7 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Efeitos dos complexos de rutênio na perfusão de rim isolado de ratos	49
5.1.1 <i>Quantificação de GMPc por ELISA</i>	61
5.1.2 <i>Análise Histológica dos Rins Perfundidos com FOR 811 A e FOR 011 A</i>	63
5.2 Cultura de células e viabilidade celular	66
5.3 Efeito do FOR 811 A sobre os marcadores de função renal	71
5.4 Efeito do FOR 811 A sobre a função tubular	73

5.5 Efeito do FOR 811 A sobre o dano oxidativo	75
<i>5.5.1 Efeito do FOR 811 A sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) tecidual após LRA por I/R</i>	75
<i>5.5.2 Efeito do FOR 811 A sobre os níveis de nitrito/nitrato tecidual após LRA por I/R</i>	76
5.6 Efeito do FOR 811 A na marcação imunohistoquímica para TNF-α e iNOS	77
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Rins e lesão renal aguda (LRA)

Os rins são órgãos de grande importância para a manutenção da homeostase do meio interno, conservação do volume e tônus vascular. Recebem alta taxa de fluxo sanguíneo, 20 a 25% do débito cardíaco e têm os néfrons como unidades morfofuncionais responsáveis pela filtração sanguínea para excreção de substâncias do organismo, os quais são imprescindíveis na eliminação de substâncias tóxicas, como ureia, creatinina e substâncias exógenas(SILVERTHORN, 2010;GUYTON;HALL, 2011;GOLANet *al.*, 2014).

Os rins fazem ultrafiltração do sangue a fim de manter o balanço hidroeletrólítico, reabsorvem a quase totalidade desse ultrafiltrado e eliminam catabólitos indesejáveis. A taxa de filtração glomerular (TFG) média é de 125mL/min, o que corresponde à filtração do volume plasmático total 60 vezes por dia. Esses órgãos atuam desse modo, não só na regulação do volume do líquido extracelular, da pressão sanguínea e da osmolaridade, na manutenção do equilíbrio iônico, na regulação homeostática do pH, como também na excreção de resíduos e produção de hormônios (SILVERTHORN, 2010; YU, 2012).

Existem dois tipos mais importantes de alterações renais, a lesão renal aguda (LRA) e a lesão renal crônica (LRC). A LRA tem uma evolução mais rápida e abrupta com perda significativa da função renal. Já a LRC mostra uma evolução mais lenta com anormalidades da estrutura ou função renal que podem estar ocorrendo por um período igual ou superior a três meses (JHA; PARAMESWARAN, 2013;KO *et al.*, 2018).

A prevalência de lesão renal aguda (LRA) encontra-se maior nos países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos. O número de casos de LRA em todo o mundo está acima de 13,3 milhões por ano, dos quais 11,3 milhões estão em países de baixa a média renda e são responsáveis por até 1,4 milhão de mortes por ano (PONCE; BALBI, 2016).

Apesar dos avanços na clínica médica, não existem terapias definidas para o tratamento da LRA que ainda apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade, além de prolongada hospitalização, o que sobrecarrega os custos dos sistemas de saúde (KUMAR, 2018). As causas para o desenvolvimento de LRA podem estar relacionadas ao envelhecimento da população mundial e ao aumento de co-morbidades que são fatores de

risco para o desenvolvimento dessa patologia, tais como, diabetes, hipertensão, doença cardiovascular e doença renal crônica (HSU *et al.*, 2016).

A LRA é uma doença sistêmica aguda, com grandes consequências para outros órgãos além do rim, e está associada a efeitos significativos em curto prazo (por exemplo, anormalidades fluídicas, eletrolíticas e ácido-básicas, acúmulo de toxinas urêmicas, elevação de citocinas, inflamação sistêmica) e resultados adversos em longo prazo (infarto do miocárdio, doença renal crônica, doença renal em estágio final e mortalidade). A necessidade de diálise e transplante é aumentada, assim como a duração do período de internação dos pacientes. A lesão renal aguda é vista como um importante problema de saúde global, com crescente incidência em diversos países e altos custos de saúde associados (WIEDERMANN; WIEDERMANN; JOANNIDIS, 2017).

A fim de tornar a classificação clínica da LRA uniforme, foram criados os critérios *Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage* (RIFLE) e, posteriormente, *Acute Kidney Injury Network* (AKIN), os quais caracterizam a LRA em função da creatinina sérica ou plasmática e da diurese. Mais recentemente, o *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KIDGO) propôs uma nova classificação para os estágios de lesão renal aguda, abrangendo tanto critérios de RIFLE, quanto de AKIN (KIDGO, 2012; LUO *et al.*, 2014).

O critério RIFLE aborda três graus de severidade da LRA (*Risk, Injury, Failure*), de acordo com as alterações de creatinina sérica e produção de urina. Consideram-se, ainda, mais estágios da patologia tidos como finais (*Loss, End-stage*). O critério AKIN tornou o critério RIFLE mais sensível e específico ao levar em conta menores mudanças nos valores de creatinina sérica ($\geq 0,3$ mg/dl) em um período de 48 horas e volume urinário (KIDGO, 2012; LUO *et al.*, 2014). O critério KIDGO considera três etapas separadas da LRA de acordo com as mudanças nos níveis basais de creatinina sérica e produção de urina (ÜLGER *et al.*, 2017).

Os critérios para classificação de LRA de RIFLE, AKIN e KDIGO encontram-se nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1– Critérios de RIFLE para classificação da LRA

Classificação RIFLE		
Classe	Fluxo urinário	Creatinina sérica(CrS) ou RFG
<i>Risk</i>	< 0,5 ml/kg/h > 6h	CrSx 1,5 ou diminuição > 25% do RFG
<i>Injury</i>	< 0,5 ml/kg/h > 12 h	CrSx 2 ou diminuição > 50% do RFG
<i>Failure</i>	< 0,3 ml/kg/h por 24h ou anúria/12h	CrSx 3, ou CrS>4mg/dL com aumento agudo > 0,5 mg/dL ou diminuição do RFG >75%
<i>Loss</i>		Perda completa da função renal > 4 semanas
<i>End-stage kidney disease</i>		Estágio final da doença renal > 3 meses

Crítérios de RIFLE (*risk, injury, failure, loss* and *end-stage*) para classificação de lesão renal aguda, levando-se em consideração a medição de creatinina sérica e aumento em relação a valores dentro da faixa de normalidade de CrS, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário dos pacientes. CrS: creatinina sérica, RFG: ritmo de filtração glomerular. Fonte: adaptado de KIDGO (2012).

Tabela 2– Critérios de AKIN para classificação da LRA

Classificação AKIN		
Estágio	Fluxo urinário	Creatinina sérica (CrS)
1	< 0,5 ml/kg/h > 6h	Aumento da CrS \geq 0,3mg/Dl ou aumento \geq 1,5 a 2 x o valor basal
2	< 0,5 ml/kg/h > 12 h	Aumento da CrS > 2 a 3 x o valor basal
3	< 0,3 ml/kg/h por 24h ou anúria/12h	Aumento da CrS > 3x o valor basal, ou \geq 4x com aumento agudo de ao menos 0,5mg/dL

Critérios de AKIN (*Acute Kidney Injury Network*) para classificação de LRA que considera os valores de creatinina sérica e aumento em relação aos valores basais em 48 horas, como também considera os valores de fluxo urinário. (CrS: creatinina sérica. Fonte: adaptado de KIDGO(2012).

Tabela 3– Critérios segundo KDIGO para classificação da LRA

Classificação KIDGO		
Estágio	Fluxo urinário	Creatinina sérica (CrS)
1	< 0,5 ml/kg/h > 6h	Aumento \geq 0,3mg/dl com 48h ou aumento da CrS x 1,5 a 1,99 do valor basal em 7 dias
2	< 0,5 ml/kg/h > 12 h	Aumento de CrS x 2,0 ou 2,99 do valor basal em 7 dias
3	< 0,3 ml/kg/h por 24h ou anúria/12h	Aumento de CrS \geq 3,0 x o valor basal em 7 dias, aumento de 0,3mg/dl em 48h ou CrS \geq 1,5 x do valor basal dentro de 7 dias. Ou ainda, qualquer requisito para terapia de substituição renal

Critérios de KIDGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) para classificação de LRA que considera tanto critérios RIFLE como critérios KIDGO e baseiam-se na medição de valores de creatinina sérica e fluxo urinário. CrS: creatinina sérica. Fonte: adaptado de THOMAS *et al.* (2014).

O parâmetro mais utilizado para o diagnóstico da LRA é a concentração de creatinina plasmática, a qual indica equilíbrio entre geração e excreção de creatinina. Como esta é produzida pelos músculos, pacientes que apresentam massa muscular reduzida, podem apresentar níveis baixos de creatinina, apesar de uma considerável lesão renal. Novos

biomarcadores, então, estão sendo explorados a fim de possibilitar diagnóstico precoce da LRA. Os mais estudados são: lipocaína associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), IL-18, a molécula de lesão renal (KIM-1), cistatina C, entre outros. Dentre esses biomarcadores, o NGAL é o mais precoce, enquanto o KIM-1 é o mais específico (KASHANI; CHEUNG PASITPORN; RONCO, 2017).

Existem três tipos de lesão renal aguda: pré-renal, renal e pós-renal. As principais causas da LRA pré-renal estão associadas à hipovolemia que acaba por reduzir parcial ou totalmente a perfusão renal, o que pode gerar danos ao órgão, tais como, hipovolemia por vômitos, diarreia, queimaduras, hemorragias; diminuição da volemia arterial efetiva (insuficiência cardíaca congestiva, peritonites, choque, sepse) e diminuição aguda do débito cardíaco (infarto do miocárdio, por exemplo). Os rins permanecem íntegros, o que torna o processo reversível se realizado antes que ocorra lesão (YU *et al.*, 2012).

A LRA renal envolve patologias que afetam diretamente o parênquima renal, seja de ordem glomerular ou tubular, seja de ordem intersticial. Necrose tubular aguda isquêmica ou tóxica (medicamentos, peçonhas animais, metais pesados), nefrite intersticial aguda (reações alérgicas, infecções, etc), doenças vasculares, glomerulopatias e sepse são apontadas como causas principais (YU *et al.*, 2012).

A LRA pós-renal ou obstrutiva se dá em casos de obstrução ureteral e pélvica por coágulos, cálculos e infecções, vesical por coágulos e cálculos, uretral por estreitamento e fimose, dentre outras causas. Em consequência dessa obstrução há um aumento na pressão hidráulica das vias urinárias, o que afeta os túbulos e prejudica a filtração glomerular (DA COSTA; VIEIRA-NETO; MOYSÉS NETO, 2003; YU *et al.*, 2012).

A lesão por isquemia/reperfusão (I/R) se enquadra na LRA do tipo renal e se relaciona à alta morbimortalidade em várias doenças como o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral isquêmico, a lesão renal aguda e o trauma. Em casos de grandes cirurgias e transplante de órgãos, a lesão por I/R pode influenciar de modo relevante o desfecho clínico dos casos (SALVADORI; ROSSO; BERTONI, 2015). A maior parte dos quadros clínicos de LRA é proveniente de lesões por isquemia (KANAGASUNDARAM, 2015). O processo fisiopatológico da LRA após I/R leva a mudanças funcionais e estruturais que são centradas em torno das células do túbulo proximal e do endotélio (BAGUL; FROST; DRAGE, 2013).

1.2 Fisiopatologia da lesão por isquemia e reperfusão

A lesão por I/R é uma causa comum de LRA em contextos clínicos, como transplante de rim, cirurgia de bypass cardíaco e choque. Uma série de alterações patológicas complexas está envolvida na lesão por I/R renal, incluindo o dano tecidual hipóxico/isquêmico inicial, o estresse oxidativo associado à reperfusão e a ativação de células imunes, bem como disfunção microvascular. A isquemia prolongada pode causar necrose tubular aguda e danos glomerulares que levam à disfunção e rejeição do enxerto após o transplante, doença renal crônica, doença renal terminal e ao aumento da mortalidade. A lesão endotelial grave é central para o processo de lesão por I/R (HOOSGOOD *et al.*, 2014).

A I/R renal é caracterizada por uma restrição no fluxo sanguíneo ao órgão seguida de uma reoxigenação e restauração do fluxo de sangue, que contribui para o desenvolvimento de LRA, visto que o rim é um órgão bastante sensível. Durante esse processo, o tecido danificado produz grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), originando estresse oxidativo, o qual interfere na fosforilação oxidativa mitocondrial e causa a depleção de ATP, o aumento de cálcio intracelular e a ativação de proteases dos fosfolípidos de membrana (MALEK; NEMATBAKHS, 2015).

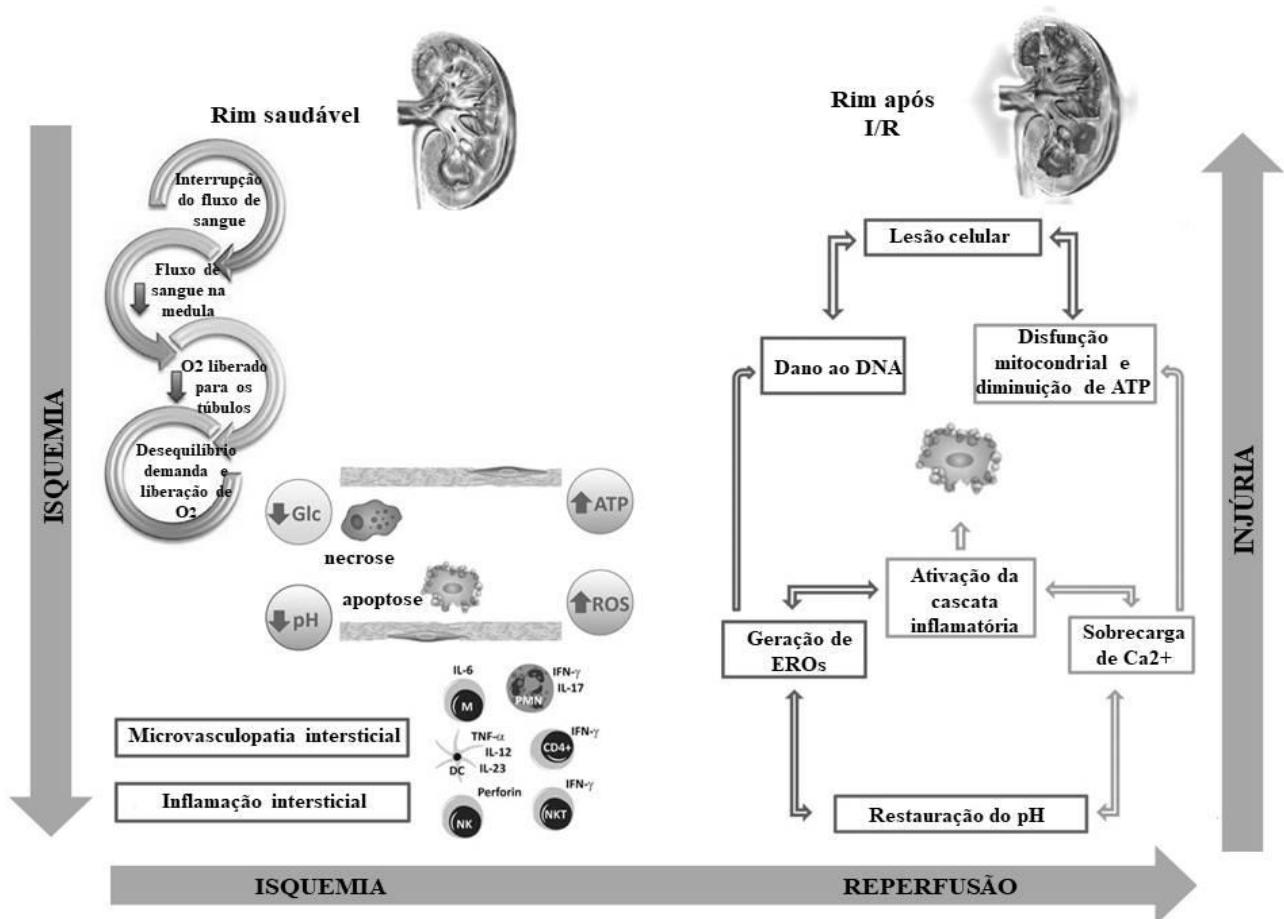
Na I/R renal, a interrupção do fluxo de sangue para o órgão leva à diminuição de glicose e liberação de oxigênio para os túbulos, causando um desequilíbrio na liberação e demanda de oxigênio. As células, então, são forçadas a produzir ATP em condições anaeróbicas, o que causa acidose tecidual. A depleção de ATP, por sua vez, aumenta a concentração de cálcio no citoplasma, levando à ativação de proteases, fosfolipases e caspases e ao acúmulo de hipoxantina e EROs, o que contribui para a morte celular. Além disso, células tubulares e do endotélio vascular liberam citocinas pró-inflamatórias, prolongando a isquemia e tornando a reperfusão mais lenta (ROSA; ANTONELLI; RONCO, 2017).

A reperfusão, ou seja, a reoxigenação após isquemia é um processo mais delicado o qual envolve a reconstrução do fluxo sanguíneo. No entanto, não há a restauração das condições normais do órgão, mas o aumento do dano por vários mecanismos inflamatórios e morte celular. Esses mecanismos compreendem “agressões” diretas às células, particularmente às mitocôndrias, além de expressão de citocinas e quimiocinas que podem levar a rejeições do órgão e ao desenvolvimento de fibrose (MENKE *et al.*, 2014; SALVADORI; ROSSO; BERTONI, 2015).

Após a reperfusão, algumas células podem se recuperar dos danos sofridos, mas outras sofrem desintegração. Uma das razões que leva à morte das células é a autointoxicação

destas com cálcio, pois o cálcio depende de ATP para estar em equilíbrio no citosol das células. No processo de hipóxia, a ausência de ATP leva ao aumento da concentração de cálcio intracelular, e essa alta concentração é tóxica para as células, o que desencadeia um processo de necrose ou até mesmo apoptose celular, conforme ilustra a Figura 1 (YU, 2012).

Figura 1 – Mecanismos envolvidos no processo de LRA por I/R



Lesão por isquemia/reperfusão (I/R). A interrupção do fluxo de sangue causa desequilíbrio entre a liberação e demanda de O₂: conseqüente hipóxia, depleção de glicose, acidose e produção de EROs contribuem para a morte celular. Além disso, células epiteliais tubulares e endoteliais vasculares liberam citocinas pró-inflamatórias (inflamação intersticial) que são responsáveis por um inchaço das células endoteliais que culmina em isquemia prolongada e reperfusão mais devagar (microvasculopatia intersticial). Durante a reperfusão, a restauração do pH induz liberação de Ca²⁺ que leva a sobrecarga desse íon e aumento de radicais livres, contribuindo para a ativação da cascata inflamatória e injúria celular. ATP: adenosina trifosfato, EROs e ROS: espécies reativas de oxigênio, GLC: glicose, IL: interleucina, IFN: interferon, I/R: isquemia/reperfusão, TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: Adaptado de Rosa, Antonelli e Ronco (2017).

Durante a reperfusão, pode haver a produção de radicais livres de oxigênio que levam à peroxidação lipídica, principal via de dano tecidual por radicais livres, os quais causam peroxidação dos lipídeos da membrana tecidual e danos oxidativos de proteínas, resultando em morte celular (MALEK; NEMATBAKSH, 2015).

O estresse oxidativo se dá pelo desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas e está presente em várias patologias, tais como: na isquemia, na aterosclerose, nas doenças neurodegenerativas e também no envelhecimento. O estresse oxidativo é mediado por espécies reativas de nitrogênio (ERNs), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrilo (ONOO^-), e de oxigênio (EROs), ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em altas concentrações, essas espécies altamente reativas podem atacar enzimas, lipídeos da membrana e DNA e provocar até morte celular por necrose ou apoptose (RANG *et al.*, 2011; PALIPOCH, 2013).

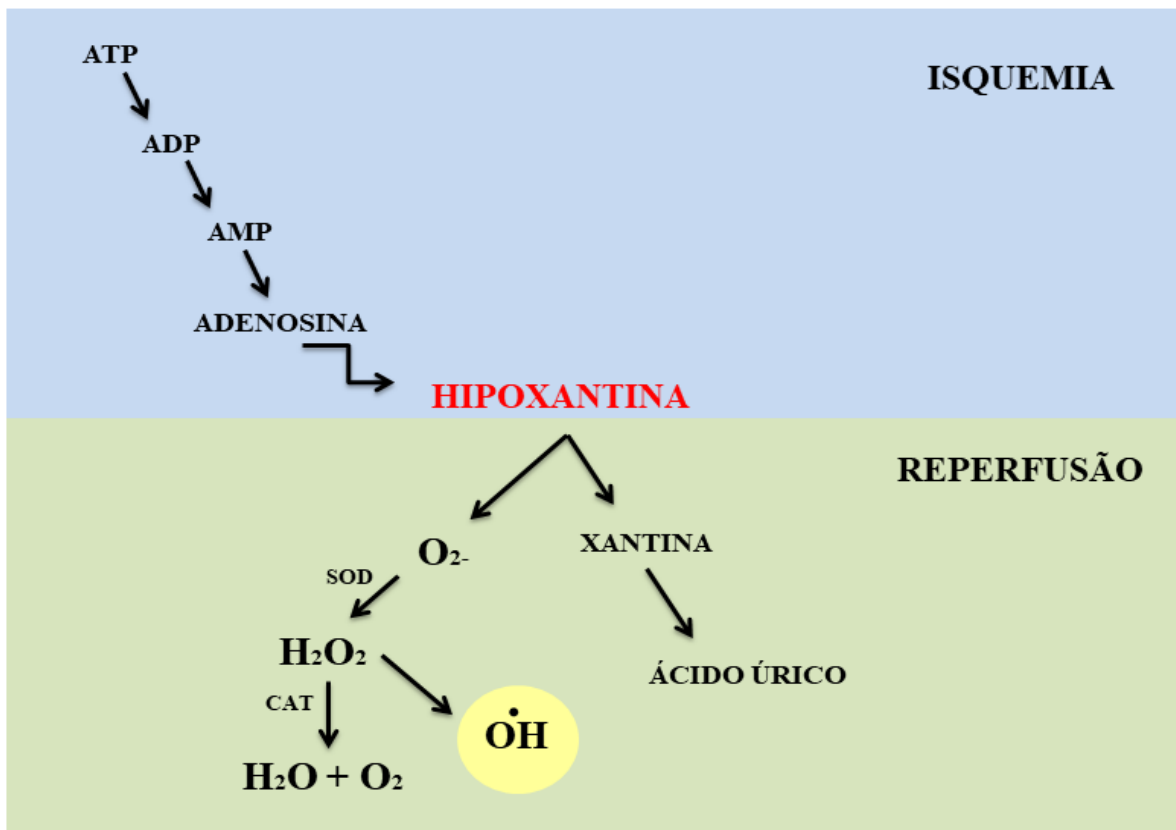
O organismo, portanto, apresenta mecanismos de defesa a fim de combater os possíveis danos realizados pelas espécies reativas. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD) agem convertendo O_2^- em H_2O_2 , e a catalase reduz H_2O_2 em água. Além dessas enzimas, antioxidantes como o ácido ascórbico, a glutatona e o α -tocoferol (vitamina E) ajudam a manter essas espécies reativas em equilíbrio (RANG *et al.*, 2011; SUNG *et al.*, 2013). A glutatona reduzida (GSH), enzima predominantemente intracelular, age reduzindo e inativando H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos para água e oxigênio (SUNG *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo se dá principalmente na mitocôndria por meio da cadeia transportadora de elétrons, desse modo, a disfunção mitocondrial é uma característica de LRA, visto que a perda da homeostase mitocondrial acompanha a lesão epitelial tubular presente nessa patologia (DUANN *et al.*, 2016).

Na I/R renal, a hipóxia do órgão resulta no consumo das moléculas de ATP, gerando grande quantidade de adenosina e seu metabólito, a hipoxantina. A hipoxantina é metabolizada apenas em condições aeróbicas, então, durante a isquemia esse metabólito se acumula na célula até a reoxigenação. Nesse momento, a hipoxantina é transformada em xantina e ácido úrico, o catabólito final. Os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^\cdot), gerados nessa reação, são bastante citotóxicos. Esse mecanismo de formação da hipoxantina é mostrado no esquema da Figura 2 (YU, 2012).

Figura 2 – Mecanismo da formação de hipoxantina na LRA por I/R

Na isquemia/reperfusão renal, a hipóxia do órgão leva a depleção de ATP, o que causa a formação de adenosina e



seu metabólito, a hipoxantina, a qual é metabolizada apenas em condições aeróbicas. Desse modo, dá-se o acúmulo de hipoxantina até que haja reoxigenação do órgão durante a reperfusão. Segue-se, então, a transformação de hipoxantina em xantina e ácido úrico, o catabólito final. Há também a geração de radicais livres citotóxicos, superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH). Fonte: Adaptado de Yu (2012).

Substâncias com propriedades antioxidantes têm demonstrado efeitos em modelos de lesão renal nos quais a fisiopatologia compreende também o estresse oxidativo. Giovannini *et al.* (2001) mostraram que o pré-tratamento com reverastrol, uma substância com propriedades antioxidantes, foi capaz de reduzir a lesão renal por I/R em ratos, pelo aumento de NO e sua regulação. Outro grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento com vitamina C, E e hidrocortisona foi capaz de evitar efeitos deletérios provocados pelo estresse oxidativo em lesão renal por I/R (AZARI *et al.*, 2015).

A lesão por I/R também provoca uma cascata inflamatória com a participação de citocinas, quimiocinas e ativação leucocitária (MALEK; NEMATBAKSH, 2015). Citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IFN, $TNF\alpha$ e IL-1 β , têm papel importante na lesão por I/R. Além disso, espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidas pela indução do mediador inflamatório iNOS (KESIC; STAJIC; THAISS, 2017).

A LRA inclui dano às células tubulares renais que resulta em apoptose e necrose e é caracterizada por inflamação inicial ocasionada por um dano que pode ser por infecção sistêmica ou isquemia (ITENOV *et al.*, 2017). A inflamação é um importante componente nessa patologia a qual leva ao aumento da lesão túbulo-intersticial durante as fases mais avançadas da doença. Várias citocinas e quimiocinas inflamatórias são liberadas pelo epitélio tubular proximal danificado, ocasionando a infiltração de macrófagos e neutrófilos. Essas células inflamatórias, por sua vez, promovem novas lesões renais e fibrose intersticial (YU *et al.*, 2017).

Evidências recentes apontam o envolvimento tanto da resposta imune inata quanto da adquirida na mediação dos danos e recuperação das células tubulares renais na LRA, no entanto, o sistema imunológico inato tem maior participação. De acordo com o grau de lesão, células dendríticas, monócitos/macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B podem estar envolvidos em lesões renais. Outrossim, os níveis de TNF- α demonstraram correlacionar-se também com o grau de lesão. Em contrapartida, macrófagos e células T reguladoras são de grande importância na supressão da inflamação e reparação do dano tecidual (BONAVIA; SINGBARTL, 2017).

Além de uma resposta inflamatória exacerbada, a patologia da LRA envolve ainda disfunção endotelial, alterações na microcirculação e injúria tubular (SHARFUDDIN; MOLITORIS, 2011). Estudos têm apontado evidências de que a injúria vascular, principalmente a lesão de células endoteliais, desempenha papel importante na patofisiologia da LRA isquêmica (SUTTON *et al.*, 2003).

1.3 Disfunção endotelial na LRA

O endotélio vascular que reveste as paredes internas dos vasos tem múltiplas funções, como a manutenção da homeostase do microambiente, troca de nutrientes, reações de defesa do hospedeiro e regulação de tônus vascular. Trata-se de uma única camada de células que alinha o lúmen e mantém a estrutura da parede dos vasos sanguíneos (MEHTA; MALIK, 2006).

O endotélio age como uma barreira entre os compartimentos intravascular e extravascular e está em uma posição anatômica que permite interação não somente com células e componentes do sangue circulante, mas também com células na parede dos vasos. As células endoteliais são células longas e planas orientadas ao longo do eixo dos vasos e são componentes principais do endotélio desses vasos. Uma célula endotelial média tem tamanho

entre 20 a 40 μM de comprimento, 10-15 μM de largura e apenas 0.1-0.5 μM de espessura (CAHILL; REDMOND, 2016; SUN *et al.*, 2016).

As células endoteliais medeiam funções, tais como: a modulação do tônus vascular, manutenção da fluidez sanguínea, regulação de inflamação e resposta imune e neovascularização. O comprometimento do endotélio é um complexo evento fisiopatológico que inclui tanto o aumento da ativação das células endoteliais como o início da disfunção dessas células (INCALZA *et al.*, 2017).

O dano endotelial é secundário a uma variedade de estímulos, resulta na perda de integridade endotelial, disfunção da barreira e regulações anormais de vasodilatação e vasoconstrição e leva eventualmente à alteração do ambiente vascular. Posteriormente, essa alteração provoca mudanças na hemodinâmica vascular, afeta a perfusão de órgãos e dá origem a ocorrência de eventos cardiovasculares e alta incidência de mortalidade (ZHANG *et al.*, 2017).

A destruição da função do endotélio é caracterizada por estresse oxidativo, resposta inflamatória, adesão de leucócitos, ativação plaquetária e trombose em doenças cardiovasculares, o que leva ao desenvolvimento de aterosclerose, hipertensão e diabetes. A disfunção endotelial também é tida como um fator de risco independente para distúrbios cardiovasculares (SUN *et al.*, 2016). Além disso, essa disfunção está associada ao envelhecimento, à insuficiência renal, síndrome coronária, microalbuminúria, trombose, hiperglicemia, obesidade, hipercolesterolemia, inflamação, vasculite, sepse, artrite reumatóide, dentre outras patologias (FELETOU; VANHOUTTE, 2006).

A microvasculatura renal tem papel de destaque na fisiopatologia da LRA. Em condições de estado estacionário, não há somente a necessidade da produção de trifosfato de adenosina (ATP) mitocondrial a partir de O_2 , como também de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) para o controle da hemostasia. Com a lesão, a microcirculação é comprometida, desencadeando um desequilíbrio na fonte de NO, O_2 e EROs, o que leva à hipóxia e ao estresse oxidativo. A lesão do endotélio microvascular resulta em processo inflamatório, que provoca o aumento da permeabilidade vascular, edema intersticial e comprometimento do fluxo sanguíneo, o que resulta em hipóxia e fibrose renal (ZUK; BONVENTRE, 2016).

A diminuição da capacidade de dilatação que muitas vezes é atribuída à produção reduzida de óxido nítrico, caracteriza, de certo modo, a disfunção endotelial (BASILE; YODER, 2014). Nas células endoteliais, o óxido nítrico (NO) é o principal responsável pela manutenção da homeostase vascular (INCALZA *et al.*, 2017). Assim, a maioria das doenças

cardiovasculares, como hipertensão, doença cardíaca coronária (angina de peito) e insuficiência cardíaca, é acompanhada de disfunção endotelial causada por uma deficiência de NO, sendo apontados como fatores de riscocomorbidades associadas à doença vascular, as quais envolvem envelhecimento, tabagismo, diabetes, hiperlipidemia e hipertensão (SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010).

1.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel produzido a partir de L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), o que leva a formação de NO e L-citrulina, um co-produto. O NO se apresenta de forma ubíqua em várias células por três diferentes isoformas de óxido nítrico sintases (NOS): induzível (iNOS), endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) (NAKANE; SCHMIDT; MURAD, 1991), as quais são enzimas constitutivas que podem ser induzidas em determinadas circunstâncias. Além disso, convém destacar que o NO é um radical livre com potente efeito vasodilatador (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; BOIM; ZATZ; TEIXEIRA, 2012).

A iNOS é induzida pela gama interferona em macrófagos e outras células, como células mesangiais glomerulares, células endoteliais vasculares e da musculatura lisa vascular; a nNOS se encontra no sistema nervoso central (SNC) e em nervos não noradrenérgicos e não colinérgicos. Já a eNOS está presente no endotélio, em plaquetas e outras células (RAIJ; BAYLIS, 1995; RANG *et al.*, 2011).

Geralmente, o NO atinge seus efeitos ligando-se ao grupo heme da forma solúvel de uma enzima chamada guanilato ciclase (GCs), a qual compreende uma classe importante de enzimas que, quando ativadas, sintetizam o segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e reduzem a concentração de cálcio intracelular. O GMPc é uma importante molécula de sinalização que estimula o relaxamento do músculo liso (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; HOOSGOOD *et al.*, 2014).

Os efeitos fisiológicos do GMPc são exercidos por meio da ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc, canais de íons nucleotídicos cíclicos e a ativação e/ou inibição de fosfodiesterases (PDEs), essas últimas, por sua vez, finalizam os efeitos do GMPc quando ativadas (MONICA; BIAN; MURAD, 2016).

A vasodilatação ou relaxamento do músculo liso se dá com a desfosforilação das cadeias leves de miosina, sendo esta potencializada quando há a ativação da GC no interior da célula muscular lisa. A guanilato ciclase ativada, por sua vez, aumenta a produção de 3'5'-

monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) que estimula a proteína quinase dependente de GMPc e ativa a fosfatase da cadeia leve de miosina. Dessa forma, a desfosforilação da cadeia leve de miosina leva a inibição da interação da cabeça da miosina com a actina, o que resulta no relaxamento do músculo liso (GOLAN *et al.*, 2014).

O NO também medeia o relaxamento do músculo liso vascular ativando diretamente os canais de potássio dependentes de cálcio (RAIJ; BAYLIS, 1995). O estímulo fisiológico que age na regulação da síntese endotelial de NO nos vasos de resistência é, provavelmente, o estresse de cisalhamento. Mecanorreceptores endoteliais reconhecem esse tipo de estímulo que é traduzido por uma serina-treonina proteína quinase Akt ou proteína quinase B. A Akt fosforila a NOS e a torna mais sensível a cálcio-calmodulina (DALE *et al.*, 2011).

Ademais, o NO também atua pela combinação com os grupos heme em outras proteínas, como o citocromo c oxidase; pela combinação com o ânion superóxido que leva a produção de um ânion citotóxico denominado peroxinitrito; e também pela nitrosilação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Os efeitos da ação do NO são variados e, além da vasodilatação, incluem a inibição da adesão e agregação de plaquetas e monócitos, inibição da proliferação do músculo liso, efeitos sinápticos no sistema nervoso central e periférico, defesa do hospedeiro, efeitos citotóxicos sobre as células e também citoproteção (RANG *et al.*, 2011).

A deficiência do NO pode estar relacionada à patogênese de distúrbios, como a hipertensão arterial, a pré-eclâmpsia, a nefropatia diabética e a doença renal crônica. Por outro lado, o excesso de NO pode levar ao desenvolvimento de processos inflamatórios (BOIM; ZATZ; TEIXEIRA, 2012).

O NO encontra-se presente no rim em suas três isoformas, endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), e é responsável pela manutenção do tônus vascular renal (GHOLAMPOUR; MOEZIB; SHAFAROODIC, 2017). No rim, mostra diferentes funções, dependendo de sua concentração, do local de liberação e da duração da ação. A geração de NO por iNOS demonstra efeitos citotóxicos nas células epiteliais tubulares renais. Por outro lado, um aumento na expressão de eNOS, que ocasiona um acréscimo na produção de NO derivado do endotélio, pode levar a melhora na lesão renal tóxica e isquêmica por mediar a vasodilatação, inibir a adesão leucocitária e reduzir a agregação plaquetária. A disfunção endotelial na lesão renal aguda por isquemia pode estar relacionada à baixa produção de NO endotelial, o que levaria a destruição das células epiteliais tubulares por congestão vascular (KWON; HONG; RAMESH, 2009).

Vários estudos apontam o uso do NO como um bom agente protetor da lesão por I/R em vários órgãos, como coração, fígado, pulmões e rins. Isso pode ser devido ao potencial antioxidante e anti-inflamatório do NO (PALLER; WEBER; PATTEN, 1998; PHILLIPS *et al.*, 2009). Uma hipótese sugere que na lesão de I/R renal existe uma redução no óxido nítrico sintase endotelial (NOS), mas um aumento na NOS induzível. Esse contraste contribui para a inflamação e vasoconstrição durante a reperfusão. Para beneficiar a isquemia, em teoria, pode-se destacar que o NO é um vasodilatador potente, bem como um eliminador de oxigênio livre (NILSSON *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017).

Um distúrbio da via NO/GCs/GMPc parece ser a causa principal da disfunção endotelial, apesar de outros mecanismos estarem relacionados (MONICA; BIAN; MURAD, 2016). O uso de doadores de óxido nítrico, como nitroprussiato de sódio (NPS) e nitroglicerina, é alvo de estudos que buscam o tratamento ou atenuação da lesão por I/R (SEKHON *et al.*, 2003; PHILLIPS *et al.*, 2009).

1.5 Complexos de rutênio e doadores de óxido nítrico

O uso da química inorgânica medicinal se dá há quase 5000 anos. Vários medicamentos compostos por ferro eram usados no Egito a cerca de 1500 anos A.C., assim como o zinco era usado para a cicatrização de feridas. Na Europa, na era Renascentista, o cloreto mercurioso era usado como diurético e, na mesma época, descobriu-se a necessidade nutricional do ferro (ORVIG; ABRAMS, 1999). No entanto, o impulso no uso de compostos metálicos na terapêutica deu-se com a descoberta acidental da atividade antineoplásica da cisplatina em 1965 pelo biofísico Barnett Rosenberg e sua equipe (ROSENBERG, 1985; AGBALE *et al.*, 2016).

Os metais apresentam como característica a perda de elétrons do estado metálico para formar íons carregados positivamente que, em sua maioria, são solúveis em fluidos biológicos. As cargas opostas de íons metálicos e moléculas biológicas levam a uma tendência de interação entre eles, os constituintes das proteínas e ácidos nucleicos são excelentes ligantes para esses íons metálicos (ZHANG; LIPPARD, 2003). A utilização eficaz de complexos metálicos, como agentes antineoplásicos, anti-inflamatórios, antidiabéticos, antimicrobianos ou agentes de diagnóstico, evidencia que a toxicidade desses compostos pode ser controlada de acordo com a escolha certa de seus ligantes (CHYLEWSKA *et al.*, 2018).

Os compostos que liberam NO (ou doadores), tais como: nitroprussiato de sódio (NPS) e nitroglicerina, foram desenvolvidos para suprimir a deficiência de NO derivado do

endotélio em pacientes com riscos cardiovasculares (PRIVIERO; WEBB, 2010). Os nitratos orgânicos mais utilizados na clínica são a nitroglicerina, dinitrato de isossorbida e 5-mononitrato de isossorbida. No entanto, a tolerância farmacológica aos nitratos limita a eficácia clínica desses fármacos (GOLAN *et al.*, 2014).

O NPS é um vasodilatador bastante utilizado na clínica e composto por um grupo nitroso, cinco grupos de cianeto e um átomo de ferro. A ação vasodilatadora dessa substância se dá pela liberação de NO que parece acontecer de forma não enzimática, pois o NPS sofre decomposição espontânea e libera NO e cianeto. O NO liberado causa ação vasodilatadora tanto em artérias quanto em veias. Por outro lado, o metabolismo dos nitratos orgânicos a NO pode ser catalisado por enzimas, como a aldeído-desidrogenase mitocondrial (GOLAN *et al.*, 2014).

O NPS é utilizado por via intravenosa para controle hemodinâmico em emergências hipertensivas e na insuficiência cardíaca grave (CRUZ *et al.*, 2016). Esse composto apresenta como desvantagens ser fotossensível e liberar cianeto, pois o acúmulo excessivo de cianeto pode causar distúrbios do equilíbrio ácido-base e pode até mesmo levar o paciente a morte (CAMPELO *et al.*, 2012).

A descoberta da participação do óxido nítrico em vários processos fisiológicos e patologias levou a estudos com doadores de NO que incluem complexos nitrosilos metálicos em solução ou imobilizados em matrizes, com o intuito de compreender ambos os aspectos fundamentais a atividade biológica para potenciais aplicações. Entre os doadores de NO, nitrosilo complexos de rutênio mostram atraentes por sua estabilidade e solubilidade em água. Liberam NO a diferentes taxas que podem ser ajustadas pela escolha adequada dos ligantes. Como o NO pode ser benéfico ou prejudicial, dependendo da sua biodisponibilidade, os compostos capazes de liberar NO em um alvo biológico específico possuem potenciais aplicações biológicas e podem ser ferramentas úteis para estudar a ação fisiológica do NO (FERREIRA; TFOUNI, 2010).

Moléculas consideradas pequenas e com potenciais propriedades farmacológicas estão despertando o interesse de pesquisadores, o que tem direcionado novos estudos com complexos de coordenação e a aplicação do *design* planejado de compostos. Desse modo, a síntese de novos compostos com estabilidade redox e com propriedades fotofísicas desejáveis tem sido realizada com o uso de compostos derivados do sistema *cis*-bisbipiridina de rutênio(II). A adição de ligantes imidazólicos ao centro metálico desses compostos é uma alternativa para melhorar suas propriedades farmacológicas, visto que esses ligantes imidazólicos encontram-se presentes no grupo farmacofórico de várias drogas utilizadas na

clínica, como a cimetidina, azatioprima, dacarbazina, eberconazol, megazol, entre outros (GOUVEIA-JÚNIOR, 2017).

Complexos de nitrosil rutênio ou metalofármacos têm sido alvo de várias pesquisas nas últimas décadas, visto que estudos mostraram potencial efeito terapêutico, principalmente devido à sua rápida liberação de NO, somando-se a isso, apresentam baixo nível de toxicidade. Estudos apontaram o uso farmacológico desses complexos como reguladores da pressão sanguínea, agentes antitumorais, antimaláricos, entre outros (KARIDI *et al.*, 2006; CAMPELO *et al.*, 2012; EKENGARD *et al.*, 2015). Convém destacar que o rutênio é o elemento que mais forma nitrosilo complexos (CALANDRELLI; TFOUNI, 2005).

Nesse contexto, complexos de rutênio, incluindo complexos de nitrosilo ou nitrito, estão em destaque, visto que podem captar ou liberar óxido nítrico de forma controlada (CARAMORI *et al.*, 2013; GALVÃO DE LIMA *et al.*, 2014). Pereira e colaboradores (2011) mostraram que o complexo de nitrosilo rutênio, *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY), demonstrou ter atividade vasodilatadora com grande participação da via GCs-GMPc (PEREIRA *et al.*, 2011). Ademais, vários estudos apontam os complexos de nitrosilo rutênio como doadores de NO, os quais apresentam boa aplicação clínica (VATANABE *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A isquemia e reperfusão (I/R) renal é uma causa comum de disfunção renal em nefrectomia parcial, transplante renal, revascularização cirúrgica da artéria renal ou tratamento de aneurismas da aorta suprarrenal (GHASEMI *et al.*, 2015). Nenhuma terapia farmacológica eficaz é atualmente disponível para o tratamento de I/R renal; o tratamento convencional é usar inotrópicos, diuréticos e fármacos vasodilatadores, além de manutenção de água, equilíbrio de eletrólitos e até terapia de substituição renal. No entanto, os efeitos terapêuticos precisam ser melhorados (LE *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018).

Muitos mediadores estão envolvidos na fisiopatologia da lesão por I/R, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os metabólitos de purina, o acúmulo de neutrófilos, as substâncias vasoativas (endotelina, angiotensina II) e a subsequente liberação de enzimas líticas. O NO é um potente vasodilatador e tem sido apontado como um dos mediadores fundamentais na fisiopatologia da lesão renal por I/R, sua biodisponibilidade é central para a regulação do funcionamento vascular renal e se encontra reduzida na hipertensão e nefropatia diabética (EARLE, 2009; KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; GHOLAMPOUR; MOEZIB; SHAFAROODIC, 2017). Os efeitos do NO dependem de sua concentração no meio biológico. Baixas concentrações de NO estão relacionadas com efeitos regulatórios, enquanto concentrações mais altas estão relacionadas ao estresse nitrosativo e oxidativo (CARAMORI *et al.*, 2013).

A ativação de fatores relacionados à vasoconstrição tem papel importante no processo de lesão renal, portanto, tratamentos que visam a melhoria da função vascular podem ser uma boa alternativa no âmbito da LRA (BASILE; YODER, 2014). Doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam NO. Os mais utilizados na clínica são os nitratos orgânicos e inorgânicos, a nitroglicerina e o NPS. No entanto, o tratamento prolongado com esses fármacos tem mostrado efeitos adversos, tais como intolerância, disfunção endotelial, liberação de compostos tóxicos, taquicardia reflexa e outros efeitos adversos que são fatores limitantes para o uso destes fármacos (VATANABE *et al.*, 2017).

O estímulo direto da guanilato ciclase solúvel (GCs) está emergindo como uma abordagem potencial para o tratamento de doenças renais. A GCs catalisa a formação de GMPc, cuja deficiência está implicada na patogênese de doença renal. Nesse contexto, novas classes de fármacos ativadores e estimuladores de GCs estão sendo investigadas. No entanto,

existem poucos compostos que, efetivamente, estimulam/ativam a enzima GCs (EVGENOV,2006;STASCH;SCHLOSSMANN; HOCHER, 2015).

Assim, o estudo de novos compostos doadores de NO que não apresentem tantos efeitos indesejados é uma alternativa para o tratamento clínico. Os nitrosilo complexos de rutênio estão sendo estudados como doadores de NO, os quais são atrativos porque possuem formas ativas que são estáveis e de baixa toxicidade em condições fisiológicas. Outra característica importante apresentada por esses compostos é a liberação sustentada de NO (VATANABE *et al.*, 2017).

Estudo realizado por Campelo *et al.* (2012) com o nitrosilo complexo de rutênio $\text{cis-[Ru(bpy)}_2\text{(SO}_3\text{)(NO)]PF}_6$, doador de óxido nítrico, mostrou que esse metalofármaco foi capaz de melhorar a área de infarto cerebral em fase inicial de modelo de I/R cerebral. Por sua vez, Santana *et al.* (2015) demonstraram efeito antiinflamatório e antioxidante do $\text{cis-[Ru(bpy)}_2\text{(SO}_3\text{)NO](PF}_6$) em modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno.

Nesse contexto, o trabalho tem por objetivo investigar os efeitos renais de complexos de rutênio, FOR 811 A e FOR 011 A, a fim de possibilitar a descoberta de alternativas para patologias renais que apresentam o envolvimento da via NO/GCs/GMPc, como também, buscar esclarecer mecanismos relacionados a seu efeito nefroprotetor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos renais de complexos de rutênio (FOR 811 A e FOR 011 A) e seus possíveis efeitos nefroprotetores em modelo de lesão renal aguda.

3.2 Objetivos específicos

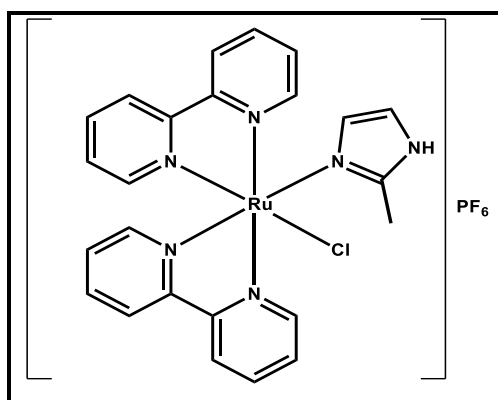
- Avaliar os efeitos do FOR811A e do FOR 011 A sobre a hemodinâmica renal em modelo de rim isolado de rato;
- Análisar histologicamente os rins perfundidos no experimento de perfusão de rim isolado;
- Analisar o envolvimento do biomarcador GMPc por teste de ELISA nos rins submetidos a perfusão renal;
- Avaliar o efeito do FOR 811 A e FOR 011 A sobre a viabilidade de células tubulares epiteliais renais LLC-MK2;
- Avaliar os efeitos do FOR 811 A e FOR 011 A na respiração celular por ensaios de citometria de fluxo em modelo de LRA *in vitro*;
- Avaliar os efeitos nefroprotetores do FOR811A em modelo de LRA *in vivo*;
- Determinar o efeito do FOR 811 A sobre os parâmetros bioquímicos de função renal de animais submetidos à I/R;
- Estudar os efeitos do FOR811A no contexto do equilíbrio redox através de ensaios de avaliação do estresse oxidativo no tecido renal;
- Analisar os efeitos do FOR 811 A na imunohistoquímica para TNF- α e iNOS dos rins dos animais submetidos a I/R *in vivo*.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese dos complexos de rutênio

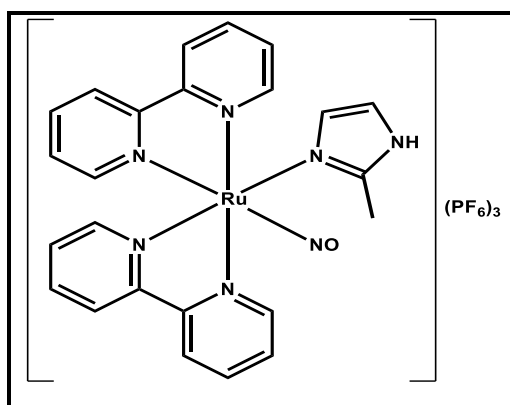
Os compostos de rutênio (*cis*- [Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺, representado pela sigla FOR 011A e *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³⁺, complexo com a molécula de NO, representado por FOR 811A, foram sintetizados no laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, de acordo com técnica descrita por Gouveia-Júnior (2017). As possíveis estruturas planas dos compostos estão representadas nas Figuras 3 e 4.

Figura 3—Estrutura plana do complexo de rutênio (*cis*- [Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺(FOR011A)



Fonte: Gouveia-Júnior (2017).

Figura 4—Estrutura plana do nitrosilocomplexo de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³⁺(FOR 811A)



Fonte: Gouveia-Júnior (2017).

4.2 Animais de Experimentação

Para os ensaios biológicos, foram utilizados ratos Wistar, em idade adulta, pesando entre 280 e 320g provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC). Os animais foram devidamente acondicionados em sala aclimatada à temperatura de 23° C, com estantes apropriadas e circulação de ar e permaneceram sob o ciclo claro-escuro de 12/12h com água e ração à vontade, em ambiente de microisolamento no biotério supracitado.

4.3 Aspectos éticos

O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob o número de protocolo 83/2017.

4.4 Perfusão Renal em Modelo de Rim Isolado de Rato

4.4.1 Sistema utilizado

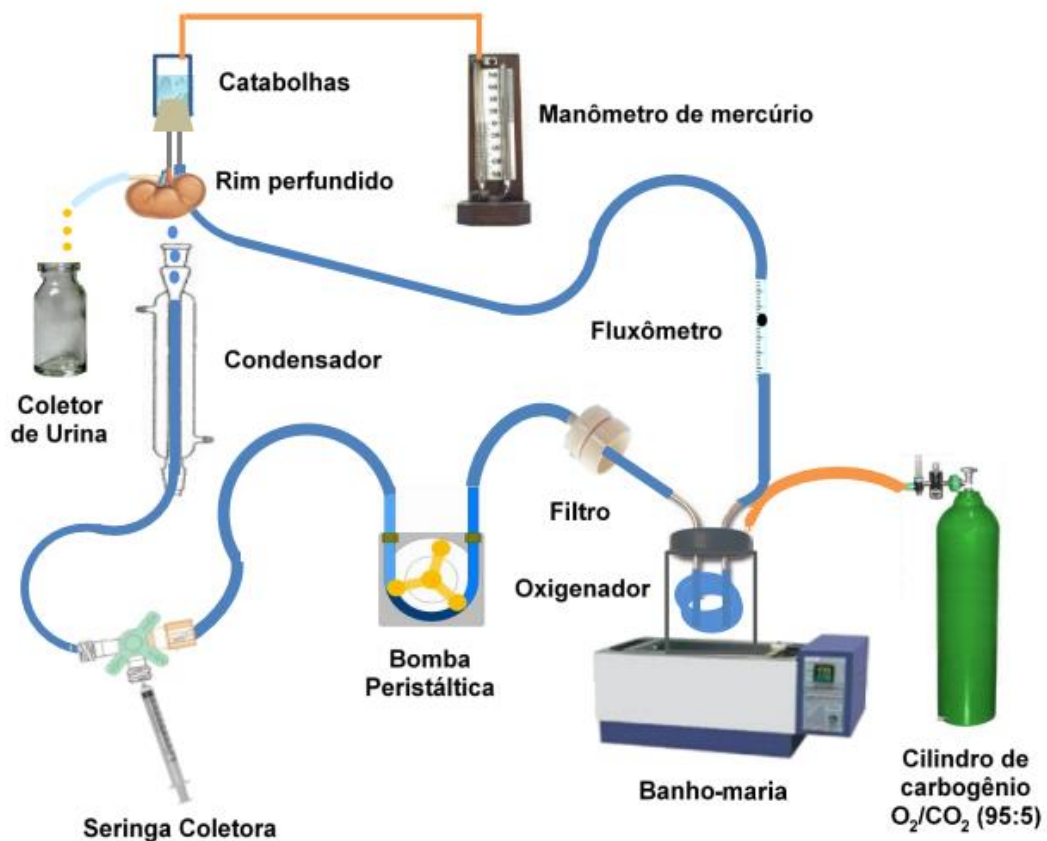
O sistema de perfusão de rim isolado é utilizado a fim de se estudar os efeitos renais sem interferências sistêmicas, no qual o rim é mantido fora do organismo em condições semelhantes às do organismo vivo (HU *et al.*, 2010; JORGE, 2013). O sistema utilizado consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) e contém dois subsistemas: um, *in situ*, e outro, em circuito fechado para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de 37°C. Utiliza-se albumina (fração V, 6g%) na solução perfusora. A oxigenação é proveniente de uma mistura carbogênica de O₂/CO₂ (95:5) adaptada ao sistema, e o perfusato recircula no rim com uma quantidade de 100 mL de solução Krebs-Hanseleit modificada. Esse sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais (MONTEIRO, 1980; FONTELES *et al.*, 1983; JORGE, 2013).

O sistema de perfusão de rim isolado com recirculação é composto dos seguintes equipamentos (Figura 5):

- a) Banho-maria: mantém a temperatura constante entre 36-37°C;
- b) Bomba peristáltica: bombeia a solução de perfusão no sistema em cinco velocidades;
- c) Catabolhas: capta as bolhas formadas, o que evita a entrada de bolhas nos rins;

- d) Cilindro de carbogênio: mantém a oxigenação (95% O₂: 5% CO₂);
- e) Coletor de urina: compreende o frasco para coleta de urina, que é trocado a cada 10 min;
- f) Condensador: mantém a solução aquecida a uma temperatura de 37°C;
- g) Filtro (Millipore 5μm): filtra a solução perfusora;
- h) Fluxômetro: mede o fluxo de perfusão (L/h);
- i) Manômetro: mede a pressão de perfusão (mmHg);
- j) Oxigenador ou pulmão artificial: promove as trocas gasosas;
- k) Seringa coletora: serve para realizar a coleta de perfusato a cada 10 min.

Figura 5– Esquema do sistema de perfusão de rim isolado



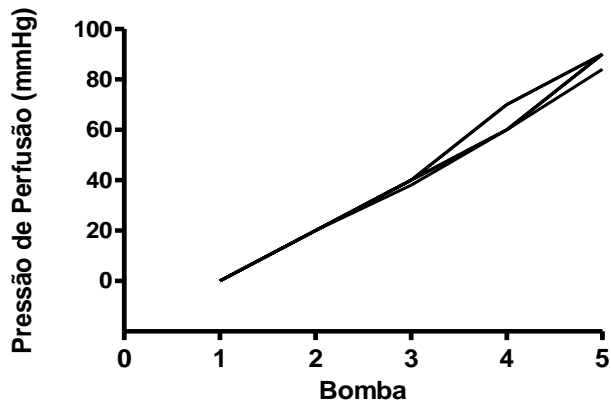
Fonte: LFAVET – UFC.

4.4.2 Calibração do sistema

Antes do início de cada experimento, o sistema é limpo e calibrado. A calibração foi realizada com solução de cloreto de sódio 0,9% com o sistema em funcionamento. Avaliou-se a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/h) e o volume de solução salina coletado em proveta milimetrada durante um minuto (ml/min) de acordo com as velocidades da bomba (1 a 5). O objetivo desse procedimento é também verificar o fluxo de perfusão frente à resistência do próprio sistema (cânula arterial). Tais resultados foram então compilados em curvas, e foi plotada a velocidade da bomba no eixo das abscissas (x) em relação às demais variáveis já citadas no eixo das ordenadas (y). Entre cada coleta (mudança na velocidade da bomba) se aguardava 2 minutos para a estabilização das novas condições, então se realizava novamente as medidas.

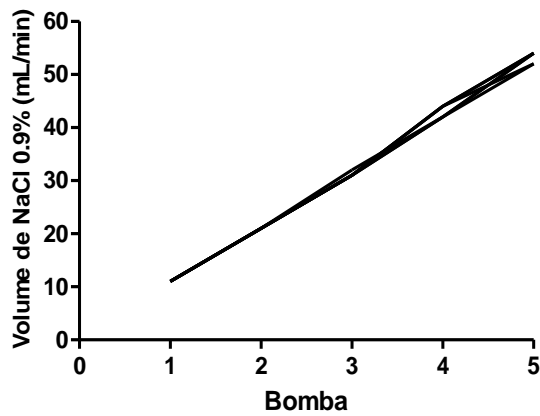
As Figuras 6, 7 e 8 trazem as plotagens das curvas de calibração.

Figura 6– Valores de Pressão de Perfusão (mmHg), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6)



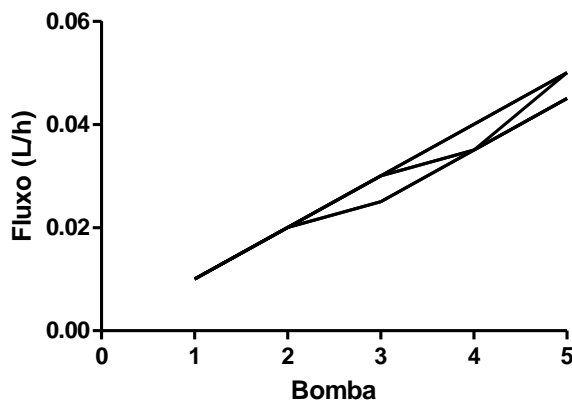
Fonte: LAFAVET – UFC.

Figura 7– Valores de Volume de NaCl 0,9% (mL/min), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6)



Fonte: LAFAVET – UFC.

Figura 8– Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h), relacionados à velocidade da bomba, durante a calibração do sistema (n=6)



Fonte: LAFAVET – UFC.

4.4.3 Solução Perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES, 1998), concentrada 20 vezes, é constituída por NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH₂PO₄.H₂O = 3,2g; MgSO₄.7H₂O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL dessa solução foram separados e acrescidos de NaHCO₃ = 4,2g; CaCl₂.2H₂O = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. 300 mL dessa solução foram retirados e adicionou-se albumina bovina (6g%). Essa solução final foi dializada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise foi realizada com a finalidade de se retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

A solução de Krebs-Henseleit modificada para diálise foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, acrescentou-se 0,15g de inulina à solução perfusora e ajustou-se o PH para 7,4.

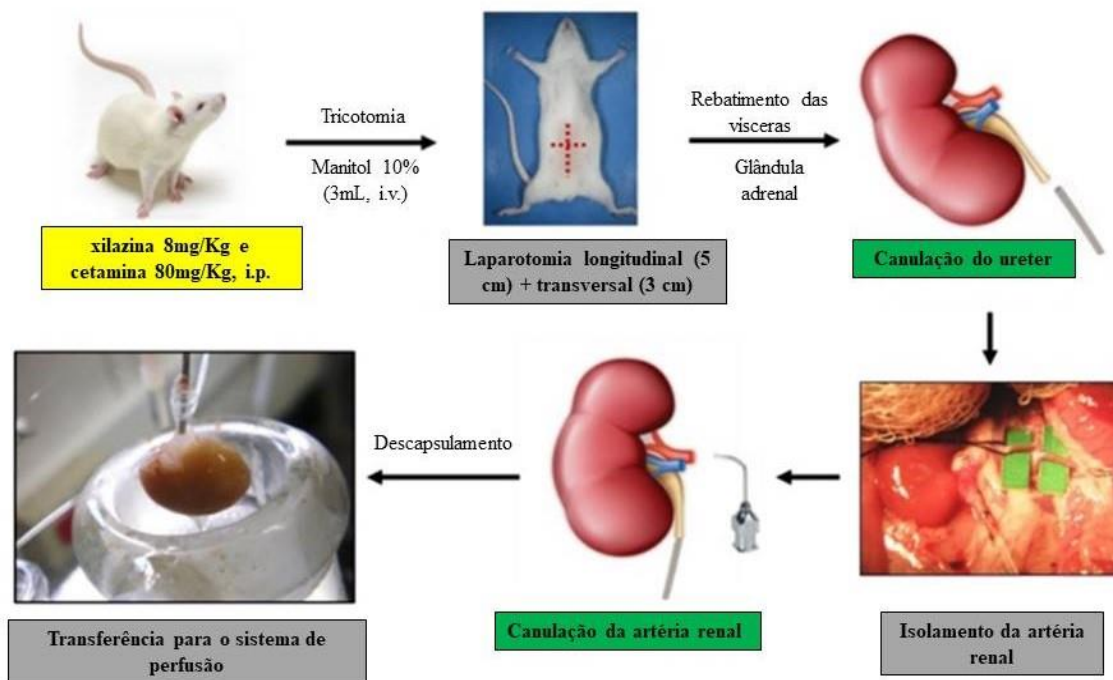
4.4.4 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com xilazina 8mg/Kg e cetamina 80mg/Kg, i.p. As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhmann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol a 10% (p/v) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, foi realizada uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Rebateu-se as vísceras para a esquerda, permitindo a visualização do rim direito e amarrrou-se e retirou-se a glândula suprarrenal a fim de que nenhum de seus hormônios viesse a influenciar os resultados do experimento. Com uma lupa, o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30.

A artéria renal foi isolada e canulada através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo(Figura 9).

Figura 9 – Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos.



Fonte: LFAVET – UFC.

4.4.5 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 min iniciais foram utilizados como controle interno, após o qual foram administradas as substâncias de acordo com os grupos experimentais citados anteriormente. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. As amostras de perfusato e urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal, tais como, resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular total e proximal de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e cloreto (%TCI).

4.4.6 Grupos experimentais

O estudo dos efeitos dos complexos de rutênio sobre a função renal foi iniciado após o período de controle interno de 30min, e as observações foram feitas durante os 90min seguintes. As concentrações foram estabelecidas de acordo com trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (NORÕES, 2014; SILVEIRA, 2015). Os experimentos com FOR 011 A foram realizados apenas em uma concentração devido a essa substância ter apresentado um maior nível de toxicidade nos experimentos realizados com células e por também não ter mostrado efeito protetor em modelo de I/R *in vitro*. A concentração do Nitroprussiato (NPS) foi a maior utilizada para as outras substâncias. Todas as substâncias foram diluídas em água destilada. Os grupos analisados foram os seguintes (n=06):

- a) Grupo Controle externo: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit;
- b) Grupo NPS (controle interno): rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e NPS na concentração de 1,0 µmol/L aos 30 min;
- c) FOR 811A 0,3µmol/L: rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e FOR 811 A na concentração de 0,3 µmol/L aos 30 min;
- d) FOR 811 A 1,0µmol/L: rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e FOR 811 A na concentração de 1,0 µmol/L aos 30 min;
- e) FOR 011A 1,0 µmol/L: rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e FOR 011 A na concentração de 1,0µmol/L aos 30 min;

4.4.7 Análises Bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato, foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando um analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil®). A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles *et al.* (1983) com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – modelo 5520 ESCOR).

4.4.8 Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais

O quadro abaixo (Quadro 1) apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

Quadro 1–Parâmetros utilizados para a determinação dos parâmetros renais

Parâmetros renais	Fórmula
PP (mmHg) – Pressão de Perfusão	Leitura em manômetro
FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) – Fluxo Urinário	FU = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) – Ritmo de Filtração Glomerular	RFG = (DOU _{in} /DOP _{in} x FU) sendo DOU _{in} = densidade ótica da inulina na urina e DOP _{in} = densidade ótica da inulina no perfusato.
FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo
RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) – Resistência vascular renal.	RVR = PP (mmHg) / FPR
FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Sódio filtrado	FNa⁺ = RFG x PNa ⁺
ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Sódio excretado	ENa⁺ = FU x UNa ⁺
TNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Sódio transportado	TNa⁺ = FNa ⁺ - ENa ⁺

%TNa⁺ – Percentual de sódio transportado	%TNa⁺ = TNa⁺ x 100/ FNa⁺
FKa⁺ (μEq.g⁻¹ . min⁻¹) – Potássio filtrado	FKa⁺ = RFG x PKa⁺
EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Potássio excretado	EK⁺= FU x UKa⁺
TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Potássio transportado	TK⁺ = FK⁺- EK⁺
%TK⁺ – Percentual de potássio transportado	%TK⁺= TK⁺x 100/ FK⁺
FCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Cloreto filtrado	FCl⁻ = RFG x PCl⁻
ECl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Cloreto excretado	ECl⁻= FU x UCl⁻
TCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Cloreto transportado	TCl⁻ = FCl⁻- ECl⁻
%TCl⁻ – Percentual de cloreto transportado	%TCl⁻= TCl⁻x 100/ FCl⁻

Fonte: LFAVET – UFC.

4.4.9 Determinação de GMPc por ELISA

A concentração de GMPc foi determinada em urinas obtidas do experimento de perfusão renal. As urinas foram previamente diluídas (1:50) no tampão do Kit segundo as recomendações do fabricante (CaymanChemical®, Michigan, EUA). O Kit utilizado foi de imunoenensaio competitivo em microplaca de 96 poços, para determinação quantitativa de GMPc. A dosagem consistiu na utilização de um anticorpo monoclonal de coelho que se liga ao GMPc ou a acetilcolinesterase (AChE) complexada ao GMPc (complexo presente no kit) de maneira competitiva. Adicionou-se um antissoro específico para GMPc, um substrato para a enzima AChE e as amostras ou padrões que foram incubados por 18 horas a temperatura de 4°C. Posteriormente, adicionou-se, então, o reagente de Ellman's a fim de haver uma reação com a AChE ligada ao anticorpo, gerando um produto colorido. A cor amarela formada foi lida em 405nm. A intensidade da cor é proporcional a concentração de GMPc nas amostras (quanto mais escura a cor, menos GMPc a amostra contém) e foi calculada a partir da curva padrão dos controles e foi expresso em pmol/mL/g.

4.4.10 Análise Histológica

As amostras de tecidos foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas. O material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser então desidratado em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento, foi realizada a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo

BH05. O material nos blocos de parafina foi cortado com 5 µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração.

Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para todas as amostras e observadas em microscópio Nikon Eclipse Nis. Software Nis 4.0.

4.5 Avaliação do efeito dos complexos de rutênio em cultura de células tubulares renais

4.5.1 Cultivo de células renais

As linhagens de células tubulares epiteliais renais, LLC-MK2 [Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Kidney Epithelial Cells], foram obtidas do Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDT) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. Foram cultivadas em meio de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, EUA), composto de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem confluência (BUTLER; DAWSON, 1992).

Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7,4. A garrafa foi incubada com 1mL de solução de tripsina-EDTA (0,05%/0,02%) por 5-10 min a 37°C para deslocamento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1mL de DMEM completo (adicionado de 10% de soro bovino fetal – SBF), e alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com meio DMEM completo.

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

Antes de cada experimento, as células foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24h em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 4000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensão em 1mL de meio DMEM completo. Para plaqueamento inicial dos experimentos, as células foram quantificadas, e foi ajustada a concentração para 1x10⁵.

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

Para quantificação, alíquotas foram removidas para contagem em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1×10⁵ células/mL em placas de 24 e 96 poços.

4.5.2 Indução de I/R *in vitro*

A lesão *in vitro* por I/R foi induzida por um método anteriormente descrito denominado método da câmara anaeróbica (GINO *et al.*, 2014). As células foram plaqueadas em uma concentração de 1 x 10⁵ 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 em câmara anaeróbica por 24 h. A reperfusão foi realizada, após o período na câmara, através da adição de um meio de cultura completo e retorno das células à atmosfera de 5% de CO₂.

Após 3h, as placas foram tratadas com FOR 811A e FOR 011A em várias concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µmol/L). Todos os ensaios foram realizados em paralelo nas células em condições normais de aerobiose a fim de detectar eventuais concentrações tóxicas da FOR 811A nas linhagens celulares. A recuperação da viabilidade celular foi medida pelo ensaio de redução do MTT.

4.5.3 Ensaios de Viabilidade Celular por Redução do MTT

O teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é amplamente usado na determinação da viabilidade de células em cultivo. É um sal de

tetrazólio de cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, deve ser adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados. Os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica e viabilidade celular (LIU et al., 1997; MOSMANN, 1983).

As placas submetidas ao processo de I/R e também as placas que foram submetidas somente ao teste de viabilidade celular, foram tratadas com diferentes concentrações de FOR 811 A e do FOR 011 A (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 $\mu\text{mol/L}$) e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 μL de sobrenadante removidos. 10 μL de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados, e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida, adicionados 90 μL de dodecil-sulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 h de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm.

4.5.4 Ensaio de Respiração Celular por Citometria de Fluxo

No intuito de investigar o potencial dos compostos FOR 811A e FOR 011A em reverter a lesão da injúria após I/R por desequilíbrio redox, foi avaliada a alteração no potencial transmembrânico mitocondrial.

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

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

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

A intensidade de fluorescência foi medida através de citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, São Paulo, SP) equipado com laser de argônio de 15 mW

resfriado a ar e operando em 488 nm. Parâmetros como complexidade (Detector lateral de dispersão da luz – SSC) e tamanho (Detector frontal de dispersão da luz – FSC) celular também foram avaliados.

4.5.5 Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) que 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.

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) (YANG *et al.*, 2012).

As células em cultura que foram submetidas à lesão por I/R pelo método da câmara anaeróbica foram tratadas com FOR 811 A e FOR 011 A, 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 30 min para, em seguida, foi processado em citômetro de fluxo.

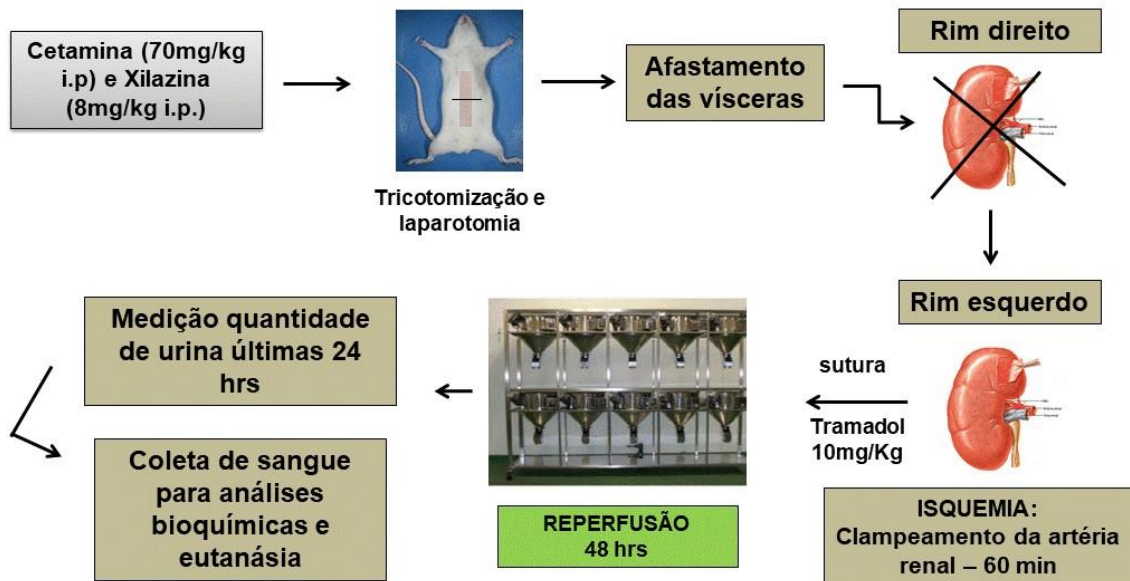
4.6 Lesão Renal Aguda por Isquemia seguida de Reperfusão (I/R)

Os animais (n=7) foram previamente anestesiados com cetamina 80 mg/Kg e xilazina 8 mg/Kg. Uma laparotomia através de uma incisão na linha média foi realizada. O rim direito foi visualizado e removido, e a isquemia foi induzida no rim esquerdo pelo clampeamento não-traumático, causando oclusão unilateral da artéria renal, durante 60 min, seguido de 48 h de reperfusão tal como previamente descrito (DA COSTA *et al.*, 2015;

NAJAFI *et al.*, 2014). Os animais foram mantidos aquecidos a uma temperatura constante de aproximadamente 37°C durante as cirurgias e, posteriormente, foi realizada uma sutura no local da incisão com fio de polipropileno 4.0. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de forma similar em grupos falso-operado, denominado SHAM, exceto pela nefrectomia direita e peloclampeamento da artéria renal. O tempo escolhido para I/R foi o tempo capaz de causar disfunção renal significativa e lesão do rim do animal, além de produzir uma característica fisiopatológica reconhecida de insuficiência renal aguda (DA COSTA *et al.*, 2015). Os animais receberam tramadol (10 mg/kg) no primeiro e segundo dias após a cirurgia e foram mantidos em gaiolas metabólicas durante 48 horas após a reperfusão e foram realizadas medições de quantidade de água consumida durante 24 e 48 horas, como também, coletou-se e mediu-se a quantidade de urina nas últimas 24 horas para cálculo do *clearance* de creatinina.

No final deste período, os animais foram novamente anestesiados para obter amostras de sangue coletadas usando heparina a 10% e acondicionadas a -20°C, a fim de se realizar os testes bioquímicos. Adicionalmente, os rins esquerdos dos animais foram recolhidos e acondicionados a -80°C para avaliações adicionais, e os animais foram eutanasiados. Como *in vitro* somente o composto FOR 811 A mostrou um resultado satisfatório, os experimentos *in vivo* de I/R foram realizados apenas com essa substância. Segue esquema representativo na Figura 10.

Figura 10 – Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos



Fonte: elaborado pela autora.

Os animais experimentais (n=7, cada) foram tratados de acordo com os grupos discriminados abaixo. A dose foi determinada após a realização de um teste piloto com as doses de 3mg/Kg, 10mg/Kg e 30 mg/Kg. Apenas a dose de 10 mg/Kg mostrou efeito protetor, sendo, portanto, escolhida para seguir os experimentos.

- Grupo SHAM: os animais foram sujeitos à laparotomia e tiveram os rins apenas manipulados, sem isquemia e nefrectomia;
- Grupo SHAM + FOR 811 A (SHAM811A): os animais foram sujeitos à laparotomia e tiveram os rins apenas manipulados, sem isquemia e nefrectomia. Foram submetidos a um pré-tratamento com o FOR 811 A (10mg/Kg, i.p.) diluído em água destilada, 30 minutos antes da manipulação dos rins. Os animais receberam a mesma dose do FOR 811 A 24 e 48 horas após a primeira administração.
- Grupo Isquemia/Reperfusion (I/R): os animais foram sujeitos à laparotomia com isquemia e nefrectomia;
- Grupos I/R + FOR 811 A (I/R811A): os animais foram sujeitos à laparotomia com isquemia e nefrectomia e tratados com o FOR 811 A (10mg/Kg, i.p.) diluído em água destilada, 30 minutos antes da manipulação dos rins. Os

animais receberam a mesma dose do FOR 811 A 24 e 48 horas após a primeira administração.

4.6.1 Avaliação Bioquímica dos Animais

Com o usodas amostras coletadas de urina e sangue, foram avaliados parâmetros bioquímicos de função renal, creatinina plasmática e urinária e níveis plasmáticos de ureia. Além disso, foram aferidos os níveis plasmáticos e urinários dos íons sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cloreto (Cl⁻), utilizando um analisador de eletrólitos 9180 (Roche®, Brasil).

4.6.2 Procedimentos realizados nas amostras de sangue

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rotações por minuto (rpm). Retirou-se, com o auxílio de uma pipeta calibrada, o plasma das amostras que foi armazenado em freezer a -20°C.

4.6.3 Dosagem de creatinina plasmática e urinária

Para a determinação de creatinina no plasma e na urina, foi utilizado o método de Jaffé modificado. A creatinina reage com o picrato alcalino (NaOH + ácido pícrico) formando um complexo de cor vermelha, a intensidade da cor formada é proporcional à concentração de creatinina na amostra. Para a realização do teste, utilizou-se o kit creatinina K (Ref.:96) da Labtest®, Brasil.

Para a dosagem de creatinina plasmática, adicionou-se 0,1mL de padrão ou amostra a 1 mL de picrato alcalino e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 520nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Para a dosagem de creatinina urinária, a urina foi diluída a uma proporção de 1:25. Em seguida, realizaram-se os procedimentos descritos anteriormente.

4.6.4 Cálculo da taxa de filtração glomerular

A fim de verificar a função renal dos animais, calculou-se a taxa de filtração glomerular, através do clearance de creatinina, usando-se a seguinte fórmula: $Cl_{creat} = \frac{CU \times V}{Cp \times t}$.

Na qual:

CU = creatinina urinária, em mg/dL;

V = volume urinário, em mL;

Cp = creatinina plasmática, em mg/dL;

t = tempo, em min.

Os valores foram expressos em mL/min.

4.6.5 Determinação de ureia plasmática

Para determinar a concentração de ureia plasmática nas amostras em estudo, usou-se o kit Ureia CE (Ref. 27) da Labtest®, Brasil. Utilizou-se o método colorimétrico do azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra. Seguiu-se o seguinte procedimento:

Adicionou-se 0,01 mL do padrão ou amostras a 1 mL do reagente de uso Urease Tamponada, misturou-se e incubou-se por 5 min a 37°C. Adicionou-se 1 mL do Oxidante de uso a cada tubo, misturou-se e incubou-se por 5 min a 37°C. A absorbância foi determinada em 600 nm, e os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6.6 Determinação da fração de excreção de sódio e potássio

A fim de determinar a fração de excreção de sódio e potássio, utilizou-se um analisador de eletrólitos 9180 (Roche®, Brasil). Posteriormente, calcularam-se as frações de excreção de sódio e potássio, a partir da seguinte fórmula:

$FENa^+ \text{ ou } K^+ = \frac{100 \times Na^+ \text{ ou } CL^- U}{Na^+ \text{ ou } CL^- P \times CrP}$, na qual:

$Na^+ \text{ ou } CL^- P \times CrU$

$Na^+ \text{ ou } CL^- U$ = sódio ou potássio urinário

CrP = creatinina plasmática

$Na^+ \text{ ou } CL^- P$ = sódio ou potássio plasmático

CrU = creatinina urinária

Os resultados foram expressos em %.

4.6.7 Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

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

Sob condições oxidantes, duas moléculas de GSH doam um elétron para cada GSSG, que pode ser reduzido novamente para GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR). 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).

4.6.8 Determinação da produção de Nitrito/nitrato (NO_x)

A fim de avaliar os efeitos na produção de NO do tratamento realizado nos animais submetidos a I/R renal, foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos tecidos renais coletados. Cada tecido foi macerado em uma proporção de 50 mg em 500 μ L de cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. O homogenato foi centrifugado em tubos a uma rotação de 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido para análise de NO_x. A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico, por meio da determinação total de nitrito/nitrato (NO₂⁻/NO₃⁻) em tecido renal. A dosagem de NO₂⁻ foi feita pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Para o experimento, 100 μ L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%/ ácido fosfórico a 5%/ água destilada na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 μ L do sobrenadante do homogenato tecidual e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em condições ácidas, o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida, esse sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorbância em 540nm.

4.6.9 *Imunohistoquímica para TNF- α e iNOS*

A imunohistoquímica foi realizada com a utilização do método da estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Os cortes dos tecidos foram desparafinizados (ver item 4.4.10), hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1M (pH 6), sob aquecimento em forno de micro-ondas por 18 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados durante a noite (4°C) com anticorpos primários de ratos (TNF- α e iNOS) diluídos 1:2000 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA), de acordo com o manual de cada fabricante. Após a lavagem no dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:2000 em PBS/BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com complexo estreptavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, foi realizada a coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-peróxido (DAB). Por fim, seguiu-se com a desidratação das amostras e montagem das lâminas para análise. As lâminas foram observadas em microscópio Nikon Eclipse Nis. Software Nis 4.0. A mensuração semi-quantitativa da imunomarcção foi realizada por densidade ótica relativa com o uso do programa Image J (NIH, EUA).

4.7 **Análise Estatística**

Para análise de dados, foi utilizado o software estatístico GraphPad® Prism v7.0. Nos ensaios de perfusão renal, utilizou-se teste t de Student seguido por análise de variância fator duplo (Two-Way ANOVA) que, por sua vez, foi seguida pelo pós-teste de Tukey. Para análise das demais metodologias, utilizou-se análise de variância One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os resultados foram apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.), Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para a análise.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos dos complexos de rutênio na perfusão de rim isolado de ratos

Os resultados mostraram não só aumento da pressão de perfusão (PP) nos grupos FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ nos tempos 60, 90 e 120 minutos em comparação ao controle externo e o grupo NPS (controle positivo), como também, aumento da PP nos tempos 90 e 120 min em relação ao controle interno (Tabela 4, Figura 11).

A Resistência vascular renal (RVR) mostrou aumento significativo nos tempos 60, 90 e 120 min, no grupo FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$, quando comparado ao controle externo e ao grupo NPS, e no grupo FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$, quando comparado ao controle externo e ao grupo NPS nos tempos 90 e 120 min (Tabela 5, Figura 12).

O fluxo urinário (FU) no tempo 120 min, aumentou significativamente nos grupos FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ em relação ao grupo NPS e em relação ao controle interno (Tabela 6, Figura 13).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) não mostrou alterações significativas em nenhum grupo estudado (Tabela 7, Figura 14).

O percentual de transporte tubular de sódio ($\%T\text{Na}^+$) no grupo FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$ apresentou diminuição aos 120 min quando comparado ao controle interno. O grupo FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ demonstrou diminuição significativa em relação ao grupo NPS (60 e 90 min) e em relação ao controle interno (60, 90 e 120 min). Já o grupo FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ apresentou diminuição do $T\text{Na}^+$ em relação ao controle interno aos 60 min e, aos 60 e 90 min, em relação ao grupo NPS (Tabela 8, Figura 15).

O percentual de transporte proximal de sódio ($\%pT\text{Na}^+$) no grupo FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$ mostrou diminuição aos 90 e 120 min em comparação ao controle interno. No grupo FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$, o $pT\text{Na}^+$ diminuiu aos 60 min quando comparado ao grupo NPS e aos 60, 90 e 120 min quando comparado ao controle interno. O grupo FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ mostrou diminuição significativa aos 60 min na comparação com o controle interno e grupo NPS (Tabela 9, Figura 16).

No que se refere ao percentual de transporte tubular de potássio ($\%TK^+$), o grupo FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$ mostrou diminuição significativa nos tempos 60, 90, 120 min em relação aos controles externo e interno e NPS. Já o grupo FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ mostrou diminuição significativa em relação ao controle interno aos 60 e 90 min (Tabela 10, Figura 17).

Em relação ao percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺), o grupo FOR 811A 0,3 µmol/L mostrou diminuição significativa nos tempos 60, 90, 120 min em relação aos controles interno e externo, e nos tempos 90 e 120, em relação ao grupo NPS. Já o grupo FOR 811A 1,0 µmol/L mostrou diminuição significativa em relação ao controle interno aos 60 e 90 min (Tabela 11, Figura 18).

A avaliação do percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) mostrou diminuição significativa no grupo FOR 811A 0,3 µmol/L aos 90 e 120 min quando comparado ao controle interno e aos 90 min quando comparado ao grupo NPS. No grupo FOR 811A 1,0 µmol/L, também houve diminuição significativa do %TCl⁻ aos 60, 90 e 120 quando comparado ao controle interno e aos 60 e 90 min quando comparado ao grupo NPS. O grupo FOR 011A 1,0 µmol/L teve diminuição significativa do TCl⁻ nos tempos 60 e 120 em comparação ao controle interno e 60 e 90 em relação ao grupo NPS (Tabela 12, Figura 19).

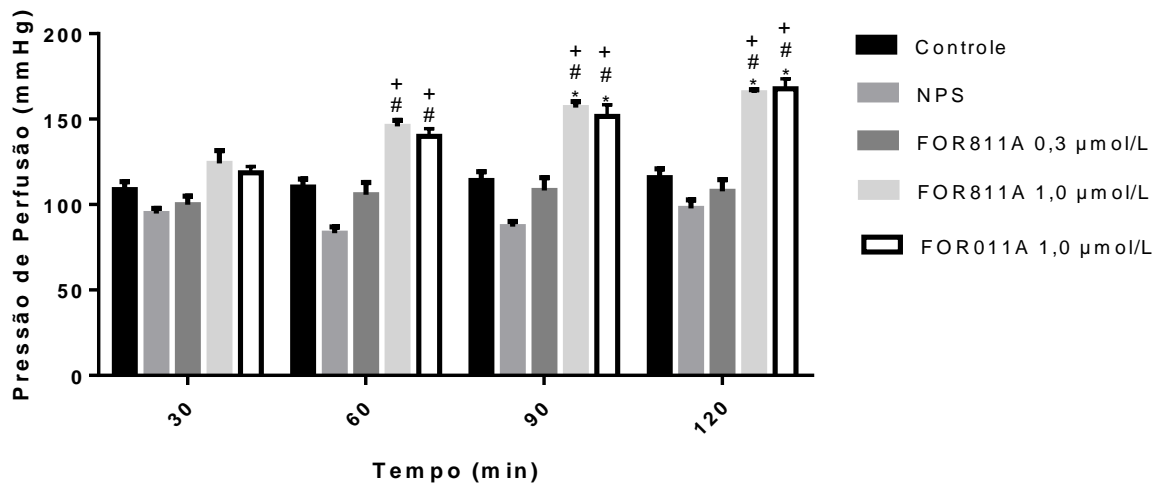
A avaliação do percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) mostrou diminuição significativa no grupo FOR 811A 0,3 µmol/L aos 60, 90 e 120 quando comparado ao controle interno. No grupo FOR 811A 1,0 µmol/L, também houve diminuição significativa do %pTCl⁻ aos 60, 90 e 120 quando comparado ao controle interno e aos 60 min também demonstrou diminuição significativa em comparação com o controle externo e grupo NPS. O grupo FOR 011A 1,0 µmol/L teve diminuição significativa do %pTCl⁻ nos tempos 60 e 120 em comparação ao controle interno e aos 60 min em relação ao grupo NPS (Tabela 13, Figura 20).

Tabela 4 – Pressão de perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$	FOR811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	FOR011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$
30	108,8 \pm 4,65	94,81 \pm 2,88	99,85 \pm 5,13	124,0 \pm 7,50	118,5 \pm 3,80
60	110,20 \pm 4,75	83,32 \pm 3,60	105,80 \pm 7,11	145,7 \pm 3,60 ^{#+}	139,9 \pm 4,50 ^{#+}
90	114,10 \pm 5,10	87,04 \pm 3,05	108,20 \pm 7,51	156,7 \pm 3,60 ^{*#+}	151,5 \pm 6,80 ^{*#+}
120	115,80 \pm 5,06	97,70 \pm 4,98	107,7 \pm 6,84	165,4 \pm 1,80 ^{*#+}	167,8 \pm 5,80 ^{*#+}

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), # P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 11 – Pressão de perfusão (PP) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$



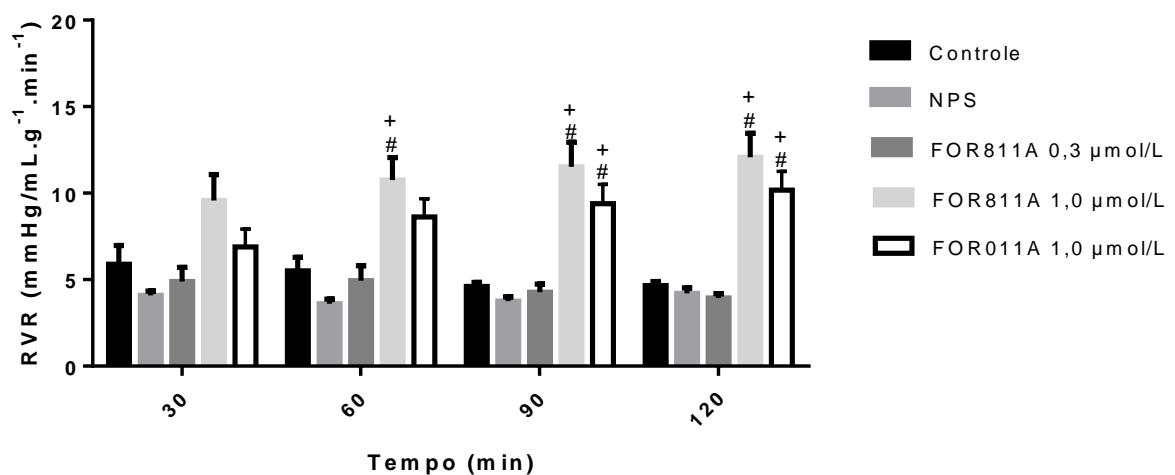
*P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 5 –Resistência Vascular Renal (RVR) em mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	5,88±1,08	4,09±0,26	4,88±0,82	9,58±1,49	6,89±1,03
60	5,50±0,79	3,60±0,27	4,95±0,86	10,76±1,30 ^{##}	8,63±1,04
90	4,60±0,24	3,76±0,26	4,28±0,47	11,52±1,43 ^{##}	9,39±1,12 ^{##}
120	4,66±0,23	4,21±0,31	3,94±0,25	12,07±1,38 ^{##}	10,18±1,08 ^{##}

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. # P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 12–Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0µmol/L



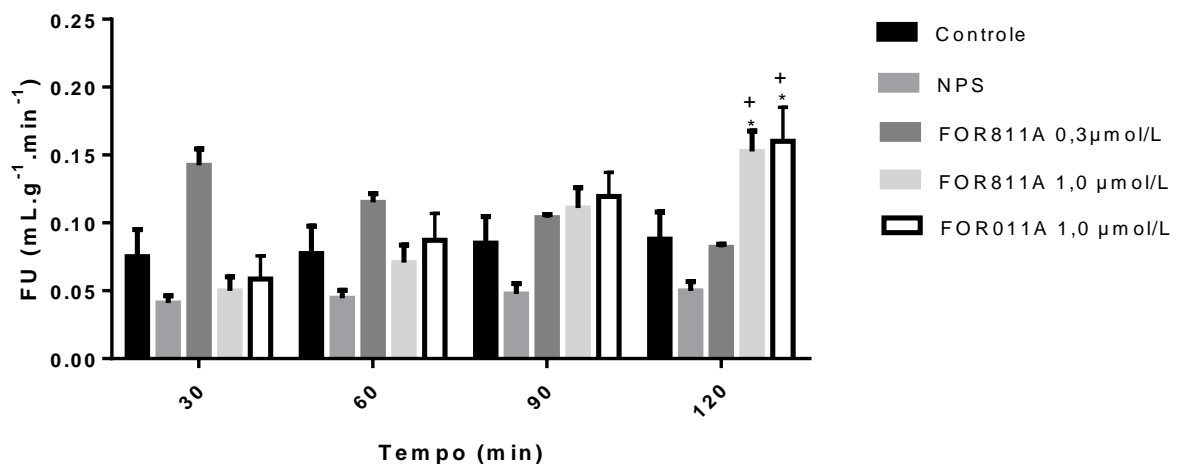
#P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 6 – Fluxo urinário (FU) em (mL.g⁻¹.min⁻¹) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	0,07±0,020	0,04±0,005	0,14±0,012	0,05±0,010	0,06±0,017
60	0,07±0,020	0,04±0,005	0,11±0,006	0,07±0,012	0,08±0,020
90	0,08±0,020	0,05±0,007	0,10±0,002	0,11±0,015	0,12±0,017
120	0,08±0,020	0,05±0,007	0,08±0,002	0,15±0,015 ⁺ *	0,16±0,024 ⁺ *

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13– Fluxo urinário (FU) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0µmol/L



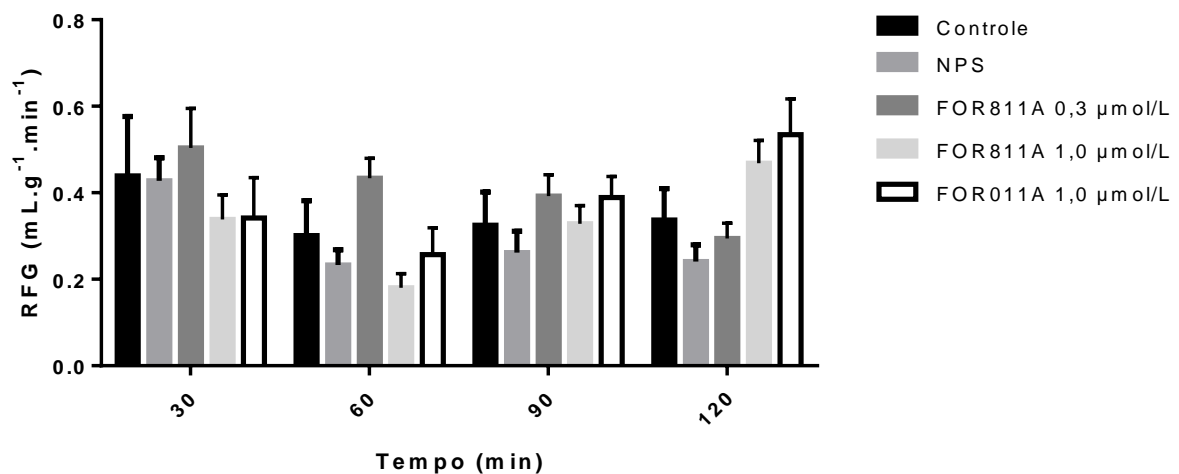
* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo(NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 7 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$	FOR811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	FOR011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$
30	0,44±0,14	0,43±0,05	0,50±0,09	0,34±0,05	0,34±0,09
60	0,30±0,08	0,23±0,03	0,43±0,05	0,18±0,03	0,26±0,06
90	0,32±0,07	0,26±0,05	0,39±0,05	0,32±0,04	0,39±0,05
120	0,33±0,07	0,24±0,04	0,29±0,03	0,47±0,05	0,53±0,08

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. * $P < 0,05$ para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), + $P < 0,05$ para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$



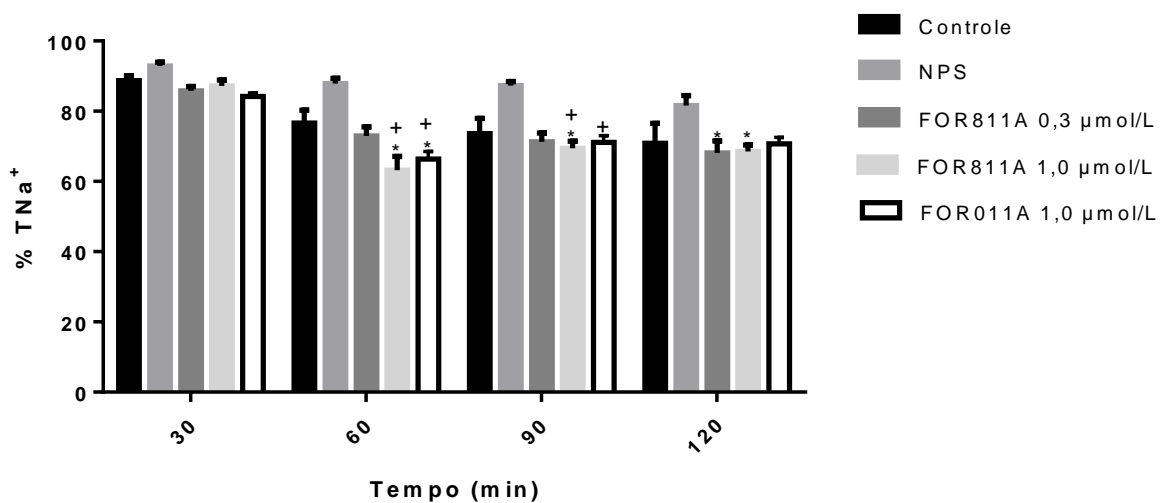
Os dados analisados não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 8 – Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	88,74±1,36	92,85±1,13	85,83±1,22	87,21±1,67	84,17±1,03
60	76,62±3,69	87,88±1,49	72,94±2,64	63,23±3,88* ⁺	66,37±2,14* ⁺
90	73,60±4,39	87,31±1,15	71,29±2,50	69,47±1,99* ⁺	71,12±1,90 ⁺
120	70,85±5,73	81,60±2,86	68,11±3,39*	68,54±1,84*	70,70±1,86

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 15– Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0µmol/L



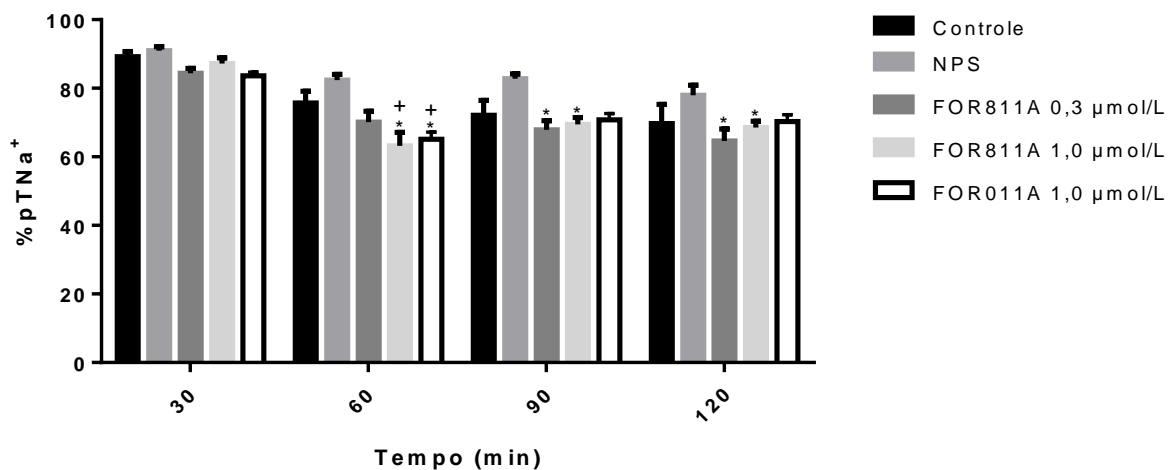
* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 9 – Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	89,20±1,54	90,98±1,11	84,37±1,22	87,21±1,66	83,66±1,02
60	75,70±3,43	82,37±1,68	70,16±3,12	63,23±3,87*+	65,12±2,07*+
90	72,16±4,32	82,79±1,40	67,89±2,65*	69,47±1,99*	70,76±1,89
120	69,73±5,60	77,99±2,92	64,63±3,47*	68,54±1,83*	70,31±1,97

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 16 – Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0 µmol/L



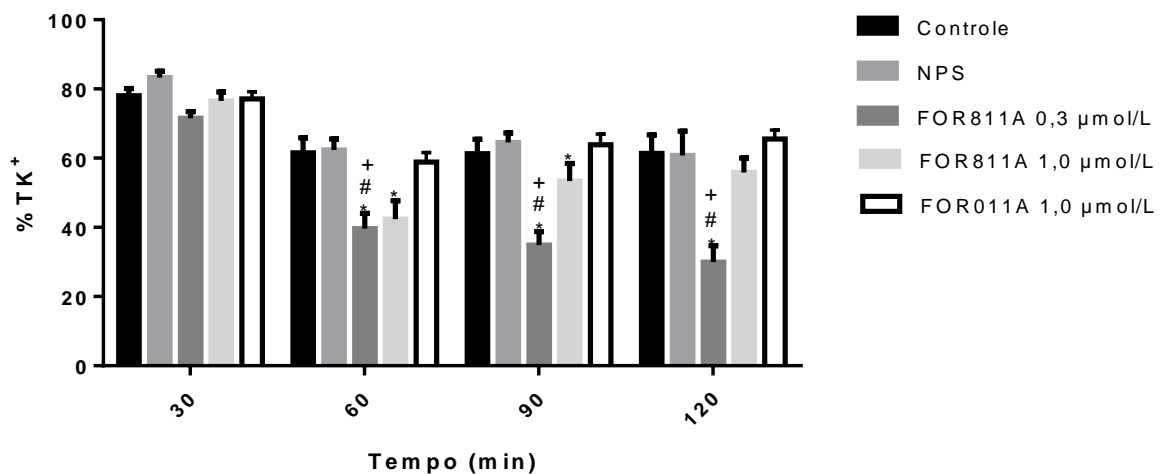
* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 10 – Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	78,01±2,10	83,26±1,83	71,51±1,92	76,52±2,60	77,14±2,04
60	61,58±4,27	62,38±3,17	39,66±4,35 ^{*#+}	42,39±5,32 [*]	58,89±2,70
90	61,25±4,18	64,58±2,69	34,89±3,88 ^{*#+}	53,37±5,13 [*]	63,85±3,07
120	61,35±5,34	60,76±6,99	29,96±4,71 ^{*#+}	55,89±4,17	65,56±2,57

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 17 – Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0 µmol/L



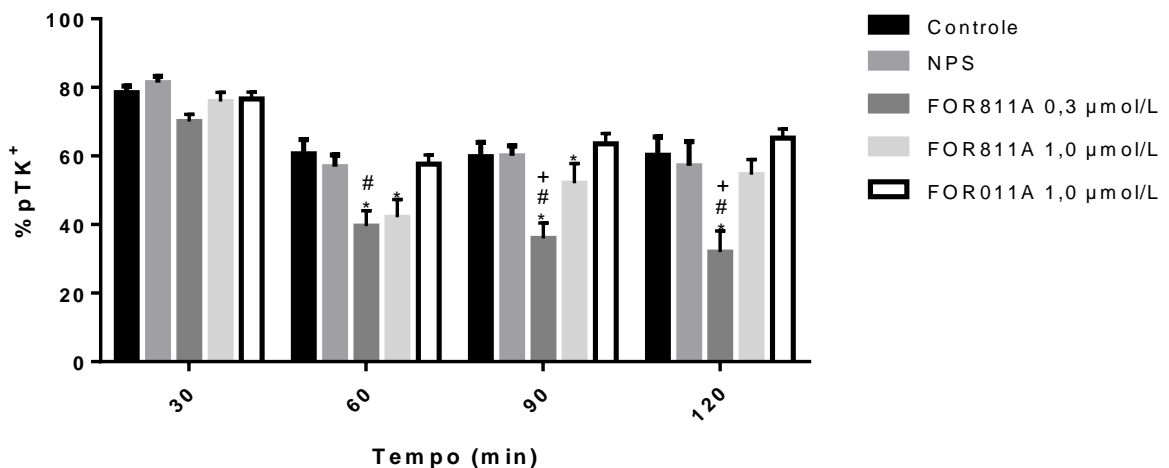
* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 11 – Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	78,47±1,93	81,40±1,84	70,04±2,10	75,88±2,64	76,63±1,97
60	60,65±4,10	56,87±3,43	39,51±4,53*#	39,43±5,42*	57,64±2,69
90	59,80±4,19	60,06±2,94	35,97±4,46*##	52,68±5,72*	63,50±3,06
120	60,23±5,32	57,15±7,06	31,93±6,23*##	54,54±4,43	65,17±2,70

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), # P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 18 – Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0 µmol/L



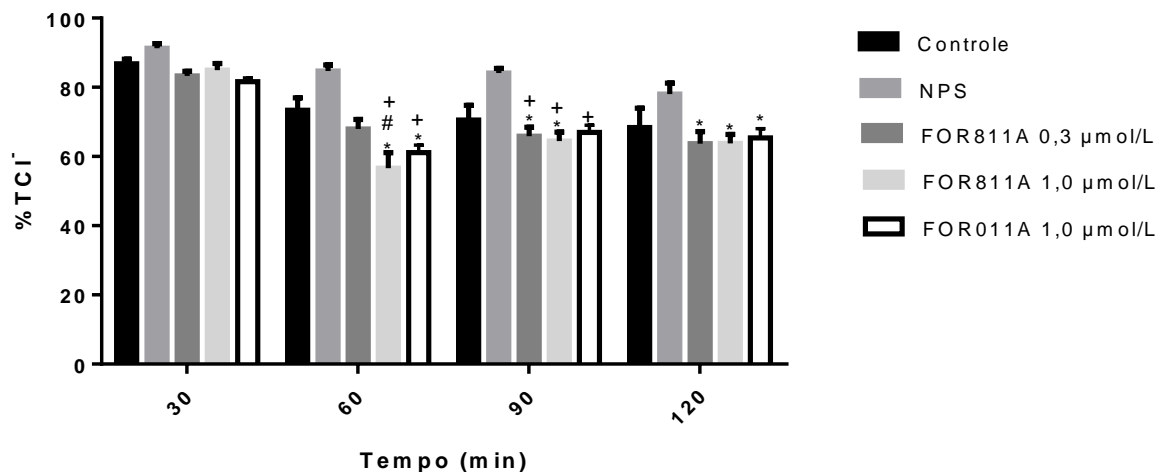
*P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), # P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 12 – Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	86,82±1,33	91,30±1,29	83,31±1,33	84,98±1,92	81,60±1,14
60	73,34±3,59	84,67±1,76	67,99±2,72	56,59±4,56 ^{*##}	61,15±2,16 ⁺
90	70,56±4,25	84,10±1,35	65,86±2,60 ^{*+}	64,45±2,59 ^{*+}	66,96±2,05 ⁺
120	68,40±5,59	78,00±3,21	63,71±3,50 [*]	63,79±2,61 [*]	65,35±2,73 [*]

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 19 – Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0 µmol/L



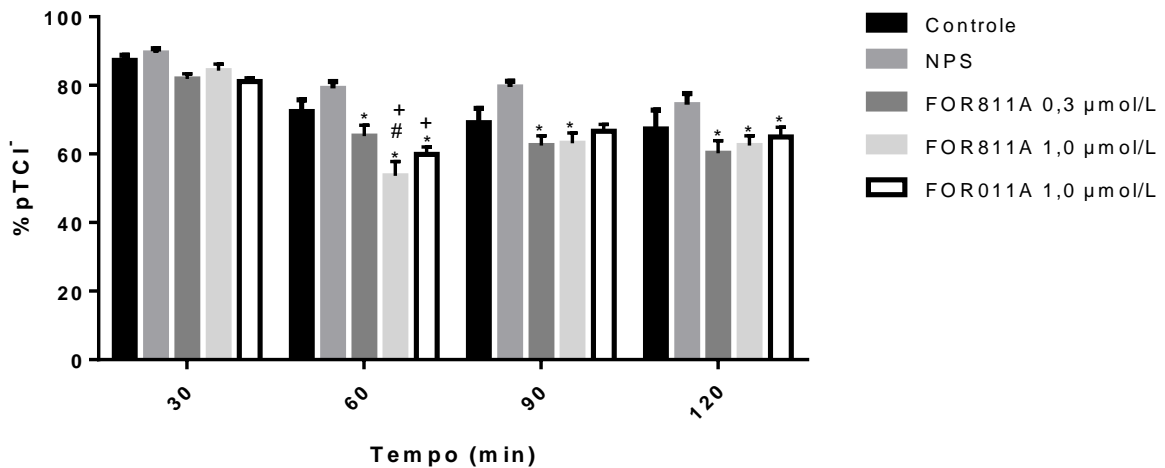
* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Tabela 13 – Percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 µmol/L, FOR 811A 1,0 µmol/L e FOR 011A 1,0 µmol/L

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 µmol/L	FOR811A 1,0 µmol/L	FOR011A 1,0 µmol/L
30	87,28±1,51	89,44±1,28	81,85±1,48	84,33±1,88	81,09±1,16
60	72,41±3,34	79,16±1,96	65,22±3,19*	53,63±4,20*##	59,90±2,14*+
90	69,11±4,19	79,58±1,60	62,46±2,81*	63,16±2,93*	66,61±2,03
120	67,28±5,47	74,39±3,27	60,22±3,63*	62,44±2,83*	64,96±2,84*

Os dados foram expressos em média ± E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 20– Percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 µmol/L, FOR811A 1,0 µmol/L e FOR011A 1,0 µmol/L



* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

Quadro 2 –Resumo dos resultados obtidos em perfusão de rim isolado de rato nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$

	PP	RVR	FU	RFG	%TNa ⁺	%pTNa ⁺	%TK ⁺	%TpK ⁺	%TCl ⁻	%TpCl ⁻
<i>Controle</i>										
<i>NPS</i>										
<i>FOR 811A</i> <i>0,3$\mu\text{mol/L}$</i>					↓120*	↓90* 120*	↓60* ^{#+} 90* ^{#+} 20* ^{#+}	↓60* ^{#+} 90* ^{#+} 120* ^{#+}	↓90* ⁺ 120*	↓60* 90* 120*
<i>FOR 811A</i> <i>1,0$\mu\text{mol/L}$</i>	↑60* ^{#+} 0* ^{#+} 120* 0* ^{#+}	↑60* ^{#+} 90* ^{#+} 120* 20* ^{#+}	↑120* ⁺		↓60* ⁺ 90* ⁺ 120*	↓60* ⁺ 90* ⁺ 120*	↓60* 90*	↓60* 90*	↓60* ^{#+} 90* ⁺ 120*	↓60* ^{#+} 0* 120*
<i>FOR 011A</i> <i>1,0$\mu\text{mol/L}$</i>	↑60* ^{#+} 90* ^{#+} 120* 20* ^{#+}	↑90* ^{#+} 120* ^{#+}	↑120* ⁺		↓60* ⁺ 90* ⁺ +	↓60* +			↓60* ⁺ 90* ⁺ 120* 0*	↓60* ⁺ 120*

* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: Elaborada autora.

5.1.1 Quantificação de GMPc por ELISA

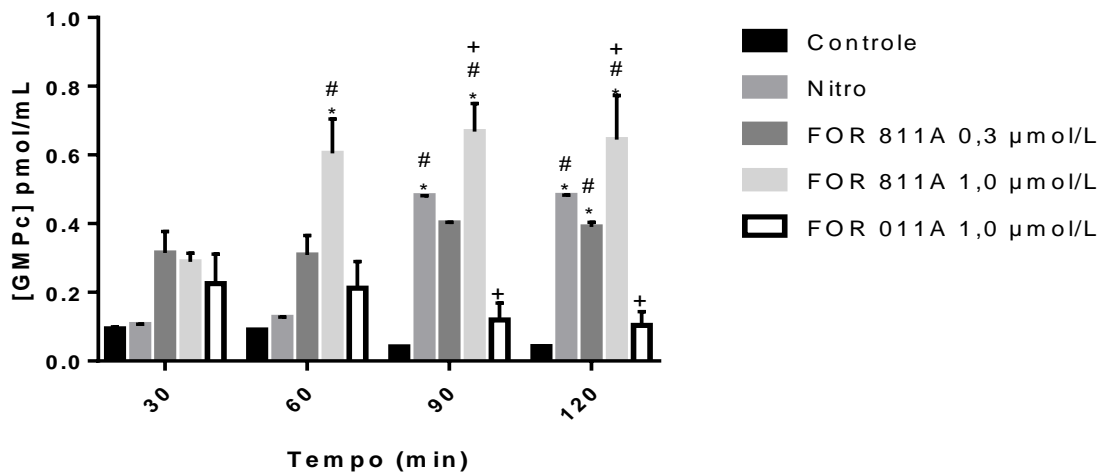
Para a quantificação de GMPc (pmol/mL), foi realizado teste de ELISA nas amostras de urina da perfusão de rim isolado. Os resultados demonstraram o aumento significativo de GMPc nos animais do grupo NPS em relação aos controles externo e interno aos 90 e 120 minutos, como também, aumento de GMPc no grupo FOR 811 A 0,3 $\mu\text{mol/L}$ aos 120 min em relação aos controles interno e externo, e no grupo FOR 811 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ em relação aos controles externo e interno aos 60, 90 e 120 min e em relação ao grupo NPS aos 90 e 120 min. O grupo FOR 011 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ mostrou diminuição significativa da concentração de GMPc em relação ao grupo NPS aos 90 e 120 min. Ver Tabela 14 e Figura 21.

Tabela 14 – Dosagem de GMPc (pmol/mL) nos grupos controle, NPS, FOR 811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR 811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$

Tempo	Controle	NPS	FOR811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$	FOR811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$	FOR011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$
30	0,0936 \pm 0,0088	0,1062 \pm 0,0010	0,3144 \pm 0,0887	0,2889 \pm 0,0357	0,2250 \pm 0,1222
60	0,0904 \pm 0,0005	0,1273 \pm 0,0010	0,3088 \pm 0,0800	0,6047 \pm 0,1414 [#]	0,2118 \pm 0,1097
90	0,0411 \pm 0,0002	0,4809 \pm 0,0010 ^{*#}	0,4019 \pm 0,0029	0,6679 \pm 0,1153 ^{*##}	0,1192 \pm 0,0700 ⁺
120	0,0421 \pm 0,0008	0,4824 \pm 0,0010 ^{*#}	0,3902 \pm 0,0186 ^{*#}	0,6446 \pm 0,1810 ^{*##}	0,1034 \pm 0,0567 ⁺

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste T de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. *P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), # P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 – Dosagem de GMPc (pmol/mL) em amostras de urina da perfusão de rim isolado de rato nos grupos controle, NPS, FOR811A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, FOR811A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR011A 1,0 $\mu\text{mol/L}$



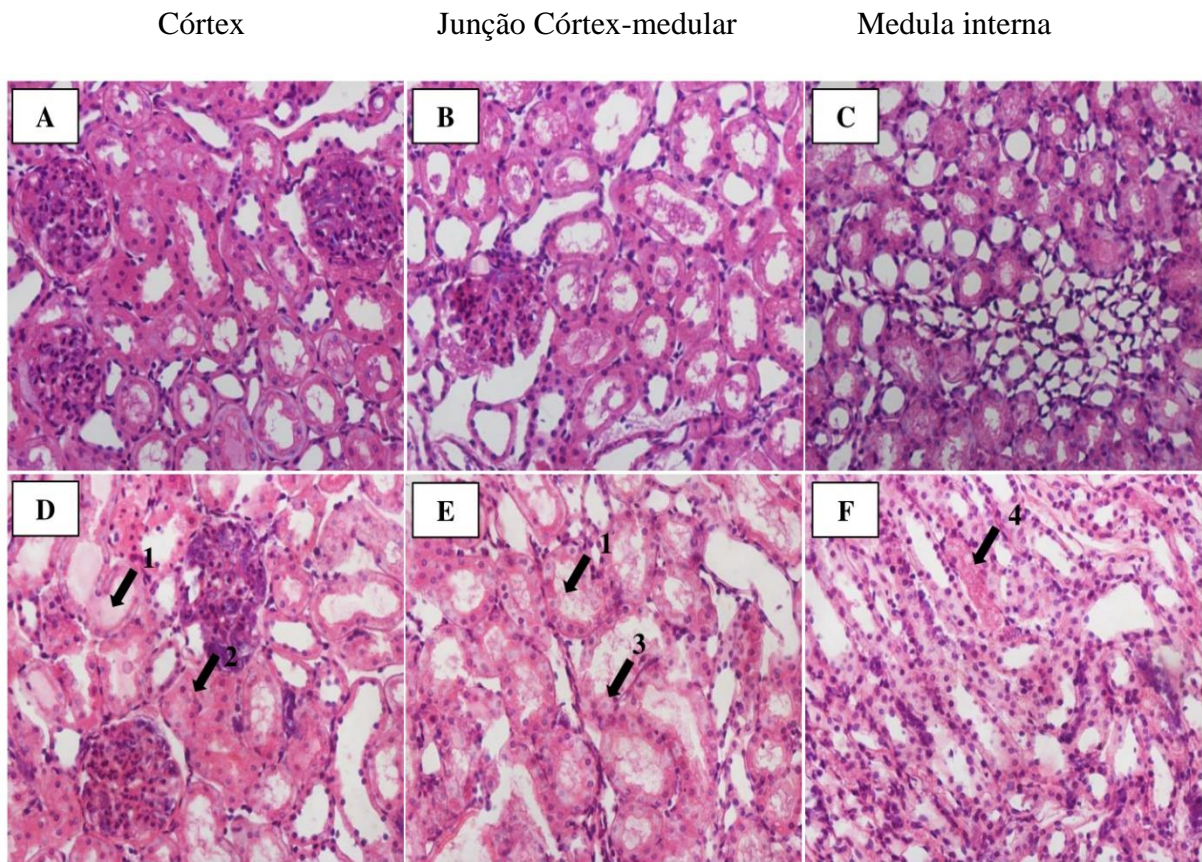
* P<0,05 para comparação entre os tempos 60, 90, 120 e o controle interno do grupo (tempo 30), #P<0,05 para comparação em relação ao controle externo na mesma faixa de tempo, + P<0,05 para comparação em relação ao controle positivo (NPS) na mesma faixa de tempo.

5.1.2 Análise Histológica dos Rins Perfundidos com FOR 811 A e FOR 011 A

A Figura 22 corresponde às fotomicrografias do grupo controle externo com rins direitos perfundidos apenas com solução de Krebs-Hanseleit e do grupo controle positivo com rins perfundidos com NPS 1,0 $\mu\text{mol/L}$. O grupo controle interno não apresentou alterações na arquitetura renal. Já o grupo controle positivo com NPS 1,0 $\mu\text{mol/L}$ apresentou alterações como deposição de material protéico intratubular, tumefação tubular, degeneração hidrópica vacuolar e tubular.

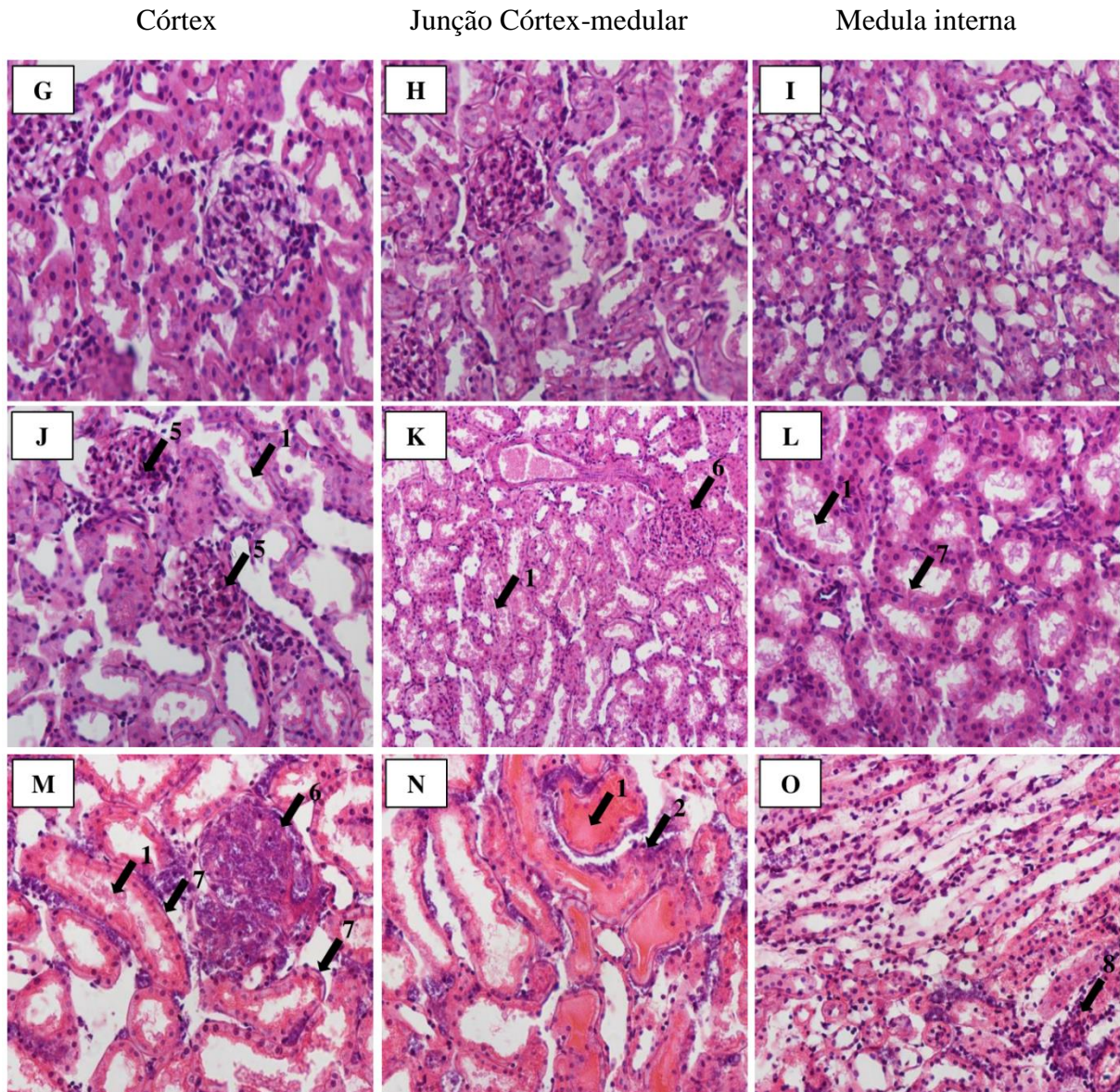
A Figura 23 mostra as fotomicrografias da análise histológica de rins direitos dos grupos perfundidos com os compostos em estudo. O grupo FOR 811 A 0,3 $\mu\text{mol/L}$ não apresentou alterações na arquitetura renal. Já o grupo que recebeu FOR 811 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ mostrou alterações na arquitetura renal como deposição de material protéico intratubular, atrofia glomerular, tumefação glomerular e degeneração tubular. O grupo FOR 011 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ também mostrou alterações na arquitetura renal, como presença intratubular de material protéico, tumefação glomerular, degeneração tubular, tumefação tubular e infiltrado inflamatório discreto.

Figura 22–Fotomicrografias representativas de rins de ratos, demonstrando o córtex, junção córtex-medular e medula interna. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0



Grupo controle (A-C) de rins perfundidos apenas com solução de Krebs-Hanseleit modificada (RD), não apresentando alterações na arquitetura renal. Grupo NPS 1,0 $\mu\text{mol/L}$ (D-F) mostrando córtex com deposição de material protéico intratubular (1) e tumefação tubular (2); a região córtex-medular com deposição de material protéico intratubular (1) e degeneração hidrópica vacuolar (3); e medula interna com deposição de material protéico intratubular (1) e degeneração tubular (4). As setas apontam as alterações. Fonte: Laboratório de Morfologia Experimental Comparada (MEC) - UECE.

Figura 23–Fotomicrografias representativas de rins de ratos, demonstrando o córtex, junção córtex-medular e medula interna. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0



O grupo FOR 811 A 0,3 $\mu\text{mol/L}$ (G-I) não apresentou alterações na arquitetura renal; no grupo FOR 811 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ (J-L), o córtex apresentou deposição de material protéico intratubular(1) e atrofia glomerular (5); na região córtex-medular observou-se deposição de material protéico intratubular (1) e tumefação glomerular (6); a medula interna mostrou deposição de material protéico intratubular (1) e degeneração tubular (7); no grupo FOR 011 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ (M-O) o córtex apresentou deposição de material protéico intratubular (1); tumefação glomerular (6) e degeneração tubular (7); a região córtex-medular apresentou deposição de material protéico intratubular (1) e tumefação tubular (2); na medula interna encontrou-se infiltrado inflamatório discreto (8). As setas apontam as alterações. Fonte: MEC – UECE.

5.2 Cultura de células e viabilidade celular

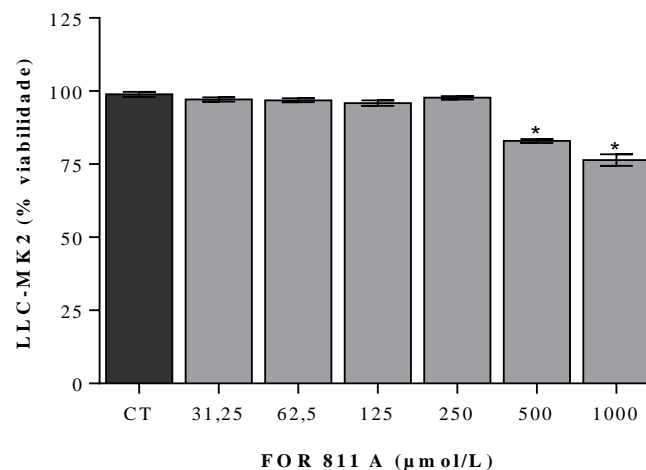
Com a finalidade de mensurar o percentual de células viáveis, realizou-se o teste de redução do MTT com as substâncias FOR 811 A e FOR 011 A (Tabela 15, Figuras 23 e 24).

Tabela 15 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR 811 A

%Viabilidade das células LLC-MK2						
Controle	98,88±0,89					
	31,25µmol/L	62,50µmol/L	125 µmol/L	250 µmol/L	500 µmol/L	1000µmol/L
FOR 811 A	97,12±0,76	96,84±0,68	95,87±0,94	97,71±0,58	82,96±0,67*	76,42±1,96*
FOR 011 A	98,37±0,79	97,68±0,69	96,43±1,47	90,45±0,73*	63,58±0,56*	55,43±1,60*

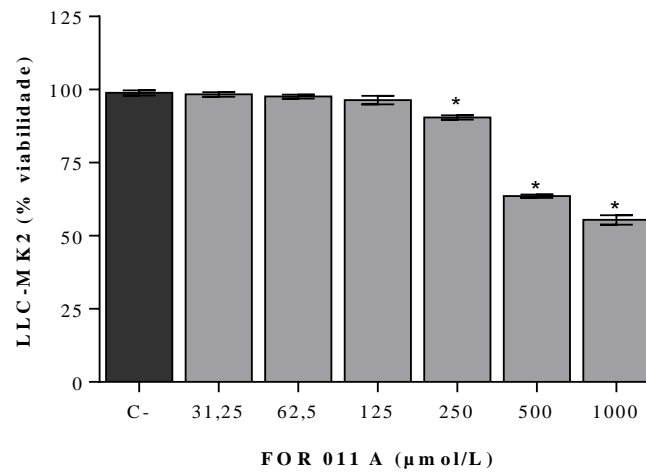
Os dados foram expressos como percentual de viabilidade ± EPM. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *(p<0,05) vs. C-, #(p<0,05) vs. I/R. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24– Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR 811 A



Os experimentos foram realizados com n=7. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade ± EPM. C-: grupo controle, FOR 811 A: grupo tratado com o composto FOR 811 A (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 µmol/L). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *(p<0,05) vs. C-.

Figura 25– Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR 011 A



Os experimentos foram realizados com n=7. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. C-: grupo controle, FOR 011 A: grupo tratado com o composto FOR 011 A (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *(p<0,05) vs. C-

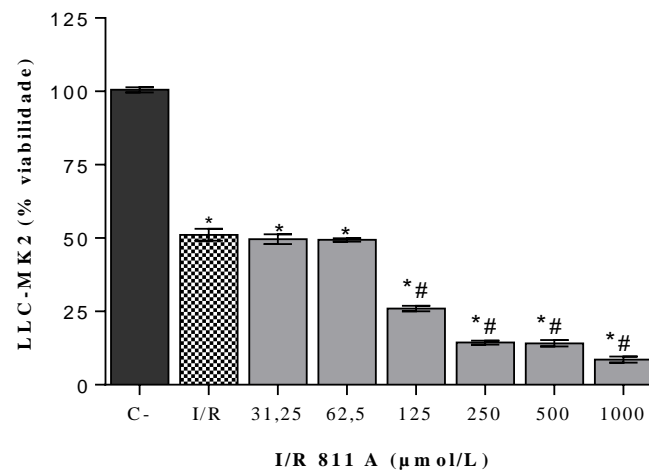
Com o objetivo de avaliar um possível efeito protetor do FOR 811 A E FOR 011 A, as células submetidas a processo de anaerobiose foram tratadas com as substâncias em estudo e calculou-se o percentual de viabilidade (Tabela 16, Figuras 25 e 26).

Tabela 16 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro*

%Viabilidade das células LLC-MK2						
Controle	100,5 \pm 0,92					
I/R	48,99 \pm 1,66*					
	31,25 $\mu\text{mol/L}$	62,50 $\mu\text{mol/L}$	125 $\mu\text{mol/L}$	250 $\mu\text{mol/L}$	500 $\mu\text{mol/L}$	1000 $\mu\text{mol/L}$
FOR 811 A	49,67 \pm 0,53*	49,38 \pm 0,53*	26,00 \pm 0,94*#	14,38 \pm 0,67*#	14,14 \pm 1,09*#	8,59 \pm 1,05*#
FOR 011 A	50,14 \pm 1,55*	35,03 \pm 0,53*#	32,03 \pm 1,50*#	18,46 \pm 0,78*#	9,48 \pm 1,50*#	9,42 \pm 1,25*#

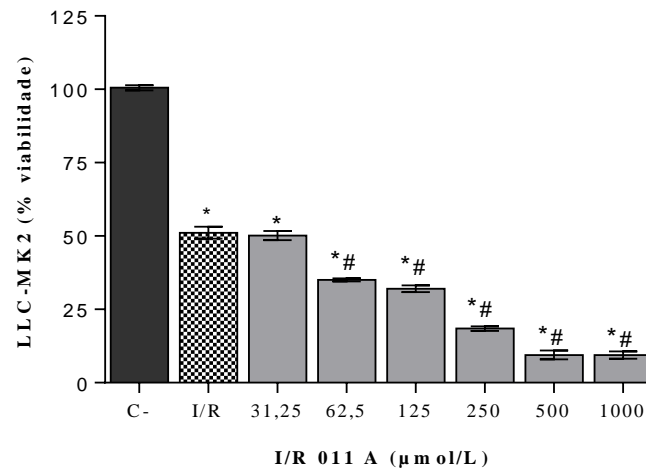
Os dados foram expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *(p<0,05) vs. C-, #(p<0,05) vs. I/R. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 26– Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com várias concentrações de FOR 811 A



Os dados foram expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. C-: grupo controle, I/R: grupo submetido à Isquemia/reperfusão, I/R 011 A: grupo tratado com o composto FOR 811 A (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$). A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *($p < 0,05$) vs. C-, #($p < 0,05$) vs. I/R.

Figura 27– Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com várias concentrações de FOR 011 A

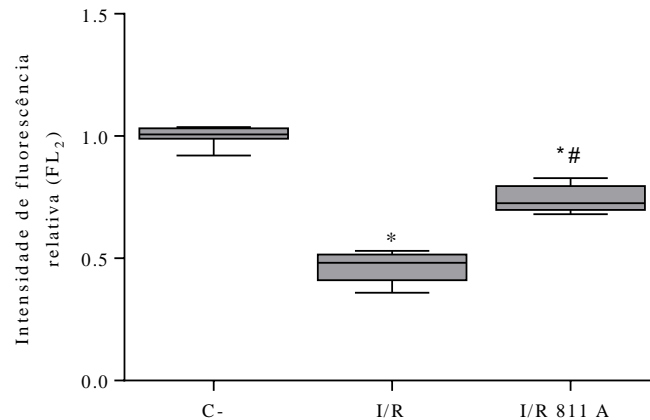


Os dados foram expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. C-: grupo controle, I/R: grupo submetido à Isquemia/reperfusão, I/R 011 A: grupo tratado com o composto FOR 011 A (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *($p < 0,05$) vs. nC-, #($p < 0,05$) vs. I/R.

Pelo ensaio de toxicidade pelo MTT e pela avaliação da proteção na placa de anaerobiose, escolheu-se a concentração de 31,25 $\mu\text{mol/L}$ das duas substâncias para se proceder com o ensaio da avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial pela rodamina. A rodamina (Rho 123) é um corante capaz de revelar mitocôndrias de células

viáveis, avaliando, desse modo, o potencial mitocondrial que está representado nas Figuras 27 e 28.

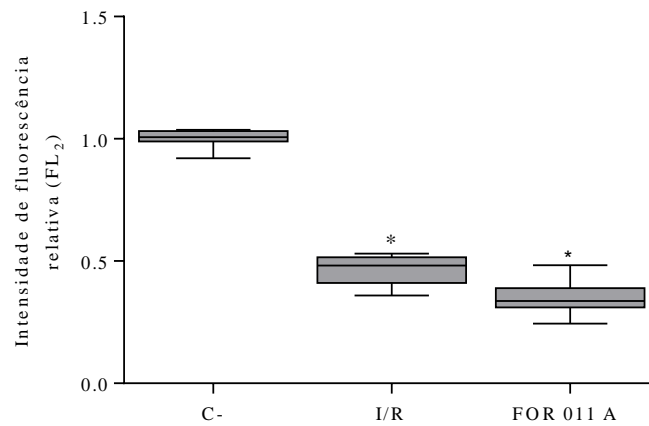
Figura 28– Análise da respiração celular do FOR 811 A (31,25 $\mu\text{mol/L}$) com o uso do corante rodamina



Os dados foram expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. C-: grupo controle, I/R: grupo submetido à Isquemia/reperfusão, I/R 011 A: grupo tratado com o composto FOR 811 A (31,25 $\mu\text{mol/L}$). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *($p < 0,05$) vs. C-, #($p < 0,05$) vs. I/R.

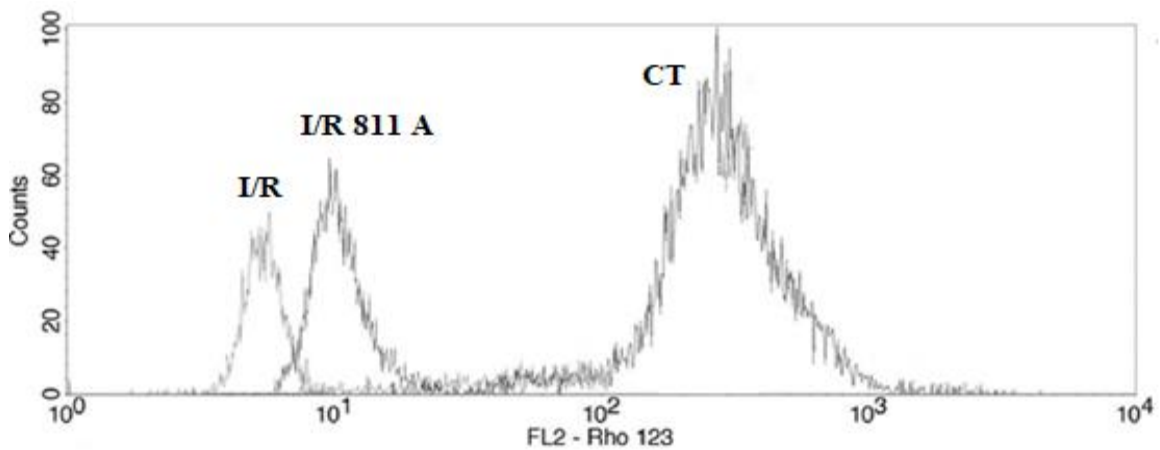
A substância FOR 811 A aumentou significativamente a fluorescência relativa nos poços tratados em relação ao grupo I/R ($0,74 \pm 0,02$ vs. $0,46 \pm 0,02$, respectivamente), mas não em relação ao grupo controle ($0,74 \pm 0,02$ vs. $1,00$ vs. $0,01$), demonstrando um potencial efeito protetor sobre o efeito de disfunção da respiração celular e da cadeia transportadora de elétrons causado pela lesão por I/R (Figura 28). No entanto, a substância FOR 011 Ana concentração estudada, diminuiu a fluorescência relativa nos poços tratados em relação ao grupo isquemia ($0,35 \pm 0,02$ vs. $0,46 \pm 0,02$, respectivamente) e em relação ao grupo controle ($0,35 \pm 0,02$ vs. $1,00 \pm 0,01$) (Figura 29). A Figura 30 demonstra o histograma representativo relativo à distribuição populacional da fluorescência, confirmando os dados estatísticos obtidos.

Figura 29–Análise da respiração celular do FOR 011 A (31,25 $\mu\text{mol/L}$) com o uso do corante rodamina



Os dados foram expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. C-: grupo controle, I/R: grupo submetido à Isquemia/reperfusão, I/R 011 A: grupo tratado com o composto FOR 011 A (31,25 $\mu\text{mol/L}$). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. *($p < 0,05$) vs. C-, #($p < 0,05$) vs. I/R.

Figura 30– Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial pela utilização do corante de rodamina



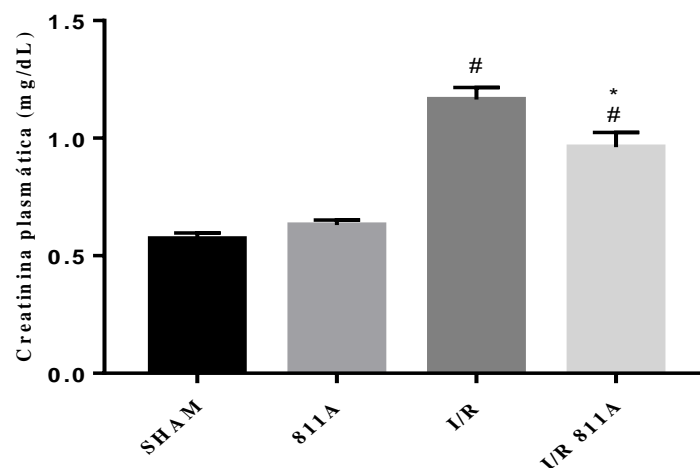
Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

5.3 Efeito do FOR 811 A sobre os marcadores de função renal

Baseado nos resultados de I/R *invitro*, nos quais o FOR 811 A demonstrou uma potencial proteção em células que sofreram lesão por I/R, e com a finalidade de comprovar esse efeito, foram realizados experimentos de I/R *in vivo*.

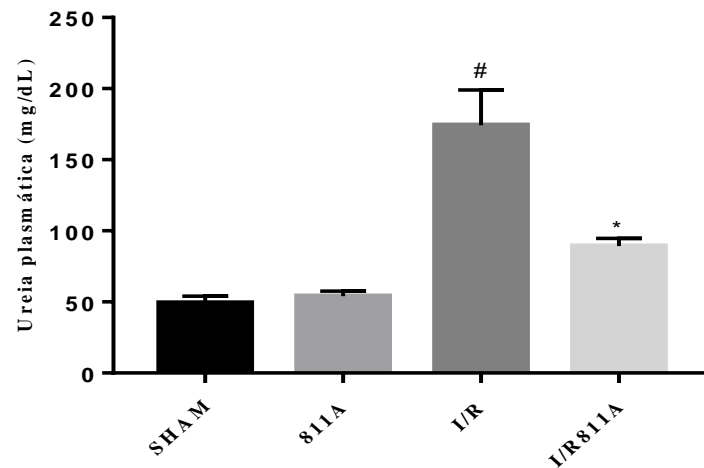
Para avaliar um possível efeito protetor do FOR 811 A (10mg/Kg) na lesão renal aguda por I/R, foram medidos os níveis plasmáticos de creatinina e ureia das amostras de plasma de 48 horas após o início da reperfusão (Figura 31 e 32). Os animais que sofreram lesão, grupo I/R, apresentaram níveis de creatinina e ureioplasmáticas significativamente maiores do que os animais do grupo SHAM ($1,164 \pm 0,05$ mg/dL vs. $0,57 \pm 0,02$ mg/dL) e ($174,3 \pm 24,66$ mg/dL vs. $49,22 \pm 4,75$ mg/dL), respectivamente. O grupo tratado com o FOR 811A mostrou diminuição significativa dos níveis de creatinina e ureia plasmática quando comparado ao grupo I/R ($0,96 \pm 0,06$ vs. $1,164 \pm 0,05$ mg/dL) e ($89,25 \pm 5,34$ mg/dL vs. $174,3 \pm 24,66$), respectivamente.

Figura 31– Efeito do tratamento com FOR 811 A nos níveis de creatinina plasmática em animais que sofreram LRA por I/R



A Figura mostra o efeito do FOR 811 A nos níveis plasmáticos de creatinina após lesão renal aguda por I/R. Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M. da concentração de creatinina plasmática em mg/dL nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle; 811A: controle tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.); I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. #($p < 0,05$) vs. SHAM, *($p < 0,05$) vs. I/R.

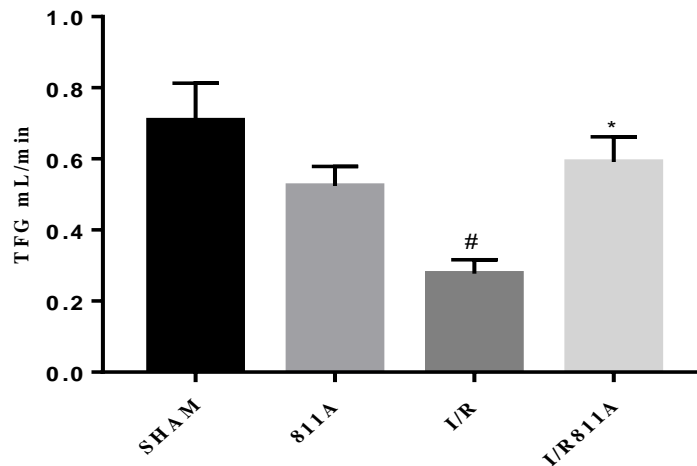
Figura 32–Efeito do tratamento com FOR 811 A nos níveis de ureia plasmática em animais que sofreram LRA por I/R



A Figura mostra o efeito do FOR 811 A nos níveis plasmáticos de ureia após lesão renal aguda por I/R. Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M. da concentração de ureia plasmática em mg/dL nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle; 811A: controle tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.); I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. #($p < 0,05$) vs. SHAM, *($p < 0,05$) vs. I/R.

Observa-se na Figura 33 a diminuição significativa da taxa de filtração glomerular (TFG) no grupo I/R comparado ao grupo SHAM ($0,27 \pm 0,04$ ml/min vs. $0,70 \pm 0,10$) e reversão desse efeito no grupo tratado com o FOR 811 A em comparação ao grupo que sofreu LRA ($0,59 \pm 0,07$ ml/min vs. $0,27 \pm 0,04$ ml/min).

Figura 33– Efeito do tratamento com FOR 811 A na taxa de filtração glomerular em animais que sofreram LRA por I/R

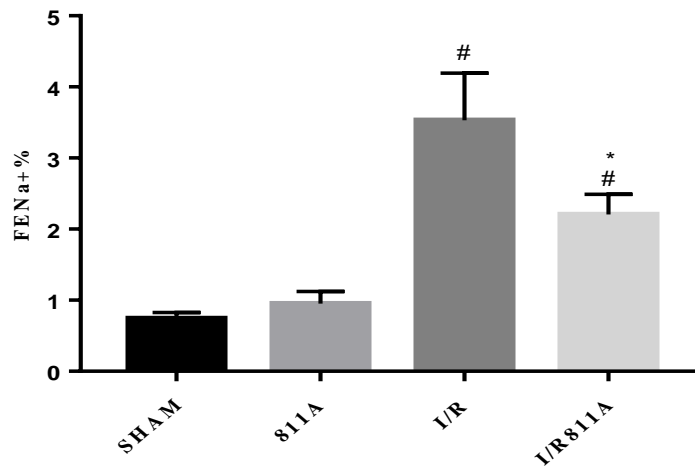


A Figura mostra o efeito do FOR 811 A na taxa de filtração glomerular (TFG) após lesão renal aguda por I/R. Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M. da TFG em mL/min nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle; 811A: controle tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.); I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. #($p < 0,05$) vs. SHAM, *($p < 0,05$) vs. I/R.

5.4 Efeito do FOR 811 A sobre a função tubular

Com o intuito de avaliar a função tubular, calculou-se a fração de excreção de sódio ($FENa^+$) que representa o percentual de sódio filtrado pelo glomérulo que não sofre reabsorção. Na Figura 34, podemos verificar o aumento significativo da $FENa^+$ no grupo que sofreu LRA em relação ao grupo SHAM ($3,53 \pm 0,66$ vs. $0,74 \pm 0,08$). O FOR 811A atenuou consideravelmente a $FENa^+$ em comparação ao grupo I/R ($2,2 \pm 0,28$ vs. $3,53 \pm 0,66$).

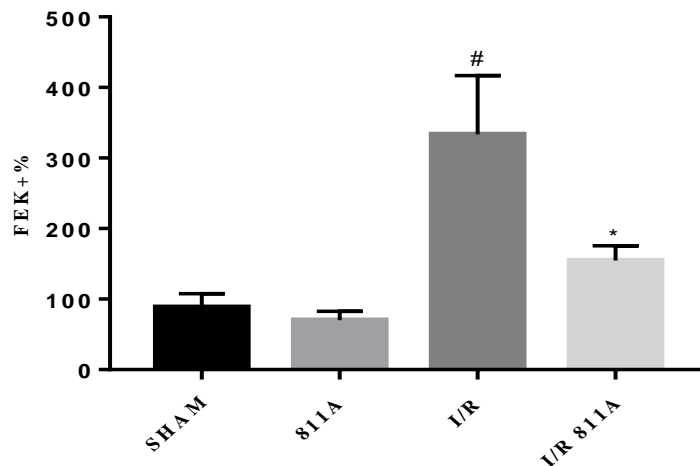
Figura 34 – Efeito do tratamento com FOR 811 A na fração de excreção de sódio em animais que sofreram LRA por I/R



A Figura mostra o efeito do FOR 811 A na fração de excreção de sódio ($FENa^+$) após lesão renal aguda por I/R. Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M. da $FENa^+$ nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle; 811A: controle tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.); I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. #($p < 0,05$) vs. SHAM, *($p < 0,05$) vs. I/R.

Também foi calculada a fração de excreção de potássio (FEK^+) a fim de reforçar a análise da função tubular. Na Figura 35, observa-se que o grupo I/R mostrou aumento considerável da (FEK^+) em relação ao grupo SHAM ($333,50 \pm 83,48$ vs. $88,73 \pm 18,87$). O grupo tratado com o FOR 811 A foi capaz de reduzir de forma significativa o aumento da (FEK^+) em relação ao grupo que sofreu a lesão ($154,8 \pm 20,96$ vs. $333,50 \pm 83,48$).

Figura 35– Efeito do tratamento com FOR 811 A na fração de excreção de potássio em animais que sofreram LRA por I/R



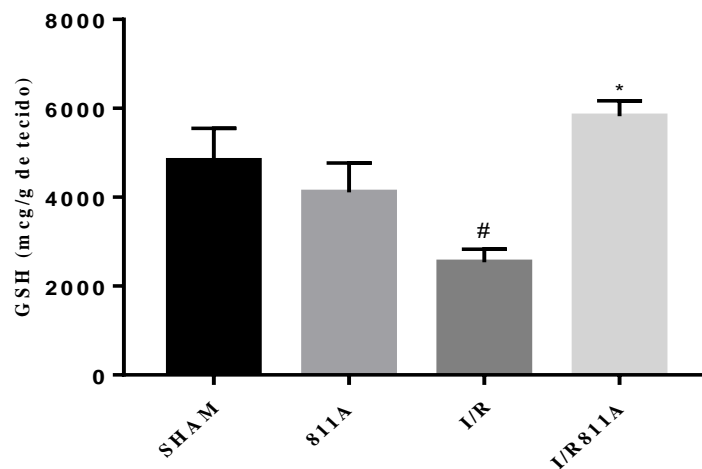
A Figura mostra o efeito do FOR 811 A na fração de excreção de potássio (FEK⁺) após lesão renal aguda por I/R. Os valores da Figura expressam a média ± E.P.M. da FEK⁺ nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle; 811A: controle tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.); I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. # (p<0,05) vs. SHAM, * (p<0,05) vs. I/R.

5.5 Efeito do FOR 811 A sobre o dano oxidativo

5.5.1 Efeito do FOR 811 A sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) tecidual após LRA por I/R.

A Figura 36 mostra a determinação dos níveis de GSH. Um decréscimo em sua concentração é tido com prova de desequilíbrio redox. O grupo que sofreu LRA mostrou uma diminuição dos valores de GSH em relação ao grupo SHAM (2536±292,2mcg/g tecido vs. 4825±724,7mcg/g tecido), o que indica dano oxidativo no grupo I/R. O tratamento com FOR 811 A foi capaz de aumentar consideravelmente os níveis de GSH em comparação ao grupo I/R (5821±347,6mcg/g tecido vs. 4825±724,7mcg/g tecido).

Figura 36 – Níveis de GSH em tecido renal

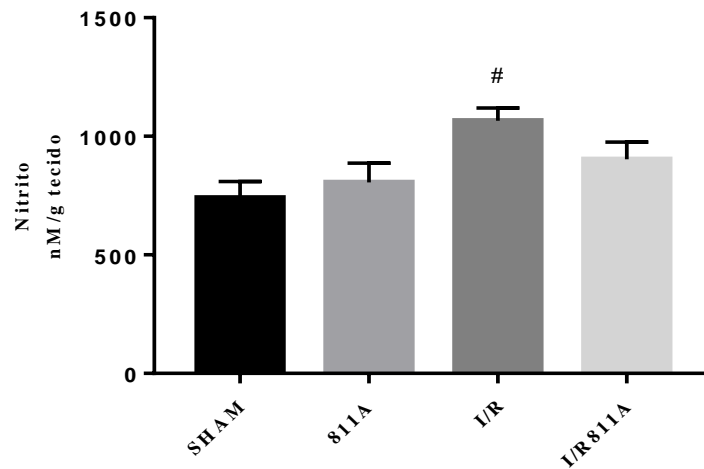


Efeito do FOR 811 A nos níveis de GSH após lesão renal por I/R. Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M dos níveis teciduais de GSH nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle; 811A: controle tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.); I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. #($p < 0,05$) vs. SHAM, *($p < 0,05$) vs. I/R.

5.5.2 Efeito do FOR 811 A sobre os níveis de nitrito/nitrato tecidual após LRA por I/R

A Figura 37 mostra a determinação dos níveis de nitrito/nitrato em tecido renal. O grupo I/R apresentou aumento dos valores de nitrito/nitrato em relação ao grupo SHAM ($1066 \pm 53,91$ nM/g tecido vs. $740,9 \pm 68,66$ nM/g tecido). Observa-se uma tendência a diminuição dos níveis de nitrito/nitrato no grupo tratado com FOR 811, mas não mostrou significância em relação ao grupo que sofreu I/R, como também não mostrou diferença significativa em comparação ao grupo SHAM.

Figura 37 – Níveis de nitrito/nitrato tecidual em tecido renal

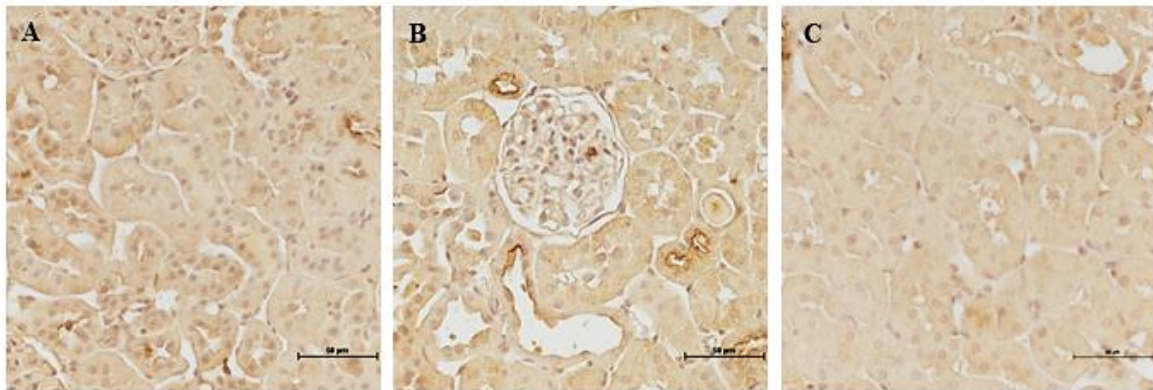


Efeito do FOR 811 A nos níveis de nitrito/nitrato após lesão renal por I/R. Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M dos níveis teciduais de GSH nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle; 811A: controle tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.); I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. #($p < 0,05$) vs. SHAM, *($p < 0,05$) vs. I/R.

5.6 Efeito do FOR 811 A na marcação imunohistoquímica para TNF- α e iNOS

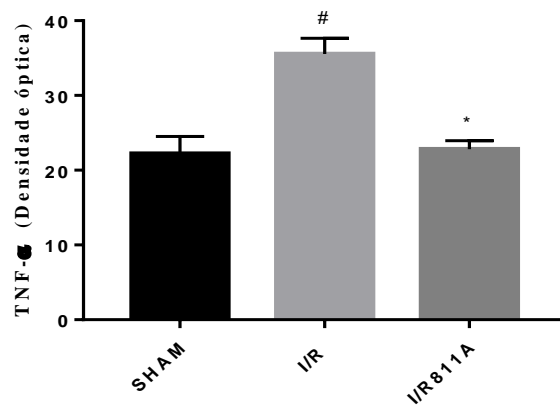
A análise imunohistoquímica dos tecidos renais dos animais isquemiados mostrou marcação para a enzima iNOS, relacionada a processos inflamatórios e para citocina TNF- α . O tratamento com o FOR 811 A foi capaz de diminuir as marcações para iNOS nos grupos SHAM ($19,87 \pm 0,60$) e I/R811 A ($20,82 \pm 0,60$) em relação ao grupo I/R ($31,41 \pm 4,15$), como também, foi capaz de diminuir as marcações para TNF- α nos grupos SHAM ($22,2 \pm 2,3$) e I/R811 A ($22,82 \pm 1,14$) em relação ao grupo I/R ($35,56 \pm 2,1$), o que é mostrado nas Figuras 38 (A - D) e 39 (E - H).

Figura 38– Fotomicrografias (200x) de imunohistoquímica para TNF- α



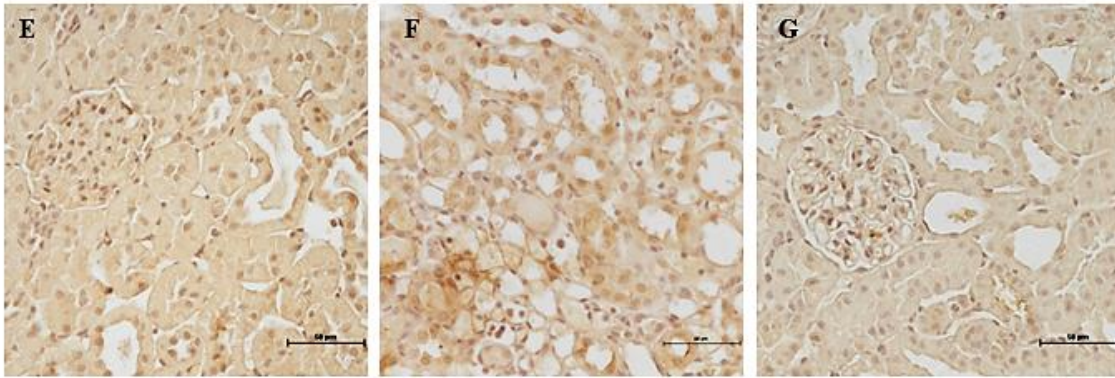
Fotomicrografias (200x) de túbulos renais com marcação de imunohistoquímica para TNF- α nos grupos: A) grupo controle, B) grupo I/R e C) grupo I/R 811A (10mg/Kg). Fonte: elaborada pela autora.

D) Mensuração por densidade óptica da marcação de TNF- α em tecido renal



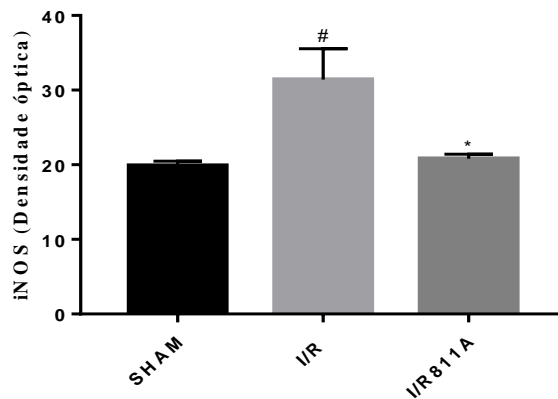
Mensuração por densidade óptica da marcação de TNF- α em animais dos grupos: SHAM: controle; I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M. da densidade óptica nos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. [#]($p < 0,05$) vs. SHAM, ^{*}($p < 0,05$) vs. I/R.

Figura 39– Fotomicrografias (200x) de imunohistoquímica para iNOS



Fotomicrografias (200x) de túbulos renais com marcação de imunohistoquímica para iNOS nos grupos: E) grupo controle, F) grupo I/R e G) grupo I/R 811A (10mg/Kg). Fonte: elaborada pela autora.

H) Mensuração por densidade óptica da marcação de iNOS em tecido renal



Mensuração por densidade óptica da marcação de iNOS em animais dos grupos: SHAM: controle; I/R: isquemia/reperfusão; I/R811A: I/R tratado com FOR 811 A (10mg/kg, i.p.). Os valores da Figura expressam a média \pm E.P.M. da densidade óptica nos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. [#]($p < 0,05$) vs. SHAM, ^{*}($p < 0,05$) vs. I/R.

6 DISCUSSÃO

O sistema de perfusão renal foi utilizado neste estudo com a finalidade de compreender as alterações fisiológicas de complexos de rutênio em rim isolado de rato para a análise de possíveis efeitos renais dos compostos FOR 811 A e FOR 011 A, excluindo a influência de outros órgãos nos tecidos dos rins analisados. Esse modelo, portanto, possibilita o estudo da fisiologia renal de forma isolada (HU *et al.*, 2010).

O nitroprussiato de sódio (NPS), usado como controle positivo, não mostrou ação em nenhum dos parâmetros analisados. Bastron e Kaloyanides (1972) mostraram o efeito do NPS em rim isolado de cachorro e verificaram um aumento de 10% no fluxo sanguíneo renal que ocasionou uma diminuição na RVR, enquanto o RFG não sofreu alteração. Apesar do uso de alta concentração de NPS, verificou-se uma resposta fraca, o que leva a crer que esse composto não é um potente vasodilatador renal em concentrações clinicamente aceitáveis.

Broman *et al.* (2017), por sua vez, verificaram que rins submetidos à hipotermia mostraram vasoconstrição com aumento da pressão de perfusão, aumento de RVR e diminuição do RFG. Quando esses rins foram perfundidos com NPS, esse fármaco se mostrou incapaz de afetar o fluxo sanguíneo renal e ritmo de filtração glomerular, o que pode ter ocorrido devido ao mecanismo de autorregulação, o qual foi capaz de anular a ação vasodilatadora do NO (BROMAN *et al.*, 2017).

O rim apresenta mecanismos compensatórios, cuja função é manter constante o ritmo de filtração glomerular (RFG), denominados de autorregulação do RFG, nos quais há participação ativa das arteríolas aferente e eferente. A teoria miogênica aponta que as arteríolas aferentes contraem sua musculatura lisa com o aumento da pressão sanguínea e aumento da resistência vascular renal, de forma a manter a pressão intraglomerular e RFG constantes. Já a teoria da retroalimentação túbulo-glomerular, na qual a mácula densa (localizada entre a porção espessa da alça de Henle e o túbulo distal) controla a quantidade de cloreto de sódio que chega a ela, detecta alterações nos níveis de NaCl e no RFG do glomérulo a que pertence, gera um sinal que alcança a arteríola aferente, provocando a dilatação ou contração, de acordo com a situação. No entanto, ainda não foi esclarecido como se dá esse sinal (ZATZ, 2012).

Em relação aos metalofármacos em estudo, observou-se um aumento significativo na pressão de perfusão (PP) na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ dos dois compostos, FOR 811 A e FOR 011 A, em relação ao controle interno, externo e grupo NPS. O FOR 811 A demonstrou aumento da resistência vascular renal (RVR) em todos os tempos em relação ao controle

externo, enquanto o FOR 011 A apenas no tempo de 120 minutos. No grupo com o FOR 811 A 0,3 $\mu\text{mol/L}$, não foram observadas alterações nos parâmetros PP e RVR. O fluxo urinário aumentou significativamente aos 120 minutos nos grupos FOR 811 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e FOR 011 A 1,0 $\mu\text{mol/L}$, mas não demonstrou alteração na dose de 0,3 $\mu\text{mol/L}$ do FOR 811 A.

Apesar de se esperar uma atividade vasodilatadora dos compostos, visto que estudo realizado por Silva (2009) mostrou que complexos de nitrosilo rutênio possuem atividade vasodilatadora, no presente estudo verificou-se uma atividade contrária, como o aumento na PP e na RVR que pode ser devido a uma atividade vasoativa das substâncias sobre as arteríolas aferentes e eferentes, o que provoca uma vasoconstrição e aumento da pressão de perfusão (WAECKEL *et al.*, 2014).

O equilíbrio do tônus vascular das arteríolas aferente e eferente é crucial para a hemodinâmica glomerular (ITO; ABE, 1996). A arteríola aferente participa diretamente da determinação do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular em conjunto com as arteríolas eferentes, ambas as arteríolas contribuem para o controle da pressão arterial, controle de sódio e homeostasia de fluidos (PATZAK *et al.*, 2005).

O estudo realizado por Silveira *et al.* (2015) em perfusão de rim isolado com um peptídeo natriurético da serpente *Crotalus durissus cascavella* em uma concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ mostrou similaridade com os achados deste trabalho, uma vez que também demonstrou aumento de PP, RVR, FU e diminuição dos transportes de Na^+ , K^+ e Cl^- . Salienta-se que, peptídeos natriuréticos, como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e a uroguanilina, tendem a mostrar um aumento do RFG pela vasodilatação pré-glomerular aliada à vasoconstrição em arteríolas eferentes (ENDLICH; STEINHAUSEN, 1997).

Outra explicação que pode ser apontada para o aumento de PP, RVR e FU ocasionado pelos metalofármacos é a ação de endotelinas, peptídeos vasoconstritores que no rim provocam aumento de RVR por vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes, artérias arqueadas e interlobulares, o que leva a redução do fluxo sanguíneo, RFG e inibição da reabsorção de sal e água, o que causa diurese e natriurese (ZANATTA *et al.*, 2008).

No que concerne aos percentuais de transportes total e proximal de eletrólitos, o composto 811 A mostrou diminuição significativa dos percentuais de transportes totais e proximais de Na^+ (% TNa^+ , % pTNa^+), K^+ (% TK^+ , % pTK^+) e Cl^- (% TCl^- , % pTCl^-) nas duas concentrações, 0,3 $\mu\text{mol/L}$ e 1,0 $\mu\text{mol/L}$ em relação ao controle interno. Já o FOR 011 A mostrou diminuição significativa apenas dos % TNa^+ , % pTNa^+ e % TCl^- , % pTCl^- .

Esse efeito nos transportes totais e proximais de Na^+ e Cl^- pode estar acontecendo pela ativação da GCs que gera GMPc (MONICA; BIAN; MURAD, 2016) no grupo do FOR

811 A em ambas as concentrações. Estudos *in vitro* mostraram que outros agentes que estimulam a produção ou, de outro modo, aumentam as concentrações intracelulares de GMPc, podem, muitas vezes, simular os efeitos de peptídeos natriuréticos, ou seja, diminuir transporte de sódio e aumentar a natriurese (SIDNEY SHAW; ZIMMERMANN, 1992). Sendo assim, essas conclusões corroboram o resultado da dosagem de GMPc, pois o grupo FOR 811 A, que apresenta NO em sua molécula, mostrou aumento significativo da concentração de GMPc em ambas as concentrações estudadas. O grupo NPS também mostrou aumento da concentração de GMPc, visto que se trata de um doador de NO conhecido que atua na via NO/GC/GMPc (GOLAN *et al.*, 2014). Tanahashi *et al.* (1999) mostraram que o NPS pode produzir óxido nítrico e aumentar os níveis de GMPc no rim e suprimir a reabsorção de sódio, mas a propriedade natriurética do NPS pode ser mascarada por seus efeitos contrários como, por exemplo, a hipotensão sistêmica (TANAHASHI *et al.*, 1999). Nos experimentos de perfusão de rim isolado realizados, pode ter ocorrido a camuflagem dos efeitos do NPS, mas também a concentração utilizada de NPS pode não ter sido suficiente para produzir efeitos nos parâmetros renais avaliados.

Com a diminuição dos transportes de eletrólitos devido à ação dos compostos estudados e conseqüente aumento de excreção de sódio, pode ter havido também uma autorregulação do RFG pela teoria da retroalimentação túbulo-glomerular, na qual a mácula densa controla as concentrações de NaCl e o RFG e gera um sinal que provoca a contração ou dilatação das arteríolas aferentes (RAIJ; BAYLIS, 1995; SILVERTHORN, 2010; WANG *et al.*, 2017). Nesse caso, houve aumento da concentração de sódio na mácula densa devido à ação natriurética dos compostos. Desse modo, a arteríola aferente se contrai, aumentando a RVR, a PP, estabilizando o RFG, o que aconteceu com os compostos estudados.

Após a isquemia renal, a depleção de ATP celular gera hipoxantina que, durante o processo de reperfusão, é convertida em espécies reativas de oxigênio que induzem mecanismos de morte celular. Além disso, o cálcio se acumula dentro das células tubulares isquêmicas e ativa uma variedade de enzimas de degradação (proteases e lipases), promovendo a ruptura do citoesqueleto e a perda da polaridade das células tubulares. A polaridade das células alterada prejudica o transporte tubular e ativa os mecanismos de retroalimentação túbulo-glomerular (SCHRIER *et al.*, 2004).

A retroalimentação túbulo-glomerular também é ocasionada devido à polaridade celular alterada que reduz a reabsorção de sódio e aumenta o aporte de sódio à mácula densa. A ativação da mácula densa provoca uma cascata de eventos que culmina com a vasoconstrição da arteríola aferente e redução da perfusão e da pressão glomerular, resultando

em diminuição do RFG. Esses eventos vasculares são decorrentes do aumento de mediadores vasoconstritores, como a endotelina, a adenosina, a angiotensina II, o tromboxano A2, dentre outros, e da redução de mediadores vasodilatadores como o óxido nítrico (NO), a prostaglandina E2 (PGE2), acetilcolina e bradicinina (VAIDYA *et al.*, 2008, SCHRIER *et al.*, 2004).

Majid *et al.* (1998) apontou que uma infusão de um doador de óxido nítrico em cães anestesiados aumentou a excreção de sódio, o que demonstrou a ação direta do NO na natriurese e diurese. No entanto, esses efeitos não foram associados com mudanças no RFG, portanto, podem estar ocorrendo diretamente na função do transporte tubular. Em rim normal, o NO afeta a hemodinâmica renal e as funções tubulares renais. Isso ocorre porque ele diminui as resistências das arteríolas aferentes e eferentes e diminui a reabsorção nos túbulos renais proximais pela redução da atividade da bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (SRISAWAT *et al.*, 2015).

Nos grupos FOR 811 A 0,3 e 1,0 $\mu\text{mol/L}$, observou-se diminuição significativa do transporte de potássio. Essa diminuição pode estar diretamente relacionada ao aumento da excreção de sódio que promove a perda de potássio. A grande oferta de sódio às porções finais dos néfrons ocasiona o aumento da secreção de potássio por esses segmentos (SEGURO *et al.*, 2012).

A bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ representa um papel importante no rim e está envolvida no transporte ativo de certos solutos e na manutenção da homeostase de eletrólitos intracelulares. Alterações em seu funcionamento podem provocar uma desestabilização das concentrações de potássio no organismo (HEIMANN; KRIEGER; ZATZ, 2011; LINARDI *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que a ação do NO mediada por mecanismos dependentes de GMPC diminui o funcionamento da bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (GUZMAN; INGELFINGER; GARG, 1995; LIANG; KNOX, 1999).

Quanto ao fluxo urinário, ressalta-se que este sofreu um aumento somente nos grupos FOR 811 A e FOR 011 A na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$. O aumento do fluxo urinário pode ser devido à diminuição do percentual de transporte de eletrólitos, o que está relacionado à natriurese e, por consequência, à diurese (DOBROWOLSKI *et al.*, 2015).

A análise histológica dos rins perfundidos apontou alterações nos grupos tratados com os complexos de rutênio na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$, como degeneração glomerular e do epitélio tubular, discreto processo inflamatório, atrofia e tumefação glomerular, depósito de proteína intratubular. O grupo NPS ($\mu\text{mol/L}$) também mostrou alterações como deposição de material protéico intratubular, tumefação tubular, degeneração hidrópica vacuolar e

degeneração tubular. No experimento realizado em cultura de células LLC-MK2, houve toxicidade celular nas maiores doses testadas dos metalofármacos, o que parece ser dose-dependente. O Nitroprussiato, bastante usado na clínica como um fármaco anti-hipertensivo, apresenta comprovada toxicidade dose-dependente a qual pode ser atribuída, principalmente, a produção de cianeto, a liberação excessiva de NO e consequente aumento de espécies reativas (GOC *et al.*, 2017).

Os principais achados histológicos na LRA são a perda de células epiteliais tubulares e a presença de proteína nos túbulos renais (SRICHA *et al.*, 2008). Desse modo, as lesões encontradas na análise histológica nos grupos FOR 811 A e FOR 011 A na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ são indicativas de LRA. Esses resultados também podem justificar as alterações nos transportes de eletrólitos dos compostos estudados, fortalecendo a hipótese de disfunção tubular devido à ocorrência de danos teciduais nos grupos com alterações histológicas.

A isquemia e reperfusão é uma das principais causas de lesão renal aguda (RAO *et al.*, 2017)). A isquemia, por um lado, leva a sérios efeitos deletérios para diferentes órgãos, por outro lado, a reperfusão proporciona mais lesões celulares nos órgãos-alvo da isquemia. É importante mencionar que a isquemia é causada por choque ou processos cirúrgicos como transplante renal, ressecção de tumores e traumas (BRITO *et al.*, 2017). Vários fatores estão envolvidos na fisiopatologia da lesão renal por I/R, como hipóxia induzida por depleção de ATP, produção de EROs e resposta inflamatória (WEI *et al.*, 2016).

Intervenções terapêuticas que promovem vasodilatação durante a fase inicial de reperfusão, ao melhorar o fluxo sanguíneo e oxigenação para o rim, neutralizam alguns dos efeitos prejudiciais da lesão por I/R e preservam a função renal. Além disso, os doadores de óxido nítrico que agem pela via NO/GCs/GMPC podem ser benéficos durante a reperfusão, compensando a biodisponibilidade reduzida de NO após lesão isquêmica (HOOSGOOD *et al.*, 2014).

Primeiramente, experimentos de viabilidade celular foram realizados *in vitro* em células LLC-MK2, uma linhagem celular imortalizada de túbulos proximais de macaco (*Macaca mulatta*). Essas células são bastante usadas para o teste de substâncias devido à maior reprodutibilidade de estudos e menor sensibilidade das células a fatores tóxicos (HULL; CHERRY; TRITCH, 1962).

O FOR 811 A apresentou diminuição significativa da viabilidade celular apenas nas maiores concentrações, 500 e 1000 $\mu\text{mol/L}$. Já o FOR 011 A mostrou diminuição significativa da viabilidade celular nas concentrações 250, 500 e 1000 $\mu\text{mol/L}$, demonstrando,

assim, maior perfil citotóxico. Quando as células foram submetidas ao processo de I/R, apresentaram diminuição de viabilidade em relação ao controle. Os tratamentos não foram capazes de recuperar a viabilidade celular, pois a viabilidade dos grupos tratados permaneceu estatisticamente semelhante ao grupo isquemia nas concentrações de 31,25 e 62,5 $\mu\text{mol/L}$ no tratamento com o FOR 811 A e apenas na dose 31,25 $\mu\text{mol/L}$ para o FOR 011 A. No entanto, estudos mostraram que complexos de rutênio apresentam propriedades antioxidantes (SANTANA *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2017), e, sabendo-se que a LRA por I/R interfere na modulação da função mitocondrial (KURIAN; PEMAIH, 2014), avaliou-se o potencial mitocondrial das células submetidas a I/R com o uso da técnica de citometria de fluxo. Os resultados revelaram significativo efeito protetor do FOR 811 A, em relação à disfunção da respiração celular e da cadeia transportadora de elétrons, causado pela lesão por I/R. Já o FOR 011 A não mostrou proteção do dano por I/R. Isso pode estar relacionado a possíveis propriedades antioxidantes do composto, as quais podem estar associadas à presença de NO na molécula do FOR 811 A, visto que o composto FOR 011 A não apresenta o NO.

As mitocôndrias desempenham papéis centrais no metabolismo celular e sinalização redox, essas organelas também são fontes de EROs. Reações redox catalisadas por várias desidrogenases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida, NAD(H), são vitais no metabolismo energético, como a glicólise e a fosforilação oxidativa. As moléculas de NADH são oxidadas para gerar ATP por meio da cadeia de respiração mitocondrial e são usadas como marcadores de funções mitocondriais (ZHAO; YANG, 2016). Toledo Júnior *et al.* (2002), em estudo realizado com complexos de nitrosilo rutênio, descobriram que os compostos estudados liberavam NO rapidamente e seu potencial de redução se mostrou adequado para redução por sistemas biológicos. Os autores demonstraram ainda que a redução do complexo de nitrosilo rutênio se dava concomitantemente à oxidação mitocondrial de NADH e observaram que o grupo nitrosilo pode ser reduzido por componentes intracelulares.

Com os resultados obtidos *in vitro*, partiu-se para os experimentos *in vivo* de I/R apenas com o composto FOR 811 A devido a potencial proteção dos danos provocados por I/R em células epiteliais tubulares renais, o que não foi demonstrado pelo composto FOR 011 A. O modelo experimental utilizado neste estudo visa reproduzir o dano causado por I/R.

O modelo de LRA utilizado nesta pesquisa foi capaz de induzir a lesão renal aguda de acordo com estudos realizados na mesma linha de pesquisa (DA COSTA *et al.*, 2015). O pré-tratamento com o FOR 811 A (10mg/kg) nos animais submetidos a I/R apresentou melhora parcial nos níveis plasmáticos de creatinina e diminuição significativa dos

níveis plasmáticos de ureia em relação ao grupo que sofreu lesão. A taxa de filtração glomerular do grupo I/R 811 A apresentou aumento em relação ao grupo I/R, o que demonstra uma melhora da função glomerular no grupo que recebeu pré-tratamento com o FOR 811 A.

A medida de creatinina plasmática é o marcador mais utilizado na clínica para definição da LRA junto com a dosagem de ureia plasmática, fração de excreção de sódio, osmolaridade e o cálculo da taxa de filtração glomerular, avaliado pelo *clearance* de creatinina (HSU *et al.*, 2016).

A lesão renal aguda compromete também a excreção de eletrólitos, além do sódio, a hipercalemia (aumento da concentração de potássio no sangue) é bastante grave por levar a arritmias que podem ser fatais. A LRA é caracterizada por lesão dos túbulos proximais, o que afeta principalmente a reabsorção de eletrólitos, aumentando a excreção destes (YU *et al.*, 2012). Além disso, O tratamento com FOR 811 A parece ter efeito protetor de lesão tubular, visto que as frações de excreção de sódio e potássio que estavam aumentadas no grupo I/R tiveram o valor diminuído significativamente no grupo tratado.

Jeong *et al.* (2004) comprovou a redução da lesão renal por I/R com a administração de um doador de óxido nítrico que parece ter causado a supressão da produção de endotelina-1 renal, um potente mediador de vasoconstrição, o qual aumenta durante a lesão por I/R.

Nos testes relacionados ao estresse oxidativo, o pré-tratamento com o FOR 811 A mostrou aumento significativo nos níveis de glutatona reduzida (GSH), em contraste com o grupo I/R. Baixas concentrações de GSH demonstram um desequilíbrio redox e estão presentes na LRA, visto que essa patologia tem como uma de suas principais características, a geração de EROs (GIUSTARINI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2017). O FOR 811 A aumentou a produção de GSH, demonstrando ter efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Estudo realizado com trimetazidina, uma droga anti-isquêmica, mostrou proteção renal contra lesão por I/R pela redução do estresse oxidativo, esse efeito parece ser mediado pela ativação da via de sinalização Akt/eNOS (MAHFOUDH-BOUSSAID *et al.*, 2014).

Em relação à dosagem de nitrito/nitrato, o composto apresentou uma tendência à diminuição de nitrito/nitrato, não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle, no entanto, não demonstrou diminuição significativa em relação ao grupo I/R. O iNOS gerado durante a I/R contribui para lesão renal. Já o NO produzido por iNOS reage com O_2 e produz o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) que é altamente reativo. NO e $ONOO^-$ são reconhecidos por sua capacidade de induzir lesão oxidante quando em altas concentrações nos

tecidos (IMPELLIZZERI *et al.*, 2015). NO e ONOO⁻ são convertidos a nitrito (NO₂) e/ou nitrato (NO₃), sendo os níveis teciduais de nitrito/nitrato indicativos da formação de NO e ONOO⁻. Portanto, os altos níveis de nitrito/nitrato são indicativos de lesão renal (YANARATES *et al.*, 2008). O FOR 811 A não foi capaz de reverter o aumento de nitrito/nitrato, provavelmente por causar aumento da biodisponibilidade de NO.

Na análise da marcação de TNF- α e iNOS por imunohistoquímica, verificou-se a diminuição de marcação de ambos os mediadores inflamatórios nos grupos SHAM e tratado com o FOR 811 A. O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória produzida primariamente pela ativação de monócitos/macrófagos que tem papel importante na iniciação e continuação da inflamação e imunidade. No rim, o TNF- α é expresso, sintetizado e liberado por macrófagos infiltrantes e células renais endoteliais, mesangiais, glomerulares e epiteliais tubulares (SANCHEZ-NIÑO *et al.*, 2010).

Na I/R, há presença marcante de estresse oxidativo que leva a ativação da sinalização de mecanismos que acarretam a produção de TNF- α que ativa o fator nuclear NF- κ B que, por sua vez, induz a expressão de TNF- α , o qual pode regular positivamente outras citocinas e mediadores pró-inflamatórios e, assim, causar danos teciduais pelo aumento gradativo nos níveis séricos de IL-1 β e iNOS. TNF- α , lipopolissacarídeos e a I/R induzem o aumento da atividade da iNOS, o que leva ao desenvolvimento de danos nos túbulos renais (ARAGNO *et al.*, 2003; FUKUMOTO *et al.*, 2011). Chatterjee *et al.* (2007) sugeriram que a supressão da atividade de iNOS pode diminuir a lesão e disfunção renal e pela diminuição da produção exarcebada de NO. Kobayashi (1995) mostrou que o NO diminui a adesão leucocitária, infiltração neutrofílica e a formação de mediadores inflamatórios durante a isquemia. Desse modo, pode-se sugerir que um dos fatores que colaboram com a diminuição de expressão de iNOS é a redução de TNF- α pela ação protetora do NO.

A melhora dos danos causados pela I/R renal no grupo tratado com o metalofármaco pode estar relacionada ao aumento da biodisponibilidade de NO. Senbel *et al.* (2014) mostrou que o pré-tratamento de animais submetidos a I/R renal com L-arginina, precursora da síntese do NO, apresentou resultados protetores dos danos causados pela lesão por isquemia, atribuindo-se a ação não só às propriedades antioxidantes, como também ao aumento da biodisponibilidade do NO pela L-arginina. A I/R envolve disfunção endotelial, a qual pode ser atribuída a diminuição de NO disponível. Esse estudo sugere que a interação entre NO e EROs parece ser benigna, visto que o tratamento realizado mostrou proteção também em relação a dosagem de estresse oxidativo.

Mashiach *et al.* (1998) trata que o NO parece ter uma atividade benéfica durante a isquemia devido a sua atividade vasodilatadora, provavelmente via NO/GMPc/GCs, visto que nos experimentos de rim isolado, os tratamentos com o FOR 811 A aumentaram a expressão de GMPc. Campelo *et al.* (2012) realizaram tratamento com um complexo de rutênio, o Rut-bpy (cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]PF₆), também denominado FOR 0810, em modelo de I/R cerebral, e mostrou que a expressão da ativação de NF-κB foi reduzida e a pressão sanguínea se mostrou estável durante a mudança de fase de isquemia para reperfusão, provavelmente devido a liberação do NO pelo complexo de rutênio. Esse mesmo composto protegeu lesão gástrica por naproxeno pela ativação de GCs e canais K_{ATP}, diminuição de radicais livres, produção de citocinas e inibição de adesão neutrofílica (SANTANA *et al.*, 2015).

O presente trabalho apresentou algumas limitações, principalmente em relação à investigação de mecanismos envolvidos no processo de LRA por I/R. Apesar das evidências mostradas nesse e em muitos outros estudos sobre o tema, vários mecanismos envolvidos na I/R renal ainda não foram elucidados. Ademais, torna-se necessária a investigação de forma mais apurada das ações da substância estudada, 811 A, visto que os resultados sugerem um efeito terapêutico renal dose-dependente.

7 CONCLUSÕES

O estudo mostrou que o FOR 811 A e o FOR 011 A na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ promoveram alterações nos parâmetros hemodinâmicos renais, com aumento da pressão de perfusão, resistência vascular renal (em relação do controle externo) e fluxo urinário. O composto FOR 811 A, em ambas as concentrações, diminuiu os transportes totais e proximais de sódio, potássio e cloreto, enquanto o FOR 011 A diminuiu os transportes totais e proximais de sódio e cloreto. Nenhum grupo mostrou alterações no RFG o que pode ser devido a ações de autorregulação renal. A análise histológica dos rins perfundidos demonstrou toxicidade na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ para ambos os compostos, o que é sugestivo de lesão renal aguda, a qual parece ser dose-dependente. Na dosagem de GMPc, os níveis de GMPc aumentaram nos grupos FOR 811 A em ambas as concentrações estudadas e no grupo NPS, o que denota uma ação do composto FOR 811 A e do nitroprussiato sobre as GCs, visto que esses compostos apresentam NO em sua estrutura o qual age pela ativação de GCs e aumento de GMPc. O aumento de GMPc não foi observado no grupo do FOR 011 A provavelmente devido à inexistência de NO em sua estrutura.

Em linhagem de células LLC-MK2, o FOR 011 A teve toxicidade maior do que o composto FOR 811 A que, por sua vez, demonstrou efeito protetor sobre a disfunção da respiração celular e da cadeia transportadora de elétrons causado pela lesão por I/R.

O estudo sugere, ainda, efeito protetor da lesão renal aguda por I/R *in vivo* pelo nitrosilo complexo de rutênio FOR 811 A, pois este diminuiu níveis de creatinina, uréia, fração de excreção de sódio e potássio e, por outro lado, aumentou a concentração de GSH, o que indica efeito antioxidante. A análise imunohistoquímica diminuiu a marcação de iNOS e TNF- α , o que sugere uma atividade anti-inflamatória pela inibição da produção de TNF- α e consequente inibição de iNOS.

REFERÊNCIAS

- AGBALE, C. M *et al.* Designing metallodrugs with nuclease and protease activity. **Metallomics**, v.8, p.1159-1169, 2016.
- ARAGNO *et al.* Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. **Kidney International**, v. 64, p.836-843, 2003.
- AZARI, O. *et al.* Protective effects of Hydrocortisone, Vitamin C and E alone or in combination against renal ischemia-reperfusion injury in rat. **Iran J Pathol**, v.10, n.4, p.272 – 280, 2015.
- BAGUL, A.; FROST, J. H.; DRAGE, M. Stem cells and their role in renal ischaemia reperfusion injury. **American Journal of Nephrology**, v.37, p.16-29, 2013.
- BASILE, D. P.; YODER, M. C. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 14, n. 1, p.3-14, 2014.
- BASS, D. A. *et al.* Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.
- BASS, D. A. *et al.* Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 136-141, 1986.
- BASTRON, R. D.; KALOYANIDES, G. J. Effect of sodium nitroprusside on function in the isolated and intact dog kidney. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.181, n.2, p.244-249, 1972.
- BOIM, M. A.; ZATZ, R.; TEIXEIRA, V. P. C. Modulação humoral da função renal. In: ZATZ, R. **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. 1 Ed. São Paulo: ATHENEU, 2012, p.291-313.
- BONAVIA, A.; SINGBARTL, K. A review of the role of immune cells in acute kidney injury. **Pediatr. Nephrol**, p.1-11, 2017.
- BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford; Blackwell, 1992.
- BRITO, M. V. H. *et al.* Effects of hypertonic saline solution associated to remote ischemic preconditioning in kidney ischemia/reperfusion injury in rats. **Acta Cir Bras.**, v.32, n.3, p.211-218, 2017.
- BROMAN, L. M.; CARLSTROM, M.; KALLSKOG, O.; WOLGAST, M. Effect of nitric oxide on renal autoregulation during hypothermia in the rat. **Eur. J. Physiol.**, v.469, p.669-680, 2017.
- BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell Culture**. Oxford; Blackwell, 1992.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium e gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248 (2016), p. 97-109, 2016.

CAMPELO, M. W. S. *et al.* Preconditioning with a Novel Metallopharmaceutical NO donor in Anesthetized Rats Subjected to Brain Ischemia/Reperfusion. **Neurochem Res**, v. 37, p.749-758, 2012.

CARAMORI, G. F. *et al.* The Ru–NO Bonding in Nitrosyl-[poly(1-pyrazolyl)borate]ruthenium Complexes: a Theoretical Insight based on EDA. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 9, p.1487-1496, 2013.

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

CHATTERJEE, P. K. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.376, p.1-43, 2007.

CHYLEWSKA, A. *et al.* Metallopharmaceuticals in Therapy - A New Horizon for Scientific Research. **Current Medicinal Chemistry**, v.25, n.15, p.1729-1791, 2018.

CRUZ, J. E. Therapeutic interchange of clevidipine for sodium nitroprusside in cardiac surgery. **Pharmacy and Therapeutics**, v.41, n.10, p.635-639, 2016.

COSTA, C. O. S. *et al.* Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p.104367-104392, 2017.

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

DA COSTA, M. F. *et al.* Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 22, n. 9, p. 787-95, 2015.

DEVARAJAN, P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, n.6, p.1503-1520, 2006.

EARLE, K. A. *et al.* Nitric oxide bioavailability and its potencial relevance to the variation in susceptibility to the renal and vascular complications in patients with type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 32, n. 1, p.138-140, 2009.

EKENGARD, E. *et al.* Antimalarial activity of ruthenium(II) and osmium(II) arene complexes with mono- and bidentate chloroquine analogue ligands. **Dalton transactions**, v. 44, p. 19314-19329, 2015.

ENDLICH, K.; STEINHAUSEN, M. Natriuretic peptide receptores mediate different responses in rat renal microvessels. **Kidney International**, v.52, p.202-207, 1997.

EVGENOV, O. V. *et al.* NO-independent stimulators and activators of soluble guanylatecyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov.** v. 5, n. 9, p. 755-768, 2006.

FELETOU, M. & VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lectur). **Am J Physiol Herat Circ Physiol**, v.291, n.3, 2006.

FERREIRA, K. Q.; TFOUNI, E. Chemical and Photochemical Properties of a Ruthenium Nitrosyl Complex with the *N*-Monosubstituted Cyclam 1-(3-Propylammonium)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 7, p.1349-1358, 2010.

FONTELES, M. C. Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado: papel dos lipídeos endógenos no transporte de sódio e função renal. 1980. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980.

FONTELES, M. C. *et al.* Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p.235-246, 1983.

FONTELES, M. C. *et al.* Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 191-197, 1998.

FUKUMOTO, K. *et al.* Role of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal injury in mice. **Int. J. Mol. Med.**, v.27, n.3, p.353-9, 2011.

GALVÃO DE LIMA, R. *et al.* Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction. **Molecules**, v. 19, p.9628-9654, 2014.

GHASEMI, M. *et al.* Role of nitric oxide in kidney and liver (as distance organ) function in bilateral renal ischemia-reperfusion: Effect of L-Arginine and NG-nitro-L-Arginine methyl ester. **Advanced Biomedical Research**, 2015.

GHOLAMPOUR, H.; MOEZIB, L.; SHAFAROODIC, H.. Aripiprazole prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats, probably through nitric oxide involvement. **European Journal of Pharmacology**, 2017.

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

GIOVANNINI, L. *et al.* Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 37, p.262-70, 2001.

GIUSTARINI, D. *et al.* Detection of glutathione in whole blood after stabilization with N-ethylmaleimide. **Analytical Biochemistry**, v. 415, p. 81-83, 2011.

GOC, Z. *et al.* Protective effects of melatonina on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP. **Chinese Journal of Physiology**, v.60, n.1, p.1-10, 2017.

GOLAN, David E. *et al.* **Princípios de farmacologia:** a base fisiopatológica da farmacoterapia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GOUVEIA-JÚNIOR, F. S. Novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos: síntese, caracterização e avaliação do potencial terapêutico. 2017. 171f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**126(1), p. 131-138, 1982.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro, 11 ed.,2011.

GUZMAN, N. J.; INGELFINGER, J. R.; GARG, L. C. Autocrine inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. **The journal of clinical Investigation**, v.95, p.2083-2088, 1995.

HEIMANN, J. C.; KRIEGER, J. E.; ZATZ, R. Fisiopatologia da hipertensão arterial. In: ZATZ, R. **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. 1 Ed. São Paulo: ATHENEU, 2012, p.291-313.

HOFFMANN L. S. *et al.* Chronic Activation of Heme Free Guanylate Cyclase Leads to Renal Protection in Dahl Salt-Sensitive Rats. **Plos One**, v. 10, n. 12, 2015.

HOSGOOD, S. A. *et al.* Sildenafil citrate in a donation after circulatory death experimental model of renal ischemia-reperfusion injury. **Transplantation**, v. 98, p. 612-617, 2014.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, v. 29, p. 577-80, 1981.

HSU, C. N. *et al.* Incidence, outcomes, and risk factors of community-acquired and Hospital – acquired acute kidney injury: a retrospective cohort study. **Medicine (Baltimore)**, v.95, n.19, 2016.

HU, P. *et al.* Renal Action of C-type Natriuretic Peptide: Advocating the Isolated Perfused Rat Kidney Model. **Saudi J Kidney Dis Transpl.**, v. 21, n.4, p.613-620, 2010.

HULL, R. N. *et al.* Characteristics of monkey kidney cell strains llc-mkt, llc-mk2, and llc-mk(nctc-3196) and their utility in virus research. **Kidney cell strains**, p.903-017, 1962.

IMPELLIZZERI, D. *et al.* Effects of palmitoylethanolamide and silymarin combination treatment in na animal modelo f kidney ischemia and reperfusion. **European Journal of Pharmacology**, v.762, p.136-149, 2015.

INCALZA, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endotelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, 2017.

ITENOV, T. S. *et al.* Endothelial damage signals refractory acute kidney injury in critically ill patients. **SHOCK**, v.47, n.6, p. 696-701, 2017.

ITO, S.; ABE, K. Contractile properties of afferent and efferent arterioles. *Clinical and Experimental. Pharmacology and Physiology*, v. 24, p.532-535, 1997.

JEONG, G. Y. *et al.* The Effect of a Nitric Oxide Donor on Endogenous Endothelin-1 Expression in Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings*, v.36, p.1943–1945, 2004.

JHA, V. ; PARAMESWARAN, S. Community-acquired acute kidney injury in tropical countries. *Nat Rev Nephrol.*, v. 9, n.5, p.278-90, 2013.

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

JORGE, A. R. C. **Interações entre a ingestão alta de sódio e os peptídeos urodilatina e uroguanilina na função renal de ratos.** 2013. 117 f.

KANAGASUNDARAM, N. S. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Annals of Clinical Biochemistry*, v.52, n.2, p.193-205, 2015.

KARIDI, K. *et al.* Synthesis, Characterization, and DNA-Binding Studies of Nitro(oligopyridine)ruthenium(II) Complexes. *Inorganic Chemistry*, v. 45, n. 25, 2006.

KASHANI, K.; CHEUNG PASITPORN, W.; RONCO, C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v.55, n.8, p. 1074-1089, 2017.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl. Official journal of the international society of nephrology*, v. 2, n.1, p.1-138, 2012.

KESIC, A.; STAJIC, N.; THAISS, F. Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy. *Journal of Immunology Research*, v. 2017, 10p, 2017.

KO, S. *et al.* E. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems coding underestimates the incidence and prevalence of Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease in General Medical Patients. *Inter. Med. J.*, v. 48, n.3, p.310-315, 2018.

KOBAYASHI, H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J. Surg. Res.*, v.59, p.772-770, 1995.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J. Can. Chir*, v. 56, n. 1, 2013.

KUMAR, S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury. *Kidney International*, v. 93, p.27-40, 2018.

KURIAN, G. A.; PEMAIH, B. 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.

KWON, O.; HONG, S-M.; RAMESH, G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.296, p.25-33, 2009.

LE, S. *et al.* Continuous administration of recombinant human B-type natriuretic peptide can improve heart and renal function in patients after cardiopulmonary bypass surgery. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n.3, p. 692-701, 2017.

LEE, I. C. *et al.* Ameliorative effects of pine bark extract on cisplatin-induced acute kidney injury in rats. **Ren Fail**, v.39, n.1, p.363-371, 2017.

LIANG, M.; KNOX, F. G. Nitric oxide reduces the molecular activity of Na⁺, K⁺ -ATPase in opossum kidney cells. **Kidney International**, v.56, p.627-634, 1999.

LINARDI, A. *et al.* Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta** **1810**, p.895-906, 2011.

LIU, Y. *et al.* Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J. Neurochem**, v. 69, p. 581-593, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T}. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8, 2001.

LUO, X. *et al.* A comparison of different diagnostic criteria of acute kidney injury in critically ill patients. **Critical Care**, v. 18, n. 8, p. 144, 2014.

MAJID, D. S. A. *et al.* Intrarenal Nitric Oxide Activity and Pressure Natriuresis in Anesthetized Dogs. **Hypertension**, v. 32, n.2, p.266-272, 1998.

MAHFOUDH-BOUSSAID, A. *et al.* Effects of trimetazidine on the Akt/eNOS signaling pathway and oxidative stress in a *in vivo* rat model of renal ischemia-reperfusion. **Renal Failure**, v.36, n.9, p.1436-1442, 2014.

MALEK, M.; NEMATBAKHSI, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **J. Renal Inj. Prev.**, v. 4, n.2, p.20-27, 2015.

MASHIACH, E. *et al.* Renal ischemia-reperfusion injury: contribution of nitric oxide and renal blood flow. **Nephron**, v.80, p.458-467, 1998.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability, **Physiological Reviews**, v. 86, n. 1, p. 279–367, 2006.

MENKE, J. *et al.* The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. **Renal transplantation**, v.19, n.4, p.395-400, 2014.

MONICA, F. Z.; BIAN, K.; MURAD, F. The endothelium-dependent nitricoxide-cGMP pathway. **Adv Pharmacol**, v. 77, p.1–27, 2016.

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* e estudo da ação de antagonistas do PAF e da ciclooxigenase no rim perfundido de rato.** 1990. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

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. *et al.* Protective effects of Tribulusterrestris L extract against acute kidney injury induced by reperfusion injury in rats. **Iran J KidneyDis**. v. 8, n. 4, p. 292-8, 2014.

NAJAFI, H.*et al.* Protective effect of Malva sylvestris L. extract in ischemia-reperfusion induced acute kidney and remote liver injury. **Plos One**, v.12, n.11, 2017.

NAKANE, M.; SCHMIDT, H. H. H. W.; MURAD, F. Purification and molecular cloning of guanylyl cyclase activating factor synthase. In Neuroscience meeting. November, 1991.

NILSSON, K. F. *et al.*The novel nitric oxide donor PDNO attenuates ovine ischemia-reperfusioninduced renal failure. **Intensive Care Medicine Experimental**, v.5, p.29, 2017.

NORÕES, T. B. S. Efeitos renais promovidos por polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria córnea*. 2014. 91f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry:introduction.**Chem Ver**, v.99, n.9, p.2201-2203, 1999.

PALIPOCH, S. a review of oxidative stress in acute kidney injury: protective role of medicinal plants-derived antioxidants. **Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.**, v.10, n.4, p.88-93, 2013.

PALLER, M. S.; WEBER, K.; PATTEN, M. Nitricoxide-mediatedrenalepithelialcellinjury during hypoxia and reoxygenation. **Renal Failure**, v.20, n.3, p.459-69, 1998.

PATZAK, A. *et al.* Angiotensin II nitric oxide interaction in glomerular arterioles. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.32, p.410-41, 2005.

PEREIRA, A. C. *et al.* Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. **Nitric Oxide**, v.24, n.31, p.192-198, 2011.

PHILLIPS, L. *et al.*Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury.**J Invest Surg.**, v.22, n.1, p. 46-55, 2009.

PONCE, D.; BALBI, A. Acute kidney injury: risk factors and management challenges in developing countries. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 9, p. 193-200, 2016.

- POTENZA, M. A. *et al.* Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, 94-112, 2009.
- PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Heme-Dependent and Independent Soluble Guanylate Cyclase Activators and Vasodilation. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.56, n. 3, p.229–233, 2010.
- RAIJ; BAYLIS. Glomerular actions of nitric oxide. **Kidney International**, v. 48, p.20-32, 1995.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. (2011) **Farmacologia**. Rio de Janeiro, Elsevier, 7ed.
- RAO, K.*et al.* Protective effect of zinc preconditioning against renal ischemia reperfusion injury is dose dependente. **Plos One**, v.12, n.7, 2017.
- ROSA, S.; ANTONELLI, M.; RONCO, C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemia–reperfusion injury. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 32, p. 241-247, 2017.
- ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer**; v. 55, n.15, p.2303-15, 1985.
- SAMPAIO, T. L. *et al.* Nephroprotective effects of (–)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 23, p.1843-1852, 2016.
- SANCHEZ-NIÑO, M. *et al.* TNF superfamily: a growing saga of kidney injury modulators. **Mediators Inflamm.**, 2010.
- SANTANA, A. P. M. *et al.* The nitric oxide donor cis [Ru(bpy)₂(SO₃)NO](PF₆) increases gastric mucosa protection in mice – Involvement of the soluble guanylate cyclase/KATP pathway. **Nitric oxide**, v. 35, p. 35-42, 2015.
- SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B. Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: Current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, p.279–300, 2010.
- SCHRIER, R. *et al.* Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, n.1, p.5-14, 2004.
- SEGURO, A. C.; MAGALDI, A. J. B.; HELOU, C. M. B.; ZATZ, G. M. R. Processamento de água e eletrólitos pelos túbulos renais. In: ZATZ, R. **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. 1 Ed. São Paulo: ATHENEU, 2012, p.291-313.
- SENBEL, A. M. *et al.* Evaluation of L-arginine on kidney function and vascular reactivity following ischemic injury in rats: protective effects and potencial interactions. **Pharmacological Reports**, v.66, p.976-983, 2014.
- SHARFUDDIN, A. A.; MOLITORIS, B. A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Nature reviews:nephrology**, v.7, p.189-200, 2011.

SIDNEY SHAW, P. W.; ZIMMERMANN, A. Urodilatin, not nitroprussiate, combined with dopamine reverses ischemic acute renal failure. **Kidney International**, v.42, p.1153-1159, 1992.

SILVEIRA, J. A. M. Efeitos renais e alterações morfológicas causados pelo peptídeo natrurético sintético do veneno de *Crotalus durissus cascavella*. 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SRISAWAT, U. *et al.* Losartan and Sodium Nitroprusside Effectively Protect against Renal Impairments after Ischemia and Reperfusion in Rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v.38, n.5, p. 753-762, 2015.

SUN, HAI-JIAN *et al.*. Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of longnon-coding RNAs. **Life Sciences**, v. 167, p. 6-11, 2016.

SUNG, C.C. *et al.* Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 15p., 2013.

SUTTON, T. A. *et al.* Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 285, p.191-198, 2003.

TANAHASHI, M. *et al.* Effects of sodium nitroprusside on renal function and NO-cGMP production in anesthetized dogs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.33, n.3, p.401-8, 1999.

TOLEDO JÚNIOR, J. C. *et al.* Release of NO by a nitrosyl complex upon activation by the mitochondrial reducing power. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.89, p.267–271, 2002.

THOMAS, M. E. *et al.* The definition of acute kidney injury and its use in practice. **Kidney International**, v. 87, p. 62-73, 2014.

ÜLGER, F. *et al.* Evaluation of acute kidney injury (AKI) with RIFLE, AKIN, CK, and KDIGO in critically ill trauma patients. **Eur J Trauma Emerg Surg.**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00068-017-0820-8>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

VAIDYA, V. S., FERGUSON, M. A., BONVENTRE, J. V. Biomarkers of acute kidney injury. **J. Annu Rev Pharmacol Toxicol.**; v.48, p. 463–493, 2008.

VATANABE, I. P. *et al.* Ruthenium Complex Improves the Endothelial Function in Aortic Rings From Hypertensive Rats, **Arq Bras Cardiol.**, v. 109, n. 2, p. 124-131, 2017.

WAECKEL, L. *et al.* Preserved regulation of renal perfusion pressure by small and intermediate conductance K_{Ca} channels in hypertensive mice with or without renal failure. **European Journal of Physiology**, v. 467, n. 4, p.817-831, 2015.

WANG, H. *et al.* Effect of salt intake on afferent arteriolar dilatation: role of connecting tubule glomerular feedback (CTGF). **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 313, p. F1209–F1215, 2017.

WEI, J. *et al.* Role of intratubular pressure during the ischemic phase in acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 312, p. F1158–F1165, 2017.

WIEDERMANN, C. J.; WIEDERMANN, W.; JOANNIDIS, M. Causal relationship between hypoalbuminemia and acute kidney injury. **World journal of nephrology**, v.6, n.4, p.176-187, 2017.

YANARATES, O *et al.* Ameliorative Effects of Proanthocyanidin on Renal Ischemia/Reperfusion Injury. **Renal Failure**, v.30, p.931-938, 2008.

YANG, L. *et al.* Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. **Mol Pharm.**, v. 9, n. 1, p. 29-36, 2012.

YANG, T. *et al.* Dietary nitrate attenuates renal ischemia-reperfusion injuries by modulation of immune responses and reduction of oxidative stress. **Redox Biology**, v. 13, p. 320-330, 2017.

YU, L. *et al.* Insuficiência (Injúria) Renal Aguda. In: ZATZ, R. **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. 1 Ed. São Paulo: ATHENEU, 2012, p.291-313.

YU, L. *et al.* **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 22, p.211-17, 2017.

ZANATTA, C. M. *et al.* Papel do sistema endotelina na nefropatia diabética. **Arq. Brasil. Endocrinol. Metab.**, v.52, n.4, p.581-588, 2008.

ZATZ, R. Filtração glomerular: dinâmica, regulação e avaliação clínica. In: ZATZ, R. **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. 1 Ed. São Paulo: ATHENEU, 2012, p.291-313.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.7, p.481-489, 2003.

ZHANG, W. *et al.* Sirt1 Inhibits Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

ZHANG, Z. *et al.* Protective effect of Salvianolic acid A on ischaemia-reperfusion acute kidney injury in rats through protecting against peritubular capillary endothelium damages. **Phytotherapy Research.**, v.32, p.103–114, 2018.

ZHAO, Y; YANG, Y. Real-time and high-throughput analysis of mitochondrial metabolic states in living cells using genetically encoded NAD/NADH sensors. **Free radical biology and medicine**, v.100, p.43-52, 2016.

ZUK, A.; BONVENTRE, J. V. Acute Kidney Injury. **Annu Rev Med.** 2016, v.14, n.67, p.293–307, 2016.