



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

**EFEITO NEFROPROTETOR DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Lippia sidoides*
EM MODELOS DE LESÃO RENAL AGUDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO**

MARCUS FELIPE BEZERRA DA COSTA

FORTALEZA

2019

MARCUS FELIPE BEZERRA DA COSTA

**EFEITO NEFROPROTETOR DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Lippia sidoides* EM
MODELOS DE LESÃO RENAL AGUDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

**FORTALEZA
2019**

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)

- C874e Costa, Marcus Felipe Bezerra da.
Efeito nefroprotetor do extrato alcoólico de *Lippia sidoides* em modelos de lesão renal aguda por Isquemia/Reperusão / Marcus Felipe Bezerra da Costa. – 2019.
95 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
1. Lesão Renal Aguda. 2. Isquemia. 3. Reperusão. 4. Biomarcadores. 5. Estresse oxidativo. I. Título.
CDD 615.1
-

MARCUS FELIPE BEZERRA DA COSTA

ESTUDO DO EFEITO NEFROPROTETOR DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Lippia
sidoides* EM MODELOS DE LESÃO RENAL AGUDA POR
ISQUEMIA/REPERFUSÃO

Fortaleza, 28 de janeiro de 2019.

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

Profa. Dra. Wellyda Rocha Aguiar Galvão
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus**, pelo dom da vida, por estar sempre à frente de todos os meus passos.

À Prof. Dra. **Alice Maria Costa Martins**, minha orientadora, pela confiança no meu trabalho, pelo apoio constante, paciência e dedicação. Expresso minha imensa admiração pelo exemplo de profissional e pesquisadora. Muito obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por todo o suporte e por promover meu crescimento pessoal e intelectual.

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

À CAPES, pelo suporte financeiro fornecido para a realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais, pela amizade e apoio durante o doutorado, obrigado por sermos uma equipe e por trabalharmos e crescermos juntos.

À banca, pelas considerações e disponibilidade em participar desse momento tão importante.

À minha esposa Tereza, por estar sempre do meu lado me apoiando nas minhas decisões.

À minha família, pelo apoio e incentivo fundamental e, pelo exemplo de vida que representam para mim.

RESUMO

O processo de isquemia/reperfusão (I/R) é comumente relacionado com a lesão renal aguda (LRA) no qual a hipóxia cria condições ideais para a produção de radicais livres após a reoxigenação. A família Verbenaceae tem sido amplamente estudada pela presença de princípios aromáticos encontrados em muitas espécies utilizadas na medicina popular. *Lippia sidoides* pertence à família Verbenaceae, conhecida popularmente como alecrim-pimenta, e tem sido amplamente investigada, especialmente pela presença de princípios voláteis que podem apresentar atividades biológicas, dentre elas a atividade antioxidante. O presente estudo pretende avaliar a atividade nefroprotetora da *Lippia sidoides* contra a injúria causada pelo processo de I/R. Será estudado o extrato alcoólico desta substância. Dessa forma, objetiva-se estudar os possíveis efeitos nefroprotetores da administração oral de extrato alcoólico de *Lippia sidoides* na LRA em modelos de I/R *in vivo* e *in vitro*, estudando biomarcadores inovadores como KIM-1, NGAL e Nefrina. Para tanto, ratos Wistar machos foram submetidos ao procedimento cirúrgico de nefrectomia direita e clampeamento da artéria renal esquerda por 60 min. Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 6), tratados por gavagem com veículo e extrato alcoólico de *Lippia sidoides* (150mg/kg). Amostras de urina foram obtidas por meio de uma gaiola metabólica para avaliação bioquímica e análise de biomarcadores inovadores. Amostras de sangue foram colhidas para realização dos testes bioquímicos tradicionais (creatinina, ureia, albuminúria). O rim esquerdo foi recolhido para avaliação histológica e determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA) e de Glutathiona Reduzida (GSH) e para avaliação histológica. Um modelo *in vitro* de I/R foi realizado em cultura de linhagens de células tubulares renais humanas HK-2 para avaliar a viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT. Além disso, foram realizados os ensaios de respiração celular por citometria de fluxo para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas pelo ensaio do DCFH-DA e a análise do potencial transmembrânico mitocondrial com o corante Rodamina 123.

Palavras-chave: *Lesão Renal Aguda; Isquemia; Reperfusão; Biomarcadores; Estresse oxidativo.*

ABSTRACT

Nephroprotective effect of alcoholic extract of *Lippia sidoides* on acute renal injury models by Ischemia/Reperfusion

Ischemia/reperfusion (I/R) in kidney is commonly related to acute kidney injury (AKI), essentially through oxidative stress. *Lippia sidoides* is an aromatic shrub that grows wild in the northeastern region of Brazil that has anti-inflammatory and anti-oxidative properties. *Lippia sidoides* (LS) protection in renal I/R injury was investigated. Male Wistar rats underwent unilateral nephrectomy and contralateral renal I/R (60min). Rats were divided into four groups: (1) Sham group, (2) LS group (sham-operated rats treated with LS), (3) IR group (rats submitted to ischemia), (4) IR-LS (rats treated with *Lippia sidoides* before ischemia). At 48h after reperfusion, renal function and oxidative stress were assessed and kidneys were removed for analysis to evaluate the protective effect of LS on renal damage induced by I/R. It was also evaluated the protective effect of LS on the renal cell lineage against I/R damage. I/R caused alterations in plasmatic creatinine, urea, creatinine clearance and microalbuminuria. Treatment with *Lippia sidoides* ameliorated all of these parameters. In addition, KIM-1, N-GAL and Nephryn levels enhanced by I/R was also diminished in groups treated with LS. The histological examination showed that LS attenuated the morphological changes caused by I/R, markedly vascular congestion and intratubular deposits of proteinaceous material. Additionally, LS was able to reduce the changes observed in TBARS and GSH levels in kidney tissue. In *in vitro* assay, LS was capable to partially protect the cell lineage against cell damage induced by I/R. *Lippia sidoides* has a nephroprotective effect in kidney against AKI induced by I/R, with antioxidant effect. Moreover, this result seems to be associated to a direct protective effect on tubular epithelia.

Keywords: *Acute Kidney Injury; Ischemia; Reperfusion; Biomarkers; Oxidative stress.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mecanismos envolvidos no dano por isquemia.	13
FIGURA 2	Molécula de injúria renal (KIM-1).	19
FIGURA 3	Constituintes presentes na <i>Lippia sidoides</i> .	24
FIGURA 4	Câmara de anaerobiose.	36
FIGURA 5	Princípio da análise por citometria de fluxo.	37
FIGURA 6	Princípio do método de análise de ERO citoplasmática usando DCF-DA.	39
FIGURA 7	Estrutura da Rodamina.	40
FIGURA 8	Efeito da <i>Lippia sidoides</i> na função renal após LRA por I/R.	44
FIGURA 9	Efeito da <i>Lippia sidoides</i> na taxa de filtração glomerular após LRA por I/R, através do cálculo do <i>Clearance</i> de creatinina.	45
FIGURA 10	Efeito da <i>Lippia sidoides</i> sobre a função tubular.	46
FIGURA 11	Efeito da <i>Lippia sidoides</i> sobre os níveis de KIM-1 e NGAL.	47
FIGURA 12	Fotomicrografia de rim de rato ao final do experimento de Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperfusão.	48
FIGURA 13	Efeito da <i>Lippia sidoides</i> sobre os valores de malondaldeído (MDA) no tecido renal.	49
FIGURA 14	Efeito da <i>Lippia sidoides</i> nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido renal após LRA por I/R.	50
FIGURA 15		51

	Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade da <i>Lippia sidoides</i> em células renais.	
FIGURA 16	Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células renais HK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após a exposição à <i>Lippia sidoides</i> .	52
FIGURA 17	Análise do estresse oxidativo e produção de ERRO citoplasmáticas em células renais HK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando o DCFH-DA.	53
FIGURA 18	Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentando o grupo tratado com <i>Lippia sidoides</i> na concentração de 62,5 µg/mL.	54
FIGURA 19	Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células renais por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.	55
FIGURA 20	Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com <i>Lippia sidoides</i> na concentração de 62,5 µg/mL.	56
FIGURA 21	Expressão relativa de Nefrina no tecido renal.	57
FIGURA 22	Fotografia representativa do ensaio de Western blot, representando a expressão da Nefrina no tecido renal em comparação com a expressão de β-actina no tecido renal expostas à isquemia/reperfusão (I/R).	57

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	5
1.1	Lesão Renal Aguda (LRA)	5
1.2	Isquemia/Reperusão	7
1.3	Estresse Oxidativo	11
1.4	Radicais Livres	12
1.5	Defesas antioxidantes	13
1.6	Novos Biomarcadores da Função Renal	14
1.6.1	A Molécula de Injúria Renal (KIM-1)	14
1.6.2	Gelatinase Neutrófila Associada à Lipocalina (NGAL)	16
1.6.3	Nefrina	17
1.7	Família Verbenaceae e o Gênero <i>Lippia</i>	17
1.8	<i>Lippia sidoides</i>	18
1.9	Justificativa	20
2.	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.1.	Objetivos específicos	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1.	Animais experimentais e substância em estudo	23
3.2.	Procedimento Cirúrgico	23
3.3.	Os Grupos Experimentais	24
3.4.	Avaliação da Função Renal	25
3.5.	Avaliação da Função tubular	26
3.6.	Determinação dos níveis urinários de KIM-1 e NGAL	26
3.7.	Avaliação do Equilíbrio Óxido-Redutor no Tecido Renal	27
3.7.1.	Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)	27
3.7.2	Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	27
3.8.	Cultura de células tubulares renais	28
3.8.1.	Obtenção, Cultivo e Manutenção das Linhagens Celulares	28
3.8.2.	Ensaio de Viabilidade Celular	29
3.9.	Indução de I/R <i>in vitro</i>	30
3.10.	Ensaio de Respiração Celular por Citometria de Fluxo	31
3.11.	Análise da produção de ERO citoplasmáticas	32

3.12.	Avaliação do Potencial Transmembrânico Mitocondrial	34
3.13.	Western Blot	36
3.14.	Análise Estatística	38
4.	RESULTADOS	39
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÃO	60
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão Renal Aguda (LRA)

Os rins são órgãos complexos, com função principalmente reguladora, essenciais para a homeostase do organismo, não apenas porque eliminam produtos indesejáveis do metabolismo, como também por manter constantes o volume extracelular, a concentração extracelular de eletrólito, sobretudo de potássio, a pressão osmótica e o equilíbrio ácido-base do organismo, além de desempenhar um papel fundamental na regulação da pressão arterial e de desempenhar funções endócrinas, como a produção de eritropoietina e da forma ativa da vitamina D (GUYTON & HALL, 1997; BAYNES, 2007; KIDGO, 2015). No entanto, certas complicações patológicas são responsáveis por danificarem a estrutura e diminuírem a atividade funcional dos rins, desencadeando uma condição clínica denominada antes de insuficiência renal aguda, sendo modernamente referida como Lesão Renal Aguda (LRA).

A lesão renal aguda (LRA) pode ser definida como uma perda ou redução da função renal súbita e inesperada, caracterizada pela rápida deterioração das funções tubular e glomerular, sendo relacionada com um rápido declínio na taxa de filtração glomerular (TGF), resultando no acúmulo de substâncias nitrogenadas, por exemplo uréia e creatinina, com ou sem diminuição da diurese (LI et al, 2013; PARIKH; MANSOUR, 2017), assim como o acúmulo de líquidos sob forma de edema, a perda da capacidade de diluir e concentrar a urina e a incapacidade de regular o equilíbrio ácido-base ou de manter o balanço e os níveis plasmáticos de eletrólitos tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e fósforo (MENKE et al, 2014; HARRIS et al, 2015).

Atualmente, as doenças renais representam um problema de saúde pública mundial, devido ao aumento nos números de incidência de Lesão Renal Aguda em pacientes hospitalizados. A LRA está associada com alta morbidade e mortalidade e como parte da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (HORKAN et al, 2015). Estudos indicam que LRA afeta aproximadamente 20% dos pacientes hospitalizados e até 67% das pessoas admitidas em unidade de terapia intensiva, estando entre as disfunções orgânicas mais comuns (HARRIS et al, 2015). Adicionalmente, condições de hipóxia e reoxigenação tecidual, características do processo de isquemia/reperfusão (I/R) são comumente relacionadas com a LRA, principalmente em procedimentos de captação e

conservação de órgãos para transplante renal, tratamento de escolha para insuficiência renal crônica terminal (DITONNO et al, 2015; WENG et al, 2018).

As causas de LRA podem ser de origem pré-renal, renal (intrínseca) e pós-renal (ABUELO, 2007). Falha pré-renal é causada por uma série de eventos que culminam com a diminuição do volume circulante e, portanto, do fluxo sanguíneo renal. É uma resposta funcional de um rim estruturalmente intacto à hipoperfusão, sendo esta a principal causa pré-renal de LRA, contribuindo para a ocorrência de aproximadamente 50% dos casos da doença (DEVARAJAN et al, 2006). As causas mais frequentes são desidratação (vômito, diarreia e febre), uso de diuréticos e insuficiência cardíaca, vasoconstrição intra-renal primária e obstrução reno-vascular. O seu diagnóstico é imprescindível, já que existe reversibilidade nesses casos, em um a dois dias e, se persistir, pode desencadear Necrose Tubular Aguda (BONVENTRE, 2011).

A lesão isquêmica no tecido renal é considerada como do tipo LRA pré-renal, sendo a manutenção prolongada dessa hipoperfusão causadora de lesão e necrose de células tubulares, principalmente nos segmentos renais localizados na medula externa (túbulo proximal e porção espessa da alça de Henle) (KELLUM, 2008; KELLUM et al, 2002). Adicionalmente, o processo isquêmico no rim é associado a um decréscimo da filtração glomerular e diminuição do coeficiente de ultrafiltração renal, além da disfunção tubular secundária à obstrução e dano do epitélio tubular (DITONNO et al, 2015).

LRA pós-renal ocorre por obstrução do trato urinário, causando interrupção do fluxo urinário, como ocorre em condições de hipertrofia prostática e cálculo renal. A importância do diagnóstico nesta patologia é a reversibilidade da insuficiência renal quando se utiliza o tratamento apropriado mais precocemente possível (HUMPHREYS et al, 2005).

A LRA desencadeada por fatores intrínsecos (renal) ao rim é classificada de acordo com o principal local afetado (túbulos, interstício, vasos ou glomérulo) que, depois da pré-renal, é a segunda modalidade mais comum de LRA. Em torno de 70% a 90% dos casos deste tipo de LRA tem como causas comuns o dano tubular de origem isquêmica ou tóxica desencadeando a Necrose Tubular Aguda (NTA). Além disso, caracteriza-se por perda quase total, porém reversível, da função renal, que incluem todas as formas de lesões ao parênquima renal (COSTA et al, 2003; HUMPHREYS et al, 2005).

A causa mais frequente de LRA renal em pacientes hospitalizados é de origem isquêmica (Isquemia/Reperusão) (CHERTOW et al, 2005; LAMEIRE et al, 2005).

1.2. Isquemia/Reperfusão

A isquemia é definida como sendo o fluxo arterial restrito ou insuficiente para manter as funções teciduais normais, por meio da diminuição da oferta de oxigênio e nutrientes tais como glicose, proteínas, vitaminas, dentre outros, constituindo um dos mais importantes problemas enfrentados pela medicina, como o infarto agudo do miocárdio, a oclusão arterial aguda, a insuficiência vascular periférica e no transplante de órgãos (MAXWELL, 1997). A Isquemia pode ser total, quando o fluxo arterial é insuficiente para manter a vida celular, ou parcial, quando mantém a viabilidade, mas com risco de evoluir para morte celular dependendo da nobreza do tecido, do tempo de duração da isquemia, da demanda metabólica dos tecidos atingidos e da ausência de circulação colateral compensatória (BLANTZ et al, 2007). Os rins, quando comparados a outros órgãos, são particularmente mais sensíveis à isquemia. Dessa forma, a oferta limitada de sangue e oxigênio por curtos períodos de tempo pode deflagrar a instalação de lesão renal aguda.

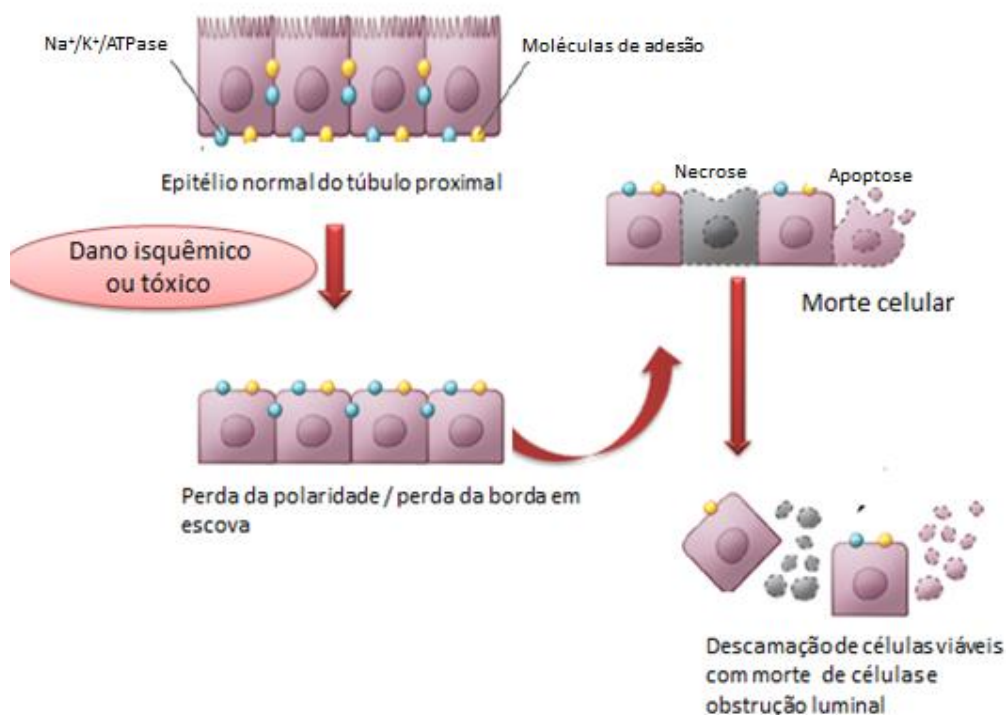
A lesão renal aguda isquêmica envolve mecanismos fisiopatológicos complexos como alterações na hemodinâmica renal, disfunção tubular, lesão de células endoteliais, ativação da resposta inflamatória e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Acontece nas várias intervenções cirúrgicas em que a irrigação sanguínea renal é interrompida. A lesão ocorre durante transplantes renais, intervenções cirúrgicas vasculares na aorta e nas artérias renais e na nefrectomia parcial. Nos transplantes renais, a incidência de disfunção do enxerto, rejeição aguda e nefropatias crônicas estão relacionadas com o grau de lesão isquêmica e aumenta proporcionalmente com o tempo de isquemia. Nas nefrectomias parciais, embora o objetivo seja a preservação da função renal, a lesão da isquemia frequentemente ocorre no parênquima renal remanescente, devido ao clampeamento da artéria renal, realizado com o objetivo de diminuir sangramento e permitir adequada visualização do campo operatório (FOLEY & CHARI, 2007; DESAI et al, 2005). Na clínica, a isquemia renal está frequentemente associada à disfunção de múltiplos órgãos e à sepse (BONVENTRE & WEINBERG, 2003). Segundo a definição *RIFLE*, aproximadamente dois terços dos pacientes evoluem com diagnóstico de LRA em unidades de terapia intensiva e de 4 a 5% desses pacientes recebem suporte de terapias de substituição renal (TSR).

Estudos pré-clínicos em animais reproduzem o quadro de LRA isquêmica por meio de um modelo de isquemia/reperfusão (I/R), onde o fluxo sanguíneo renal é

interrompido com o uso de *clamps* vasculares durante 20 a 60 minutos, seguindo um período de reperfusão (HOSTE et al, 2008; HEYMAN et al, 2010). Estudos experimentais mostraram que tanto a isquemia como o re-estabelecimento do fluxo sanguíneo (reperfusão) nos rins que sofreram esse processo após preservações hipotérmicas, ativam uma complexa sequência de eventos que sustenta a lesão renal e têm um papel central no desenvolvimento da lesão renal aguda (SECIN, 2008). Estudos prévios em modelos animais demonstraram que as consequências da I/R dependem do tempo de isquemia e da intensidade, resultando em diversas alterações bioquímicas e necrose celular. A Necrose Tubular Aguda (NTA) representa a característica mais marcante do dano renal isquêmico, embora seja passível de recuperação completa graças à capacidade de regeneração das células tubulares (TORRAS et al, 1999). Na histologia de tecidos renais, os achados mais evidentes da isquemia são o edema, a vacuolização celular, as alterações na “borda em escova” das células do epitélio tubular renal e o infiltrado de células inflamatórias (BONVENTRE, 2008).

A isquemia leva à hipóxia tecidual e ao metabolismo anaeróbico. A diminuição da fosforilação oxidativa leva ao consumo das reservas de ATP e interrupção de todas as funções celulares dependentes de energia. Logo, o dano relacionado à privação de oxigênio resulta em lesões com rápida perda de polaridade celular e integridade do citoesqueleto, alterações na borda em escova no túbulo proximal (Fig. 01).

Fig. 1. Mecanismos envolvidos no dano por isquemia.



Fonte: Adaptado de BONVENTRE (2008).

O binômio isquemia e reperfusão (I/R) são eventos que muitas vezes levam à IRA por hipóxia tecidual causada pela diminuição do fluxo sanguíneo, formação de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e morte celular programada por apoptose (LAMEIRE et al, 2013; ZHAO et al, 2018). O mecanismo de lesão tecidual mediado por radicais livres, iniciado pelo processo de isquemia, acontece principalmente após a readmissão do oxigênio, ou seja, pela reperfusão.

Em condições não-isquêmicas, a atividade da enzima xantina oxidase é muito baixa. Entretanto, quando o tecido é submetido à isquemia, a atividade dessa enzima aumenta rapidamente devido à formação da xantina desidrogenase e do aumento da produção de hipoxantina formada pela depleção de ATP no processo de isquemia. Logo, a xantina oxidase catalisa a reação que forma xantina e superóxido a partir da hipoxantina em combinação com o oxigênio proveniente da reperfusão. O superóxido, pela ação da enzima SOD (Superóxido Dismutase), forma peróxido de hidrogênio. Quando o peróxido de hidrogênio não é transformado em água pela catalase, forma facilmente o radical livre hidroxila, que é altamente tóxico e reativo. O acúmulo de hipoxantina, decorrente da quebra do ATP, não se traduz na formação do superóxido sem a presença do oxigênio advindo da reperfusão. Logo, a lesão tecidual pelo estresse oxidativo só se estabelece com

a reperfusão (BULKLEY, 1987), causando danos mitocondriais, levando à disruptura da cadeia transportadora de elétrons, impedindo a fosforilação oxidativa e causando a diminuição na síntese de ATP (GRANATA et al, 2015; CHOI et al, 2016).

A conjunção desses fatores oferece as condições necessárias para a instalação da Síndrome de Isquemia-Reperfusão (I/R), que é uma causa importante da disfunção orgânica em transplante renal, além de quadros de choque e em revascularizações, bem como em processos inflamatórios, como pancreatite, colecistite, septicemia, doença de Crohn e outros. (MENKE et al, 2014; HARRIS et al, 2015; KADKHODAEI et al, 2014; DA COSTA et al, 2003).

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

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

Ainda, a série de eventos inflamatórios e vasoconstrictores que acontecem no tecido em hipóxia e após a formação de ERO concomitante à reperfusão ativam mecanismos hemodinâmicos, sobretudo aqueles ativados pelo aparato justaglomerular na mácula densa, ativando as vias de ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, causando um dano glomerular associado a danos na cápsula de Bowmann, injúria em podócito, respostas inflamatórias, pró-oxidantes, isquêmicas e fibróticas, levando à acumulação de matriz mesangial, espessamento da membrana basal glomerular e disfunção endotelial (KWON; HONG; RAMESH, 2009).

Dessa forma, a lesão por isquemia/reperfusão (I/R) pode ser definida como todas as alterações resultantes da interrupção e do re-estabelecimento do fornecimento de oxigênio para tecidos e órgãos, uma vez que a isquemia inicia a lesão por meio da privação da energia necessária para a manutenção do gradiente iônico e da homeostase

celular, enquanto a reperfusão agrava essa lesão exacerbando reações inflamatórias e envolvendo radicais livre de oxigênio.

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

Lesão induzida por I/R é o principal fator etiológico de LRA e responsável por 72% dos casos, afetando significativamente a morbidade e mortalidade dos pacientes em diversas situações clínicas, incluindo transplante renal, medicina intensiva, cirurgias renais, vasculares e sepse (CONG et al, 2012). Além disso, a isquemia está associada com a diminuição da sobrevida do enxerto em pacientes com rins transplantados e com a alta morbidade e mortalidade em pacientes com rins nativos (WEVER et al, 2011).

Existem várias estratégias utilizadas na prática clínica que tem o intuito de prevenir ou, ainda, minimizar o dano renal por I/R e, dentre elas, destaca-se o uso de substâncias antioxidantes (ZHU et al, 2017). Estudos prévios sugerem que substâncias com propriedades antioxidantes que atuam como sequestrantes de radicais livres são eficazes na nefroproteção, pois impedem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam o estresse oxidativo (YOUSEF et al., 2012; ALTENHO et al., 2015).

1.3 Estresse Oxidativo

Organismos pluricelulares, como os mamíferos, desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos de transporte de oxigênio para os tecidos. No meio celular, o oxigênio molecular é difundido até as mitocôndrias, onde tem o papel fundamental de receber os elétrons extraídos dos substratos, por meio de diferentes reações enzimáticas. Estas reações, de oxidação e redução, ocorrem simultaneamente na célula e estão acopladas de tal maneira que possibilitam uma transferência eficiente e controlada de parte da energia armazenada nas ligações químicas dos substratos para o ATP (Adenosina Trifosfato), que quando hidrolisado fornece energia para que ocorram as diversas funções celulares (OLIVEIRA et al, 2004).

Nesse processo, tem-se sempre a formação de espécies intermediárias de oxigênio, com potencial citotóxico, chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs). Na cadeia de transporte de elétrons do processo respiratório, grande parte do oxigênio é reduzido à água, em uma reação catalisada pela enzima citocromo-oxidase, com produção de energia. Entretanto, uma pequena parte (2-5%) deste oxigênio pode sofrer redução univalente sequencial, formando EROs e radicais livres (ALESSIO, 1999).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e os sistemas de defesas antioxidantes (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004), e pode resultar da diminuição dos níveis de antioxidantes, de mutações, afetando a atividade de defesa de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) ou glutatiónaperoxidase (GPx), ou ainda de toxinas que destroem as defesas antioxidantes. Por exemplo, muitos xenobióticos são metabolizados por conjugação com a glutatióna reduzida (GSH). Altas doses podem esgotar o GSH e causar estresse oxidativo mesmo se o próprio xenobiótico não for capaz de gerar espécies reativas. Deficiências na dieta de minerais (Ferro, Zinco, Magnésio, Cobre) e/ou antioxidantes podem causar estresse oxidativo.

O papel dos radicais livres no processo de isquemia e reperfusão, causando lesão tecidual, tem sido extensamente estudado nos rins (SOUTHARD et al, 1991) e, recentemente, o interesse científico voltou-se para uma possível prevenção dessa lesão por agentes farmacológicos, inclusive em pacientes transplantados (FERREIRA et al, 1994).

Radicais livres são estruturas químicas com elétrons desemparelhados, tornando-os muito instáveis, extremamente reativos e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com diversas moléculas integrantes da estrutura celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Radicais livres de oxigênio, assim como os de bromo e de nitrogênio, são exemplos de radicais livres. Espécies reativas incluem não só radicais livres, mas também não radicais que são agentes oxidantes, ou ainda que sejam facilmente convertidos a radicais. Alguns exemplos são:

- Espécie reativa de oxigênio do tipo radical livre: superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}).

- Espécie reativa de nitrogênio do tipo radical livre: óxido nítrico (NO^{\bullet}) e nitrato ($NO_3^{\bullet-}$).

- Espécie reativa de oxigênio não radical livre: peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

- Espécie reativa de nitrogênio não radical livre: peroxinitrato (O_2NOO^-).

1.5 Defesas Antioxidantes

O oxigênio pode causar danos ao organismo, logo, os organismos aeróbios só conseguem sobreviver na sua presença por terem desenvolvido defesas antioxidantes. Normalmente, em indivíduos saudáveis, existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes controlam os níveis de espécies reativas, permitindo que estas desempenhem seu papel dentro do metabolismo normal. Entretanto, há situações que perturbam esse equilíbrio, seja através da diminuição das defesas antioxidantes, seja pelo aumento das espécies reativas ou mesmo da combinação de ambos, resultando no estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As consequências do estresse oxidativo incluem:

- Lipoperoxidação na membrana celular,
- Oxidação de proteínas;
- Dano celular (este envolve dano em diferentes alvos moleculares: lipídio, DNA, proteína, carboidrato, etc);
- Morte celular. O dano oxidativo, principalmente no DNA, pode desencadear a morte celular, por necrose ou apoptose. Porém, a célula pode se recuperar do dano oxidativo por reparação ou pela substituição das moléculas danificadas, ou pode sobreviver mesmo com o dano oxidativo persistente.

Os antioxidantes podem ser produzidos internamente (endógenos) ou adquiridos na dieta (exógenos), onde destacam-se o β -caroteno (vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), alguns metais como cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) (BELZER & SOUTHARD, 1988). HALLIWELL e GUTTERIDGE (1999) definiram um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, retarda significativamente ou impede a oxidação do referido substrato. As principais enzimas antioxidantes são:

- Superóxido Dismutase (SOD): os eritrócitos são capazes de remover o radical superóxido cataliticamente através da enzima SOD contendo cobre e zinco (CuZnSOD).
- Catalases (CAT): catalisam diretamente a reação que transforma o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

- Outras peroxidases: contribuem com o sistema antioxidante por prevenirem o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Incluem o citocromo C peroxidase, o NADH oxidase, e outras inespecíficas como as mieloperoxidases (MPO).

Para proteção celular, o organismo dispõe de um sistema de defesa composto por enzimas que atuam desintoxicando os agentes agressores. Dentre os responsáveis por exercer essa proteção, através de uma ação antioxidante, temos a enzima GSH (PAGLIUSO et al, 2006; KOVACIC et al, 2008).

A GSH é um tripéptido (L- γ -glutamyl- L-cysteinyl - glicina) que está presente na maioria das células. Representa o tiol não proteico mais abundante nas células de mamíferos, considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula e tem como ação participar das reações redox celulares (LEITE et al, 2003; SANTANGELO et al, 2004).

Este peptídeo antioxidante é sintetizado no citoplasma e está presente em concentrações mais elevadas na matriz mitocondrial. Os baixos níveis de GSH podem estar diretamente relacionados com o aumento de EROS, peroxidação lipídica e presença de radicais hidroxilas (SAID, 2011).

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

1.6 Novos Biomarcadores da Função Renal

Lesão induzida por I/R é o principal fator etiológico de LRA e responsável por 72% dos casos, afetando significativamente a morbidade e mortalidade dos pacientes em diversas situações clínicas, incluindo transplante renal, medicina intensiva, cirurgias renais, vasculares e sepse (CONG et al, 2012). Além disso, a isquemia está associada com a diminuição da sobrevida do enxerto em pacientes com rins transplantados e com a alta morbidade e mortalidade em pacientes com rins nativos (WEVER et al., 2011).

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

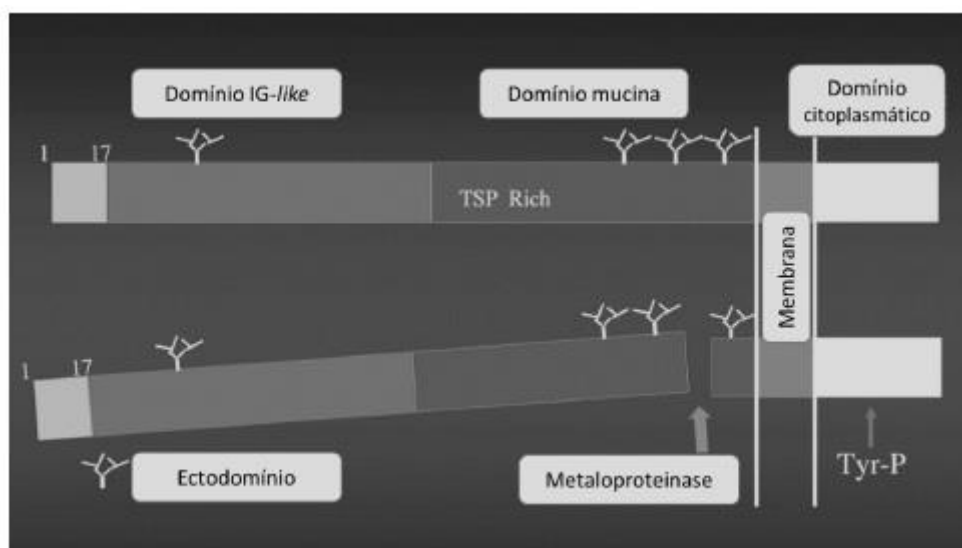
Os estágios iniciais da doença renal são geralmente assintomáticos e exigem testes laboratoriais para detecção. Um biomarcador ideal para o diagnóstico precoce de LRA deve ser endógeno, hidrossolúvel, não-tóxico, não-invasivo, produzido a um ritmo constante, livremente filtrado nos glomérulos, possuir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

1.6.1 A Molécula de Injúria Renal (KIM-1)

A Molécula de Injúria Renal (KIM-1) (Fig. 02) é descrita como um novo biomarcador de lesão renal, principalmente expressa no túbulo proximal. KIM-1 é uma proteína transmembranar tubular, de 104 KDa na sua forma completa, com uma imunoglobulina e domínio de mucina *like*, mais especificamente um receptor de fosfatidilserina, indicando que o KIM-1 pode ter a função de uma molécula de sinalização. O ectodomínio do KIM-1 tem aproximadamente 90 kDa e é clivado por metaloproteinases (clivam proteoglicanos extracelulares), sendo essa a porção do KIM-1 que é liberada no lúmen tubular e depois excretada na urina (SABBISSETTI; BONVENTRE, 2012).

Esta molécula não é detectável em rins normais, mas sua presença é acentuadamente induzida em lesão renal aguda, principalmente como marcador de lesão de túbulo contorcido proximal, no qual as células epiteliais indiferenciadas expressam facilmente essa molécula, sobretudo em eventos de lesão por isquemia (CHARLTON et al, 2014; ICHIMURA et al, 2008).

Fig. 2. Molécula de injúria renal (KIM-1)



Fonte: Adaptado de ICHIMURA et al (2008).

KIM-1 está associada com a ativação de células T e a resposta imune (HAN et al, 2002). Quando cronicamente expressa, resulta na fibrose renal progressiva e insuficiência renal crônica. As principais características favoráveis do KIM-1 urinário como biomarcador renal são: sua expressão em células do túbulo proximal ser maior que em outras células renais e que outros órgãos; o KIM-1 ser indetectável no rim sadio, mas altamente expresso na membrana apical de células tubulares proximais durante a injúria, tornando o KIM-1 um biomarcador específico e 33 confiável para injúrias no túbulo proximal (WASUNG et al., 2015; BONVENTRE, 2014). Portanto, é considerada como um marcador único, com elevada sensibilidade e especificidade, acima de tudo, para diagnóstico de lesão renal precoce (TAN et al., 2015; MOLEDINA & PARIKH, 2018).

Sabe-se que a KIM-1 é um receptor de fosfatidilserina, e como tal é responsável por mediar a fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados, etapa fundamental da morte celular programada. Logo, se for possível detectar a expressão desses receptores em estágios precoces da injúria isquêmica, seria possível estabelecer um prognóstico e tratar a doença, evitando assim complicações resultantes da LRA, inclusive no transplante renal (DE BORST et al., 2007; LAHOUD et al., 2015; HAN et al., 2002).

Han et al (2002) foram os primeiros a mostrar a associação do KIM-1 urinário com a LRA em humanos. Diversos outros estudos em diferentes contextos clínicos de LRA, também evidenciaram associação de KIM-1 urinário com variáveis clínicas de disfunção renal, tempo de hospitalização, necessidade de diálise e morte, além de ótima

especificidade e sensibilidade diagnóstica de KIM-1 em predizer o desenvolvimento de LRA (CARVALHO PEDROSA et al., 2015; KASHANI et al., 2017).

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

1.6.2 Gelatinase Neutrófila Associada à Lipocalina (NGAL)

A Gelatinase Neutrófila Associada à Lipocalina (NGAL) é um dos principais novos biomarcadores renais estudados na literatura. É uma glicoproteína ligada à gelatinase (25 kDa), apresentada como uma cadeia polipeptídica de 178 aminoácidos expressa tanto nos grânulos específicos dos neutrófilos como células epiteliais, incluindo túbulo coletor proximal (PADHY et al, 2014). É membro da família das lipocalinas, caracterizadas pela ligação a pequenas moléculas lipofílicas. O papel endógeno do NGAL ainda não é bem entendido, contudo parece estar envolvido com o transporte de ferro nas células epiteliais tubulares proximais (ARTUNC-ULKUMEN et al, 2015; STEINBACH et al, 2014).

No rim, NGAL apresenta expressão aumentada em células epiteliais tubulares em estágios iniciais da lesão (YUEN et al, 2006). NGAL, por ser uma molécula relativamente pequena, é livremente filtrada pelos glomérulos e então absorvida pelo túbulo proximal. Devido seu baixo peso molecular e sua resistência a degradação, NGAL é prontamente excretada e detectada na urina e é sistematicamente sintetizada em resposta ao dano renal (PADHY et al, 2014; STEINBACH et al, 2014).

Evidências sugerem que o aumento na detecção da NGAL urinária em LRA se dá de maneira precoce, poucas horas após o início da lesão (STEINBACH et al, 2014). Além disso, afirma-se que seus níveis correlacionam-se com a duração da isquemia, uma vez que a dificuldade de identificar a LRA não se restringe apenas à sua abordagem na fase aguda, mas se caracteriza também pela dificuldade em predizer a evolução dos pacientes (SUCHOJAD et al, 2015; PADHY et al, 2014).

Durante a LRA, a expressão da NGAL é induzida no epitélio do néfron distal, resultando em níveis urinários e plasmáticos elevados. Como a reabsorção tubular fica comprometida, isso potencializa a excreção urinária da NGAL (SUCHOJAD et al, 2015; STEINBACH et al, 2014). Tendo em vista a elevada sensibilidade e especificidade do NGAL para injúria renal quando comparada com a creatinina, cada vez mais esse novo biomarcador tem sido estudado como uma ferramenta ideal na estimativa da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) (ARTUNC-ULKUMEN et al, 2015; PADHY et al, 2014).

1.6.3 Nefrina

A lesão precoce de podócito desempenha um papel crucial na patogênese e progressão da nefropatia diabética uma vez que os podócitos são células especializadas no auxílio de formação da barreira endotelial no glomérulo, prevenindo a perda de proteínas. É descrita na literatura o aumento urinário da presença de marcadores derivados de podócitos em pacientes que não apresentam uma albuminúria detectável (LIOUDAKI et al, 2015).

A nefrina é uma proteína transmembrânica pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Exerce um papel importante na fenda de filtração glomerular entre podócitos adjacentes. Sabe-se sua expressão está alterada em modelos experimentais de diabetes, além de estar associada com proteinúria em várias doenças renais humanas (CHOI, 2016; MCCARTHY, 2018).

A inativação do gene de nefrina em camundongos resulta em proteinúria severa e perda de podócitos. Os domínios extracelulares dessa proteína interagem de forma antiparalela entre si em podócitos adjacentes, garantindo a manutenção da permeabilidade glomerular (XUEZHU; CIJIANG, 2015; GERALDES, 2018). Além disso, acredita-se que seja responsável pela regulação do citoesqueleto celular, facilitando a polimerização da actina (WELSH; SALEEM, 2010).

1.7 Família Verbenaceae e o Gênero *Lippia*

A família Verbenaceae compreende cerca de 36 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies catalogados, possuindo distribuição mundial (ATKINS, 2004). O habitat preferencial desta família é o tropical, mas sua distribuição geográfica pode se estender por áreas subtemperadas.

O Brasil destaca-se como o centro de diversidade do gênero, ocorrendo 17 gêneros e 250 espécies com potencial econômico amplamente explorado (LORENZI; MATOS, 2002; SOUZA; LORENZI, 2005).

Segundo Gonzáles (2006), a família Verbenaceae é caracterizada por ervas, arbustos, árvores ou trepadeiras lenhosas, com ramos regulares ou serreados.

Há cerca de 200 espécies de *Lippia*, que podem ser arbustivas, herbáceas ou ainda pequenas árvores, distribuídas amplamente na América do Sul e Central (TERBLANCHÉ & KORNELIUS, 1996; JUDD et al, 2009). O Brasil permanece como um dos principais centros de diversidade das espécies de *Lippia*, com aproximadamente 120 espécies distribuídas no Cerrado e Caatinga, dois importantes biomas brasileiros (GOMES et al, 2011).

Pascual et al. (2001), em uma revisão sobre uso tradicional, química e farmacologia de 52 espécies de *Lippia*, constatou que muitas dessas espécies são economicamente importantes e algumas têm sido bastante utilizadas na medicina tradicional, principalmente em distúrbios respiratórios e gastrointestinais. Dessa forma, espécies pertencentes ao gênero *Lippia* têm sido amplamente investigadas, especialmente pela presença de princípios voláteis que podem apresentar atividade biológica (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986; VALENTIN et al, 1995; PASCUAL et al, 2001; FONTENELLE et al, 2007; FUNARI et al, 2012).

1.8 *Lippia sidoides*

Lippia sidoides pertence à família Verbenaceae, sendo conhecida popularmente como alecrim-pimenta. É uma planta arbustiva, com até 2 m de altura, caducifolia, ereta, com caule quebradiço muito ramificado, encontrada no norte de Minas Gerais e na vegetação do semi-árido nordestino, presente na Caatinga entre Mossoró/RN e Tabuleiro do Norte/CE. Possui folhas aromáticas e picantes, opostas, pecioladas e simples, flores pequenas com pedúnculo longo, branco amareladas, axilares, e dispostas em inflorescências subglobosas a subpiramidais (MATOS & OLIVEIRA, 1998; LORENZI & MATOS, 2007).

O Ministério da Saúde do Brasil desenvolveu um extenso programa de fitoterapia na última década com o objetivo de fornecer acesso a medicamentos fitoterápicos para toda a população. Uma das espécies alvo deste programa é *Lippia sidoides*, uma planta que foi incluída no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira, com base em sua forte atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* (BOTELHO et al, 2007; FONTENELLE et al, 2007), *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BERTINI et al, 2005), devido à presença de terpenóides em sua

composição. É conhecido que os terpenóides são produzidos como parte do sistema de defesa das plantas e tem sido considerada uma fonte promissora de compostos biológicos (ALMEIDA et al, 2006; ARRUDA et al, 2006).

A *Lippia sidoides* tem sido utilizada na medicina tradicional como infusão alcoólica preparada a partir de maceração das folhas em solução alcoólica. A tintura pode ser utilizada em gargarejos, limpeza de ferimentos, lavagens da pele, couro cabeludo, mucosas e também como desodorante dos pés e axilas. As folhas também podem ser utilizadas diretamente para tratamento de dores de garganta e inflamação das gengivas e ainda para a preparação de sabonete líquido (LORENZI & MATOS, 2002; MATOS, 2007).

Estudos já demonstraram atividade biológica da *L. sidoides*, a qual apresentou atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (COSTA et al, 2005); anti-helmintica em ovinos e caprinos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al, 2008; SOUZA et al, 2011); inseticida contra *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishimaniose visceral (MACIEL et al, 2009); tripanocida contra *Tripanossoma cruzi* (BORGES et al, 2012), acaricida contra *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens* (GOMES et al, 2012) e antinflamatória em camundongos (VERAS et al, 2013).

Dentre os constituintes não voláteis presentes em *L. sidoides*, foram identificados flavonóides como taxifolina, quercetina, luteolina; naftoquinonas como isocatalponol, lapachenol e tectol (MACAMBIRA et al, 1986; MATOS, 1998; COSTA et al, 2001; COSTA et al, 2002).

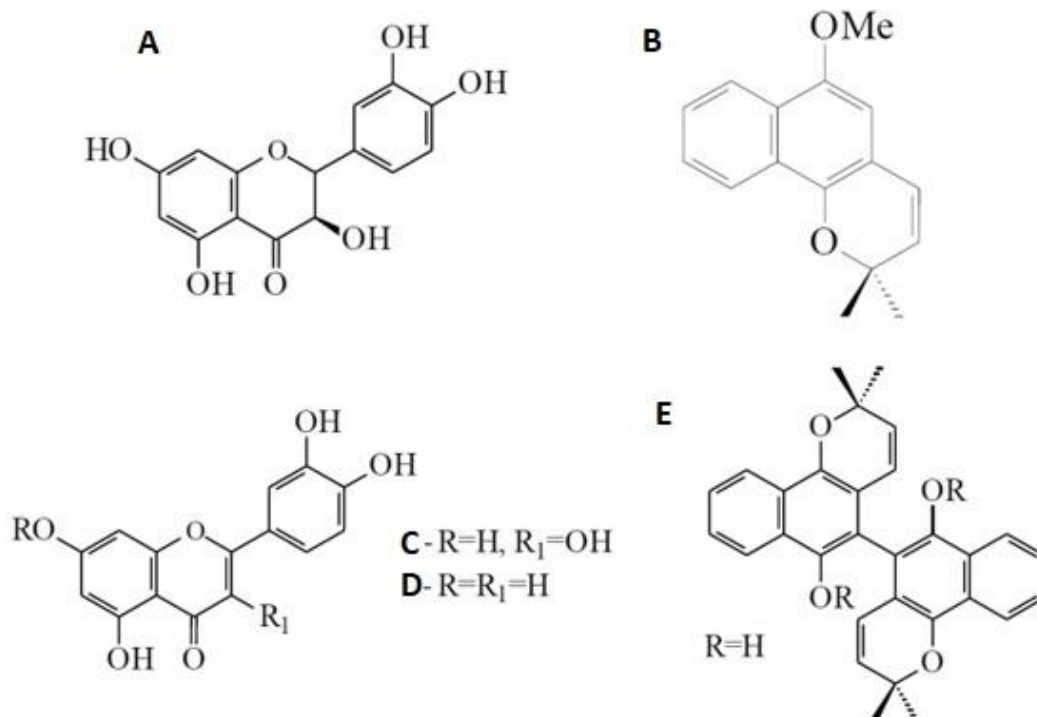


Fig. 3. Constituintes presentes na *Lippia sidoides*. A: Taxifolina; B: Quercetina; C: Luteolina; D: Lapachenol; E: Tectol.

Portanto, a *Lippia sidoides* torna-se importante no estudo da LRA, pois, embora muitas pesquisas busquem isolar os componentes ativos dessas plantas, o efeito de um fitoterápico normalmente se dá pela ação sinérgica entre os compostos (MACIEL et al, 2002). Por isso, diferente de drogas convencionais, a medicina natural consiste em uma complexa preparação farmacêutica que pode ser administrada na forma de extrato (CAPASSO et al, 2003).

Nesse contexto, produtos naturais antioxidantes e antiinflamatórios têm sido investigados para tratar e retardar a doença renal (DA COSTA et al, 2015; SAMPAIO, et al, 2016; LU et al, 2015; SARSHAR et al, 2017; TAO et al, 2018).

1.9 Justificativa

A I/R é um fenômeno complexo, que contribui para a mortalidade e morbidade, assim como é um fator predisponente para o estabelecimento da LRA, sendo uma das disfunções orgânicas mais comuns (HARRIS et al., 2015).

Várias estratégias e recursos são utilizados pelas células para prevenir ou diminuir a injúria celular causada pela I/R através de estresse oxidativo (DITONNO et al, 2014). Esses mecanismos de defesa antioxidantes celulares têm por finalidade prevenir a formação de radicais livres, converter espécies oxidantes tóxicas em menos tóxicas, preservar a compartimentalização celular, que é vital para as estruturas celulares, ou promover o reparo do dano causado pelos radicais livres (KADKHODAEI et al., 2014). Estudos recentes têm identificado uma variedade de substâncias incluindo a eritropoietina (HU et al, 2012) e a glutamina (ESPOSITO et al, 2011) para o tratamento do dano renal causado por I/R. Entretanto, a eficácia desses tratamentos existentes para esse tipo de lesão ainda é limitada e poucos protetores renais tem tido sucesso na aplicação clínica.

O estudo de estratégias para diagnóstico precoce e acompanhamento da progressão da lesão renal, utilizando biomarcadores cada vez mais sensíveis e específicos, como ressaltado neste trabalho (KIM-1, NGAL e Nefrina), favorece o entendimento da patologia em si, além de auxiliar no acompanhamento do processo de melhora e cura, contribuindo, logo, para o entendimento do mecanismo de ação e da potência no estudo de novas moléculas com potencial terapêutico.

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

Adicionalmente, nosso grupo já demonstrou anteriormente que substâncias antioxidantes, como o Bisabolol e a própolis vermelha possuem um potencial nefroprotetor, agindo sobre a LRA e alterando biomarcadores bioquímicos, moleculares e histopatológicos (DA COSTA et al, 2015; SAMPAIO et al, 2016)

Dessa forma, ratifica-se a importância do estudo utilizando substâncias como a *Lippia sidoides*, a qual possui diversificadas atividades biológicas, sobretudo um potencial antioxidante (FABRI et al, 2011), o qual se apresenta como estratégia de defesa ao modelo de LRA por I/R. Adicionalmente, a bioprospecção de substâncias isoladas de plantas brasileiras ratifica a importância deste trabalho, tendo em vista que cada vez mais a comunidade científica tem buscado alternativas terapêuticas e farmacológicas provenientes da biodiversidade local.

O modelo de LRA por Isquemia/Reperusão como objeto de estudo é extremamente valioso, pois proporciona um processo de indução de dano tubular, além de desencadear efeitos agudos sobre a função renal em investigação.

Além disso, considerando que a maior parte dos trabalhos científicos sobre esta espécie evidencia as atividades biológicas de seu óleo essencial, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos farmacológicos do extrato etanólico de *L. sidoides*, pois esses extratos são de fácil preparação, baixos custos e não necessitam de equipamentos específicos, a fim de obter novas informações que permitam diferentes aplicações para essa espécie.

Portanto, o presente trabalho estuda o mecanismo de nefroproteção mediada pelo extrato alcoólico de *Lippia sidoides* em modelo animal de indução de LRA por I/R e em células renais tubulares após indução de lesão por I/R *in vitro*, analisando a participação de EROs na lesão e recuperação celular.

Nesse contexto, o presente estudo vem na tentativa de demonstrar que algumas estratégias farmacológicas, quando adotadas, poderiam proporcionar benefício para a problemática em questão, tendo como ênfase os agentes fitoterápicos antioxidantes, que têm se consolidado nessa procura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos nefroprotetores do extrato alcoólico da *Lippia sidoides* na Lesão Renal Aguda (LRA) em modelos de Isquemia/Reperusão (I/R) *in vivo* e *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos nefroprotetores do extrato alcoólico da *Lippia sidoides* na LRA por I/R *in vivo* através da aferição dos parâmetros bioquímicos tradicionais e dos novos biomarcadores.
- Avaliar o efeito do extrato alcoólico da *Lippia sidoides* em células tubulares submetidas à Isquemia/Reperusão.
- Estudar os efeitos do extrato alcoólico da *Lippia sidoides* no contexto do equilíbrio redox através de ensaios de avaliação do estresse oxidativo no tecido renal e da avaliação da respiração celular por ensaios de citometria de fluxo.
- Verificar as possíveis alterações histológicas na presença do extrato alcoólico de *Lippia sidoides* em ratos submetidos ou não à LRA por Isquemia/Reperusão.
- Verificar o efeito do extrato alcoólico de *Lippia sidoides* na expressão da Nefrina após a LRA induzida por Isquemia/Reperusão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais Experimentais e Substância em Estudo

Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes éticas. Ratos Wistar machos com aproximadamente 200g foram mantidos sob condições controladas (25 ± 2 °C, ciclo claro-escuro de 12 horas). Comida e água foram fornecidas *ad libitum*.

O extrato alcoólico da *Lippia sidoides* foi obtido no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos, através do programa Farmácias Vivas da Universidade Federal do Ceará, coordenado pela Professora Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira.

Para os experimentos *in vivo* e *in vitro*, o extrato alcoólico foi filtrado e então evaporado utilizando um evaporador à vácuo. As amostras de extrato em pó de *Lippia sidoides* foram então mantidas em geladeira (20°C). A forma seca foi ressuspensa em água contendo Tween na concentração de 2% antes da administração oral de acordo com a dosagem definida (150 mg/kg) (DA COSTA et al, 2015, SAMPAIO et al, 2016).

Esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará sob protocolo n° 106/2017.

3.2. Procedimento cirúrgico

Para indução da I/R renal *in vivo*, foi realizado um protocolo de acordo como descrito na literatura (DA COSTA et al, 2015; NAJAFI et al, 2014). Resumidamente, durante a cirurgia, os animais foram colocados em uma manta térmica aquecida, para manter a temperatura controlada de aproximadamente 36°C. Uma laparotomia abdominal pela linha média foi realizada, e ambos os rins foram localizados visualmente. Para induzir a isquemia, foi feita uma oclusão renal unilateral no rim esquerdo por 60min, por clampeamento da artéria renal, onde foi confirmada a isquemia pela mudança de cor no rim. No rim direito foi realizada uma nefrectomia, logo após o início da isquemia. Após o término da isquemia, os animais foram imediatamente submetidos à sutura da incisão abdominal feito em duas camadas, músculo e pele, com fio de polipropileno 4.0 (PolipropyPoint®). O período de reperfusão foi iniciado após o tempo de isquemia por liberação da circulação pela artéria renal, e durou por 48h. O tempo escolhido para I/R foi o capaz de causar disfunção renal significativa e lesão do rim do animal, além de

produzir uma característica patofisiológica reconhecida de lesão renal aguda (CHATTERJEE et al, 2000).

Durante as últimas 24 horas da reperfusão, as amostras de urina foram obtidas. No final deste período, os animais foram novamente anestesiados para o recolhimento do rim esquerdo como subsídio para análise histológica e avaliações adicionais. Amostras de sangue (2mL) foram colhidas após o recolhimento do tecido renal, e foram centrifugadas (3500 rpm por 10 minutos) para obtenção do plasma, conforme descrição a seguir.

3.3. Os grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6), onde todos foram tratados por gavagem oral, uma vez ao dia, por 3 dias antes da realização do processo cirúrgico (I/R) com o extrato alcoólico de *Lippia sidoides*, o qual foi ressuspendida em água contendo Tween na concentração de 2% antes da administração oral de acordo com a dosagem definida (150 mg/kg) (DA COSTA et al, 2015, SAMPAIO et al, 2016).

- **SHAM + veículo (SHAM):** animais foram submetidos à administração oral de veículo (água + Tween 2%) por três dias. No quarto dia, foi administrada a última dose, e então, 1h depois, os animais foram sujeitos à laparotomia sem isquemia e sem nefrectomia.

- **SHAM + *Lippia sidoides* (GLS):** animais foram submetidos à administração oral (150mg/Kg) de Extrato Alcoólico de *Lippia sidoides* por três dias. No quarto dia, foi administrada a última dose, e então, os animais foram sujeitos à laparotomia sem isquemia e sem nefrectomia.

- **I/R + veículo (GIR):** animais foram submetidos à administração oral de veículo por três dias. No quarto dia, foi administrada a última dose, e então, 1h depois, os animais foram sujeitos à laparotomia com isquemia e nefrectomia.

- **I/R + *Lippia sidoides* (GIRLS):** animais foram submetidos à administração oral de Extrato Alcoólico de *Lippia sidoides* (150mg/kg/dia) por três dias. No quarto dia, foi administrada a última dose, e então, 1h depois, os animais foram sujeitos à laparotomia com isquemia e nefrectomia.

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

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Administração através de gavagem
Sham	Falso-Operado	Veículo (água + tween 25)
Sham + LS (GLS)	Falso Operado	<i>Lippia sidoides</i> (150 mg/kg)
I/R (GIR)	I/R	Veículo (água + tween 2%)
I/R + LS (GIRLS)	I/R	<i>Lippia sidoides</i> (150 mg/kg)

Legenda: I/R = Isquemia/Reperusão; LS = *Lippia sidoides*;

O tempo de reperusão nos grupos que sofreram isquemia (GIR e GLSIR) foi de 48h. Os grupos SHAM e GLS, uma vez que não há isquemia/reperusão, simularam as 48h de reperusão. Os animais ficaram em gaiolas metabólicas nas últimas 24h do experimento, por onde foi coletada a urina de 24h. Logo após a obtenção do volume urinário, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e, em seguida, foi conduzida uma laparotomia e dissecação da veia cava abdominal, por onde foi coletado o sangue através da punção deste vaso. As amostras sanguíneas foram coletadas em microtúbulos (2mL) contendo 20 μ L de heparina a 10% e, posteriormente, centrifugadas a 3.500 rpm a uma temperatura de 4 °C durante 15 minutos. As amostras de plasma obtidas foram armazenadas em um freezer a -80°C para dosagens bioquímicas. Seguidamente à coleta sanguínea, foi coletado o rim que sofreu a lesão por Isquemia/Reperusão, sendo cortado cuidadosamente em duas partes, sendo que uma parte foi armazenado em formol tamponado 10% para o posterior estudo histopatológico. A outra metade do tecido foi mantido no gelo e rapidamente conduzido a -80°C para serem utilizados nos protocolos do dano oxidativo.

3.4. Avaliação da função renal

As amostras de sangue obtidas através da coleta nos animais foram centrifugadas (3500 rpm durante 10 minutos) para obtenção de plasma. Os parâmetros bioquímicos foram aferidos utilizando um equipamento de análise automático (Roche Diagnostics Limited, Rotkreuz Suíça). Foram determinados níveis de albumina urinária, creatinina plasmática e urinária e ureia plasmática e urinária.

O *Clearance* de creatinina (Clcr) foi calculado para determinar a função renal dos animais, calculando-se a taxa de filtração glomerular (TFG). Este foi utilizado para determinar a função renal dos animais e calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Clcreat} = \text{CU} \times \text{V} / \text{CP}$$

Sendo:

CU = creatinina urinária, em mg/dL;

V = volume urinário das últimas 24h, em mL;

CP = creatinina plasmática, em mg/dL;

Os valores do Clcr foram expressos em **ml/min**.

3.5. Avaliação da Função Tubular

A fração excretada de sódio (FENa^+) e a fração excretada de potássio (FEK^+) consistem nos percentis de Na^+ e K^+ filtrados e excretados na urina. Existe uma variação muito grande no manejo iônico destes durante os quadros de Lesão Renal Aguda.

A fração de excreção de sódio (FENa^+) e (FEK^+) foi calculada a partir da mensuração de sódio e potássio urinário e plasmático por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil) pelo método eletrodo íon seletivo. Foi utilizado como diluente o Snap Park® (Roche, Brasil) para preparo da solução padrão e solução para mensuração de eletrólitos urinária. O aparelho foi calibrado usando padrão contendo 140 mEq/l de Na^+ e 5 mEq/l de K^+ . O controle para mensuração das amostras foi realizado com Isetrol® (Roche, Brasil).

Com as concentrações plasmáticas e urinárias de sódio e potássio foram determinadas as frações de excreção de Na^+ e K^+ (FENa^+ , FEK^+). Estes parâmetros servem para analisar do manejo renal de tais íons.

O cálculo utiliza as seguintes fórmulas:

$$\text{FENa}^+ = \frac{\text{Clearance Na}^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

$$FEK^+ = \frac{\text{Clearance } K^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

Os valores foram expressos em %.

3.6. Determinação dos níveis urinários de KIM-1 e NGAL

Os níveis de KIM-1 e NGAL foram determinados na urina usando um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) comercial (R & D Systems, Inc - Cat. DY1750, Minneapolis, MN). Poços da placa de ELISA foram revestidos diluindo o anticorpo de captura (72 µg/mL) para uma concentração de trabalho de 0,4 µg/mL em PBS, obtendo-se o volume final de 100 µL em cada poço. A placa foi selada e incubada *overnight* à temperatura ambiente. Cada placa foi lavada duas vezes com 400 µL de tampão de lavagem (Tween-20 a 0,05% em PBS). As placas foram bloqueadas pela adição de 300 µL de BSA a 1% em PBS durante 2 horas. 100 µL de padrão de KIM-1 recombinante humano (nas concentrações de 0 a 20 ng / mL) e urina foram adicionados aos seus respectivos poços e colocados temperatura ambiente durante 2 horas. A placa foi lavada novamente e 100 µL de anticorpo biotilado caprino anti-KIM-1 (400 ng/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 2 horas. O passo de lavagem foi repetido e, após, 100 µL de estreptavidina-HRP foram adicionados a cada poço e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após nova lavagem, 100 µL da solução de substrato foram adicionados a todos os poços e incubados à temperatura ambiente durante 7 minutos. A reação foi parada adicionando 50 µL de solução de paragem a todos os poços. A absorbância foi medida a 450 nm com uma correção de absorbância a 540 nm. A concentração de KIM-1 e NGAL foi calculada com base na curva padrão de cada marcador e expressa em termos absolutos em ng/mL de sobrenadante.

3.7. Avaliação do Equilíbrio Óxido-Redutor no Tecido Renal

3.7.1. Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) são representadas principalmente pelo Malondialdeído (MDA)

e formadas como um subproduto da peroxidação lipídica (KIL *et al.*, 2014). A concentração de MDA no tecido renal foi determinada como um indicador da peroxidação lipídica, tal como descrito anteriormente, utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (MIHARA *et al.*, 1980) em amostras de homogenato de tecido renal.

Animais foram sacrificados 48h após reperfusão, e o rim esquerdo foi removido e uma parte do tecido foi homogeneizado com 1,15% KCL para fazer um homogenato a 10%. Em seguida, 3ml de solução de ácido fosfórico 1% e 1ml de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6% foram adicionados a 0,5ml do homogenato em um tubo. A mistura foi aquecida em água a ponto de ebulição por 45min. Em seguida, 4ml de solução de *n*-butanol foi adicionado à mistura vigorosamente. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 532 e 520 nm. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido.

3.7.2. Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

A determinação da concentração da GSH, uma enzima antioxidante hidrossolúvel, baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412nm, conforme descrito por SEDLAK & LINDSAY (1968). Preparou-se o homogenato do rim esquerdo a 10% em EDTA (0,02 M). Em seguida, foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 400 µL do sobrenadante e adicionou-se 800 µL de tampão Tris-HCl (0,4M), pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB (0,01 M). Após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm, através de um espectrofotômetro. A concentração da Glutathiona Reduzida foi expressa em nanogramas de GSH por grama de tecido.

3.8. Cultura de células tubulares renais

3.8.1. Obtenção, Cultivo e Manutenção das Linhagens Celulares

Foram utilizadas linhagens celulares imortalizadas nos ensaios envolvendo cultivo de células - células HK-2 - conforme descrito a seguir. As células HK-2 são células de túbulos proximais de rins humanos derivadas de rins normais e imortalizadas

pela transfecção com o papiloma vírus HPV-16, mantendo as características de receptores e canais tubulares e a possibilidade de se correlacionar os efeitos obtidos nos ensaios *in vitro* com possíveis efeitos em humanos, sendo utilizadas com frequência por reproduzirem as características fisiológicas de reabsorção e recuperação dos túbulos renais (RYAN et al, 1994).

As linhagens celulares foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e foram mantidas em cultivo no Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. As células foram cultivadas em condições ideais em garrafas plásticas estéreis de 75 cm² em estufa de CO₂, mantendo as culturas a 37 °C e 5% de CO₂. O crescimento das células foi acompanhado diariamente através da observação por microscópio invertido, para verificação da densidade celular na monocamada. Após atingirem confluência, o meio foi removido, as células foram lavadas com 5 mL de PBS estéril e deslocadas com 1 mL de tripsina/EDTA (0,25 %) por 5 a 10 minutos a 37°C. Alíquotas das células deslocadas foram transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM.

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

3.8.2. Ensaio de Viabilidade Celular

Para avaliação da citotoxicidade da *Lippa sidoides* nas linhagens estudadas, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT. O MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) é um sal de tetrazólio de cor amarela que, quando em contato com células viáveis, é internalizado por endocitose e clivado por desidrogenases do citoplasmáticas e mitocondriais, produzindo um sal de cor arroxeada chamado formazan (MOSMANN, 1983). Em seguida, os cristais de formazan são excitados e podem ser solubilizados pela adição de reagentes como DMSO ou dodecilsulfato de sódio (SDS). Células não-viáveis perdem a capacidade metabólica de internalizar e clivar o MTT. A concentração de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e é medida pela leitura da absorbância a 570 nm.

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

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

3.9. Indução de I/R *in vitro*

A lesão *in vitro* por hipóxia/reoxigenação foi induzida pelo método da câmara anaeróbica, o qual visa mimetizar danos associados a eventos de I/R (GINO et al, 2014). As células foram plaqueadas em placas estéreis de plástico, e mantidas *overnight*, para permitir adesão e proliferação celular. Para a indução da isquemia, o meio de cultura normal foi substituído por DMEM privado de glicose, piruvato e SBF e em seguida as placas foram incubadas numa câmara anaeróbica por 24 horas. A reperfusão foi realizada após o período na câmara, através da adição de um meio de cultura completo e retorno das células à atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 3 horas.

Em seguida, as placas foram tratadas com *Lippia sidoides* em várias concentrações por um período de 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em paralelo nas células em condições normais de aerobiose a fim de detectar eventuais concentrações tóxicas das substâncias em estudo, além de efeitos diretos sobre as linhagens celulares.

Fig. 4. Câmara de anaerobiose.



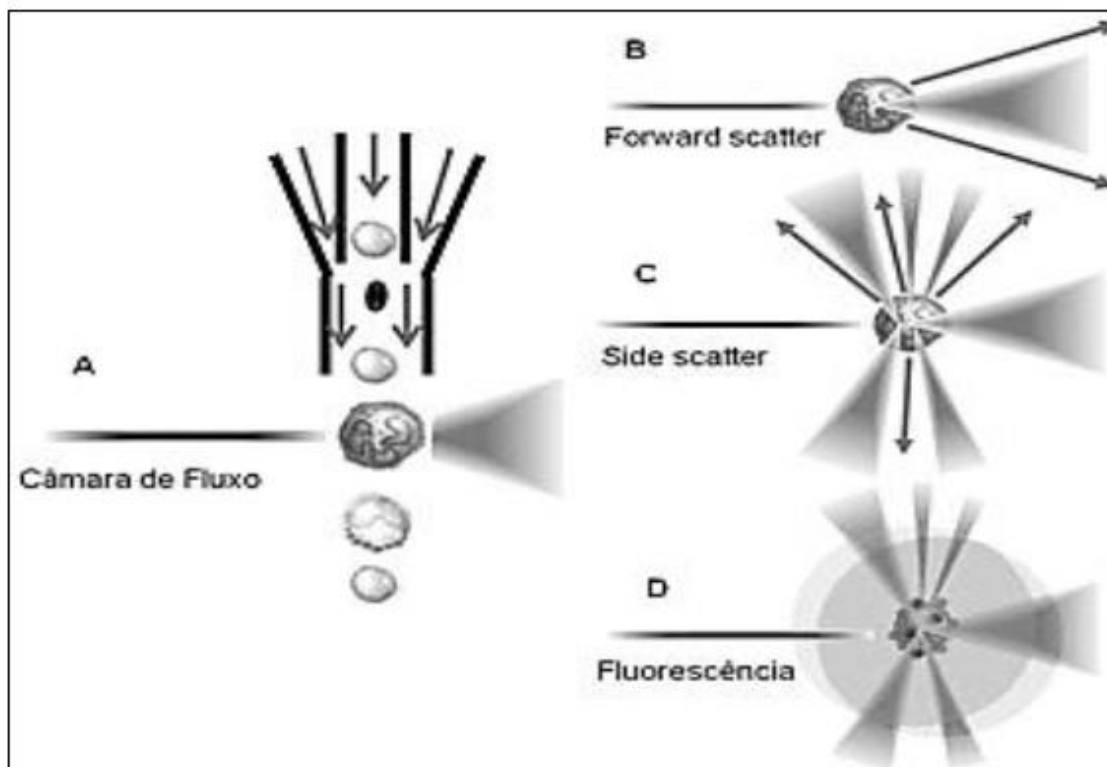
Fonte:<https://www.lojanetlab.com.br/plasticos/jarra-de-anaerobiose/jarra-de-anaerobiose-em-pvc-rigido>.

3.10. Ensaios de Respiração Celular por Citometria de Fluxo

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

detectada em leitores de fluorescência (FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5) (HAN et al, 2015). Alguns destes procedimentos podem ser vistos na Fig. 05.

Fig. 5. Princípio da análise por citometria de fluxo.



Fonte: Adaptado de HAN et al (2015).

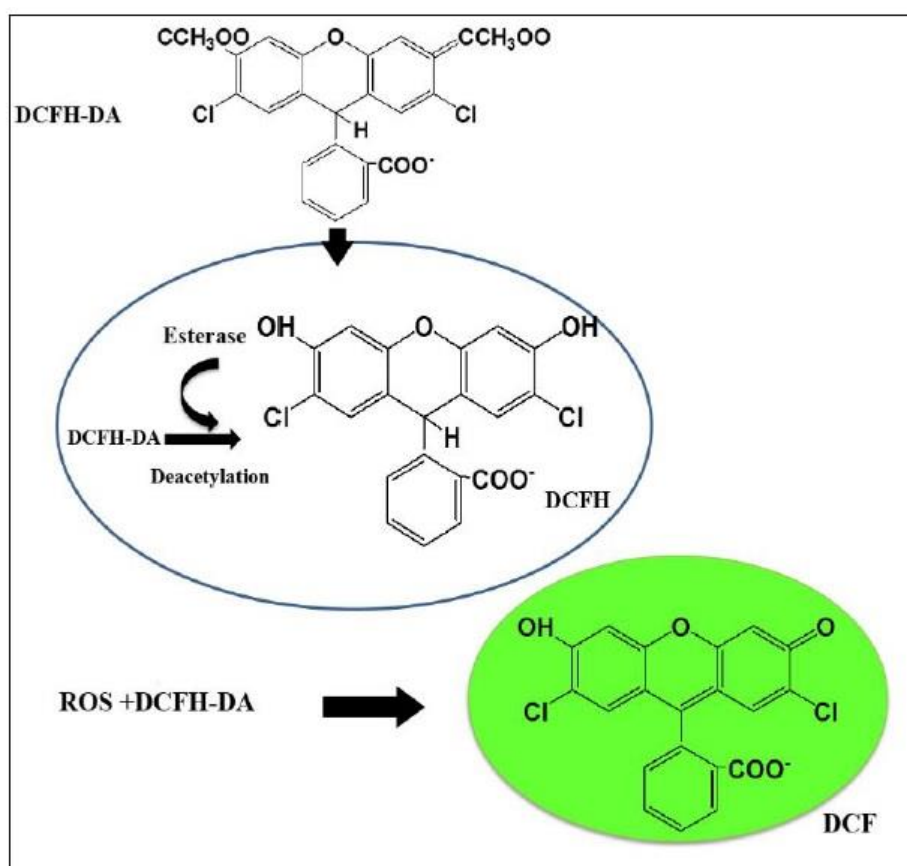
Previamente às análises por citometria de fluxo, células HK2 cultivadas em placas de 24 poços, em condições normais de aerobiose e/ou submetidas ao procedimento de I/R tratadas ou não com *Lippia sidoides* foram lavadas com PBS, tripsinizadas, deslocadas. A fim de permitir a marcação fluorescente, o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

3.11. Análise da produção de ERO citoplasmáticas.

O princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, provendo um

substrato oxidável (DCFH), como representado na figura 06. O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com excitação em 488 nm e detecção em 515-545 nm pelo sensor FL1. A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células (ARANDA et al, 2013).

Fig. 6. Princípio do método de análise de ERO citoplasmática usando DCFH-DA.



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

Para a incorporação do DCFH no interior das células, 5 μ L (concentração final 20 μ M) da solução estoque foram adicionados aos poços da placa de 24 poços contendo as células em cultivo 3 horas após o tratamento com *Lippia sidoides*, como

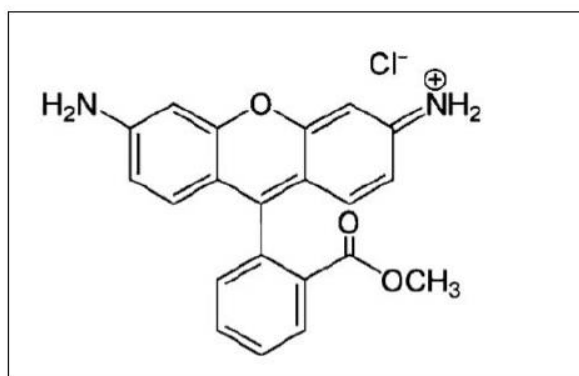
previamente descrito (ARANDA et al, 2013). Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde.

3.12. Avaliação do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), específico para a marcação mitocondrial em células vivas (Fig. 07). 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 pela redução da intensidade de fluorescência vermelha (FL₂).

Após o tratamento dos grupos com *Lippia sidoides*, as células foram coletadas, lavadas com PBS e incubadas com Rho123 (10 µg/mL) por 30 minutos. Por fim, foram lavadas 3 vezes com PBS e analisadas por citometria de fluxo para verificação da intensidade de fluorescência vermelha com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm (O'CONNOR et al, 1998).

Fig. 7. Estrutura da Rodamina.



Fonte: JOHNSON et al. (1980).

Os resultados do ensaio do DCFH-DA e da Rodamina foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, a qual foi obtida a partir dos valores absolutos de

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

3.13. Western Blot

A identificação de proteínas em amostras é, com frequência, realizada através da técnica do Western blot. A técnica se baseia em duas etapas, cuja primeira é a separação dos diferentes tipos de proteínas em uma cuba eletroforética, de acordo com seus pesos moleculares. A segunda etapa se caracteriza pela transferência das proteínas para uma membrana, permitindo a identificação destas utilizando-se um anticorpo que reconheça o epítopo da proteína de interesse, sendo, portanto, este um imunoensaio.

Dessa forma, será utilizada a técnica do Western Blot visando analisar alterações na expressão de Nefrina no tecido renal em condições normais e após passarem pelo modelo de I/R. Foi avaliado também se o tratamento com *Lippia sidoides* é capaz de gerar alguma interferência no nível de expressão dessa enzima.

Para tanto, foi feito um homogenato dos rins coletados e congelados, utilizando tampão RIPA (TrisHCl 50 mM; pH 7,4; NaCl 150 mM; deoxicolato de sódio 0,25%; NaF 10 µg/mL e EDTA 1 mM) gelado adicionado coquetel inibidor de protease (1:100 de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 2mM e o ortovanadato de sódio, um inibidor de fosfatase, a 1 mM). Ao final, o material foi centrifugado a 8000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante separado e conservado a -20°C para posterior quantificação das proteínas totais.

A quantificação de proteínas totais dos homogenatos foi realizada por método colorimétrico (LOWRY et al, 1951) segundo metodologia do fabricante do kit comercial (*BioRad Laboratories*). Para calibração do método foi confeccionada uma curva padrão de proteína utilizando a albumina sérica bovina (BSA).

Precedendo os experimentos, os volumes das amostras foram ajustados à concentração de 1 mg de proteína/mL ou normalizadas pelo nível de creatinina urinária e desnaturadas em banho a 96°C em tampão de amostra contendo SDS (dodecilsulfato de sódio) por 5 minutos para posterior separação por eletroforese de proteínas.

Para a separação das proteínas por peso molecular, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em sistema vertical BioRad Laboratories mini-PROTEAN® Tetra Cell, conforme padronizado anteriormente (TOWBIN et al, 1979). O

gel a ser utilizado apresenta a seguinte composição: 10% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 (BioRad Laboratories). Foi adicionado acima deste gel, um “*stacking gel*”, ou gel de empacotamento com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

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

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

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

As membranas foram novamente submetidas a 5 lavagens com TBST 1x sob agitação moderada (5 minutos/lavagem) e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com enzima peroxidase (Abcam, Cambridge, UK), diluído na proporção de 1:3000 em BSA 5% em TBST. Para detecção por quimioluminescência, foi utilizado o reagente Clarity™ ECL (BioRad Laboratories). O reagente foi incubado com as membranas no escuro por 5 minutos e a aquisição de imagens foi realizada no equipamento ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad Laboratories). Para análise das

imagens foi utilizado o Software Image Lab™ Software versão 5.1 (BioRad Laboratories).

3.14. Análise Histológica

Após 48h de reperfusão, o rim esquerdo foi removido e colocado em uma solução de formol tamponado 10%. Após 24h, o rim foi transferido para solução alcoólica 70% e levado para análise histológica. O tecido renal foi fixado com solução formalina 10%, e depois incorporado com parafina. Seções de corte de 5µm foram então corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Uma análise qualitativa foi realizada de acordo com padrões morfológicos básicos típicos de lesões tubulares proximais.

3.14. Análise estatística

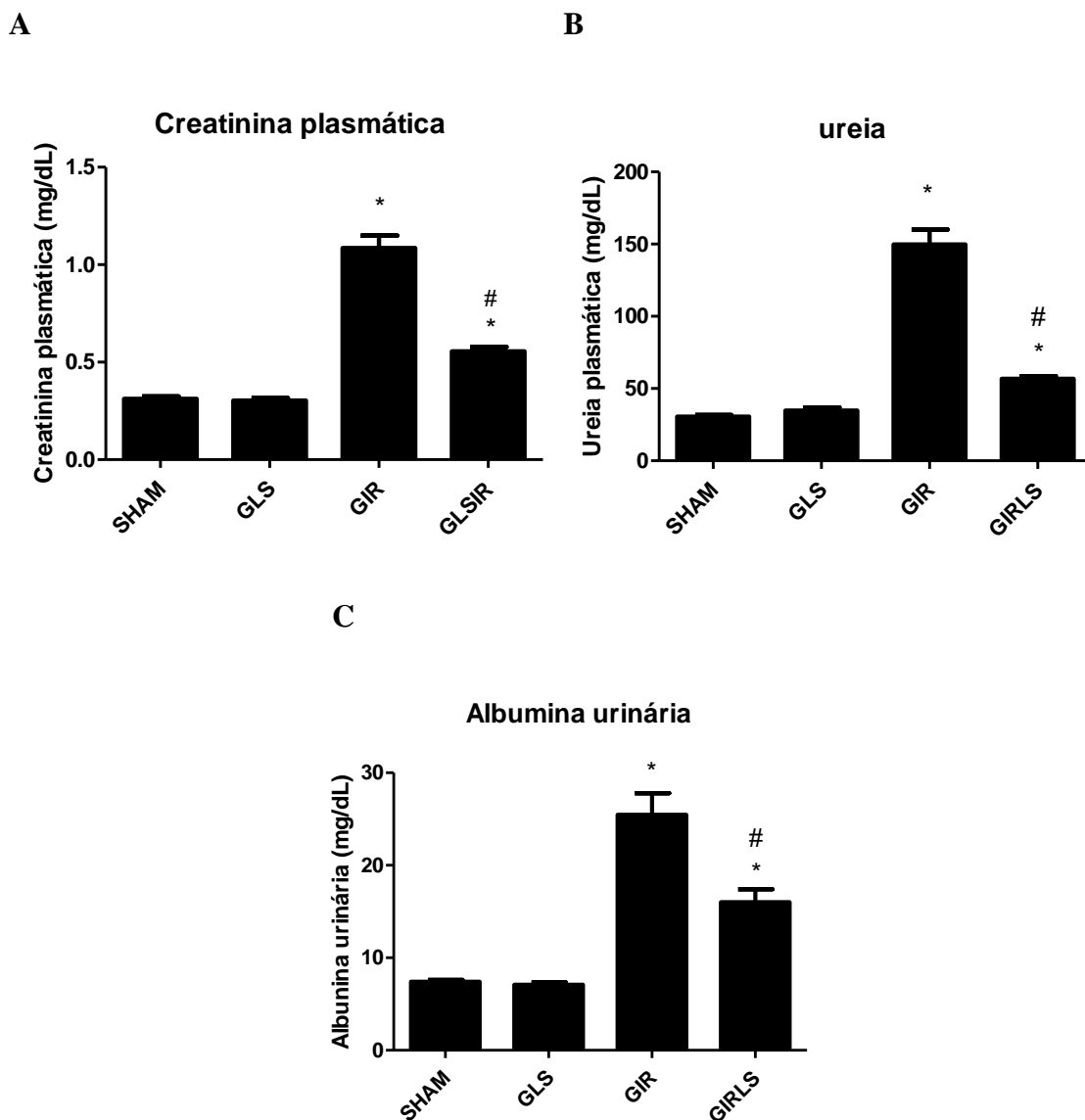
Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido pelo post-test de Bonferroni. Como critério de significância foi aceito $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando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

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da *Lippia sidoides* sobre os marcadores de função renal

Para investigar o efeito protetor da *Lippia sidoides* na lesão renal aguda induzida por I/R, níveis séricos de creatinina, uréia e albumina foram medidos 48h após o início da reperfusão (Fig. 08). Comparado com o grupo SHAM, os animais que sofreram lesão renal por I/R exibiram um aumento significativo nos níveis de creatinina ($1,08 \pm 0,15$ mg/dL vs $0,3 \pm 0,03$ mg/dL) e uréia plasmática ($149,8 \pm 25,25$ mg/dL vs $30,67 \pm 2,8$ mg/dL) ($p < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento com *Lippia sidoides* diminuiu significativamente os níveis de creatinina ($0,55 \pm 0,04$ mg/dL) e uréia ($56,8 \pm 4,02$ mg/dL) no plasma, após a lesão ($p < 0,05$).

Fig. 8. Efeito da *Lippia sidoides* na função renal após LRA por I/R.



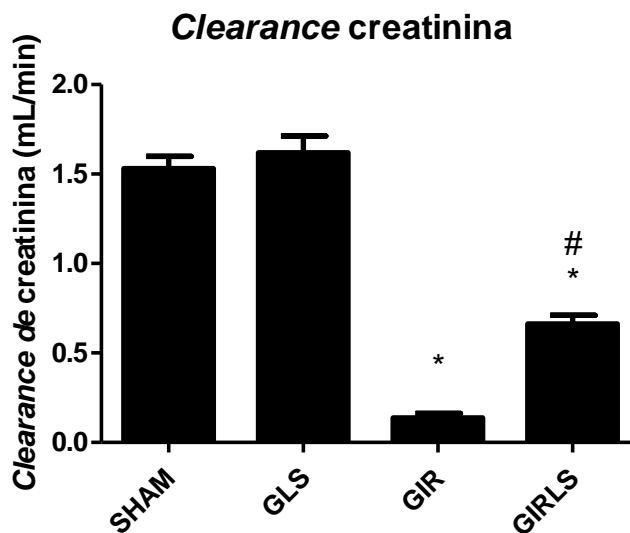
Legenda: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. A: Concentração de creatinina plasmática (mg/dL) *(p < 0,05) vs SHAM, # (p < 0,05) GIR. B: Concentração de uréia plasmática (mg/dL) *(p < 0,05) vs SHAM, # (p < 0,05) vs GIR. C: Concentração de albumina urinária (mg/g-Cr) *(p < 0,05) vs SHAM, # (p < 0,05) GIR.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Efeito da *Lippia sidoides* no Clearance de creatinina após LRA induzida por I/R

O Clearance de creatinina (Clcr) foi calculado para determinar a função renal estimando-se a taxa de filtração glomerular (TFG) (Fig. 09). TGF reduzida demonstra comprometimento da função renal. Comparado com o grupo SHAM, os animais que sofreram lesão renal por I/R tiveram uma significativa diminuição no clearance de creatinina ($0,13 \pm 0,06$ ml/min vs $1,53 \pm 0,16$ ml/min) (p < 0,05). O tratamento com a *Lippia sidoides* aumentou de forma significativa o clearance após a lesão renal ($0,66 \pm 0,1$ ml/min vs $0,13 \pm 0,06$ ml/min) (p < 0,05).

Fig. 9. Efeito da *Lippia sidoides* na taxa de filtração glomerular após LRA por I/R, através do cálculo do Clearance de creatinina.



Legenda: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. do Clearance de creatinina (ml/min). *(p < 0,05) vs SHAM, #(p < 0,05) vs GIR.

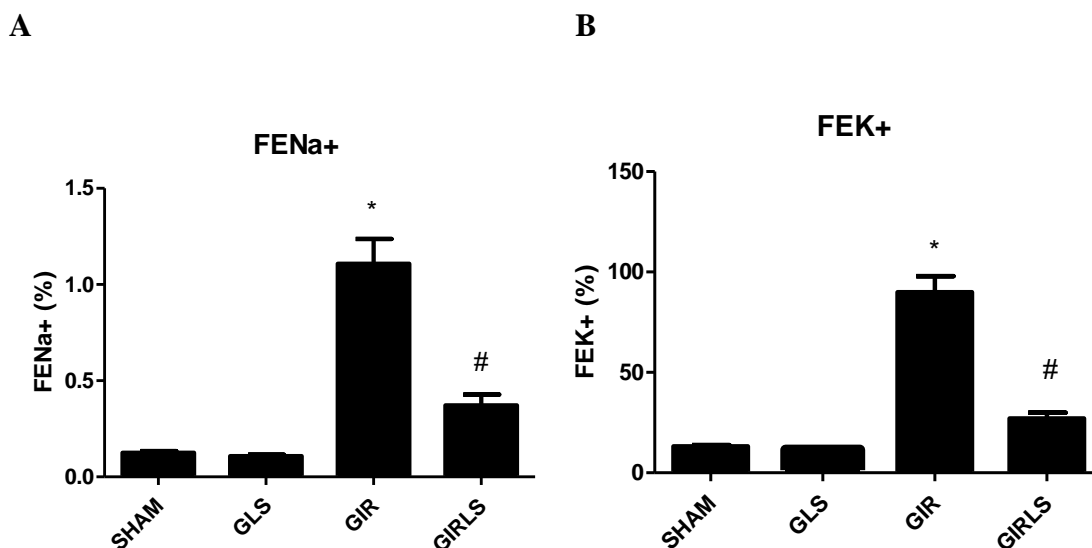
Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 Efeito da *Lippia sidoides* sobre a função tubular após LRA por I/R

Para avaliação da capacidade funcional tubular, foi calculado a Fração de Excreção de Sódio (percentagem do sódio excretado em relação ao sódio filtrado). Houve um aumento significativo da percentagem de sódio excretado no grupo que sofreu lesão por I/R em relação ao grupo SHAM ($1,10 \pm 0,31$ vs $0,12 \pm 0,02$) ($p < 0,05$), o que significa uma inabilidade dos rins dos animais deste grupo em manter a função tubular adequada (Fig. 10A). O tratamento com a *Lippia sidoides* diminuiu significativamente a percentagem de sódio excretado em comparação com o grupo que sofreu a lesão ($0,37 \pm 0,12$ vs $1,10 \pm 0,31$) ($p < 0,05$).

Na figura 10B, assim como o resultado anterior, mostram-se valores nos quais o grupo GIR atinge níveis significativamente maiores de excreção de K^+ , em relação ao grupo SHAM ($89,96 \pm 19,65$ vs $13,25 \pm 1,38$) ($p < 0,05$), reforçando o resultado do grau lesivo tubular. Esses valores foram significativamente reduzidos no grupo tratado com a *Lippia* em relação ao grupo que sofreu a lesão por I/R ($27,04 \pm 6,57$ vs $89,96 \pm 19,65$) ($P < 0,05$).

Fig. 10. Efeito da *Lippia sidoides* sobre a função tubular. $FENa^+$: Fração de Excreção de Sódio. FEK^+ : Fração de Excreção de Potássio.



Legenda: A: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da $FENa^+$ (%) *($p < 0,05$) vs SHAM, e # ($p < 0,05$) vs GIR. FEK^+ : Fração de Excreção de Potássio. B: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da FEK^+ (%) *($p < 0,05$) vs SHAM, # ($p < 0,05$) vs GIR.

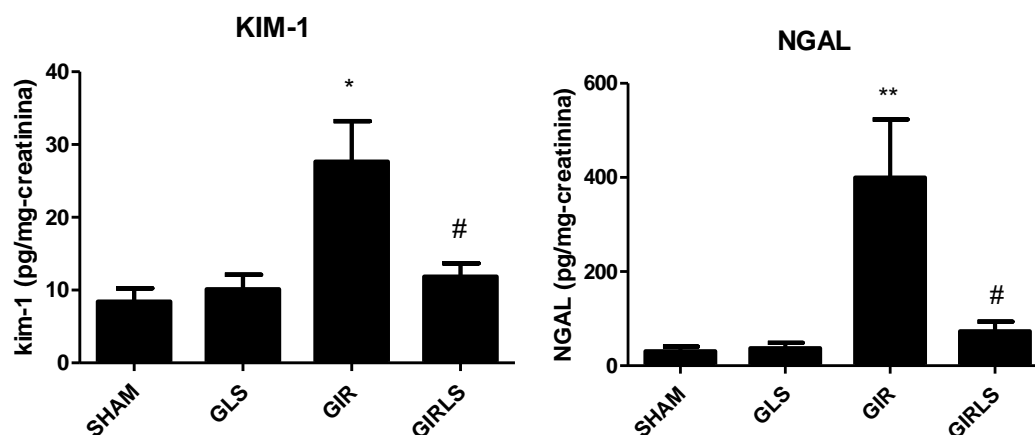
Fonte: elaborada pelo autor.

4.4 Efeito da *Lippia sidoides* sobre os novos biomarcadores renais

Células tubulares proximais são potencialmente propensas a sofrer os danos oxidativos por serem acentuadamente funcionais. Com o objetivo de analisar o dano específico nas células tubulares renais, avaliou-se a liberação de KIM-1 e NGAL na urina.

A figura 11 mostra que o protocolo de I/R foi capaz de triplicar os níveis basais de KIM-1 encontrados no grupo controle ($27,65 \pm 5,53$ vs $8,42 \pm 3,1$) ($p < 0,05$). Com relação ao NAL, verificou-se um aumento bastante significativo de concentração na urina ($399,8 \pm 123,4$ vs $30,65 \pm 10,19$) ($p < 0,05$). Adicionalmente, a *Lippia sidoides* reduziu significativamente os níveis de KIM-1 ($11,84 \pm 4,15$) e NGAL ($73,40 \pm 20,15$) na urina, indicando que o tratamento pode proteger as células renais tubulares dos danos causados pela I/R.

Fig. 11. Efeito da *Lippia sidoides* sobre os níveis de KIM-1 e NGAL



Legenda: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. de KIM-1 *($p < 0,05$) vs SHAM, e # ($p < 0,05$) vs GIR e NGAL *($p < 0,05$) vs SHAM, # ($p < 0,05$) vs GIR.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.4 Análise histológica

A avaliação histológica das amostras de tecidos renais indicou necrose tubular, dilatação tubular, infiltrado de células inflamatórias e edema celular no interstício tubular do córtex renal dos animais após 48h de reperfusão, como mostra a figura 12. As lesões

foram menos intensas nos animais tratados com *Lippia sidoides* comparados com os animais sem tratamento.

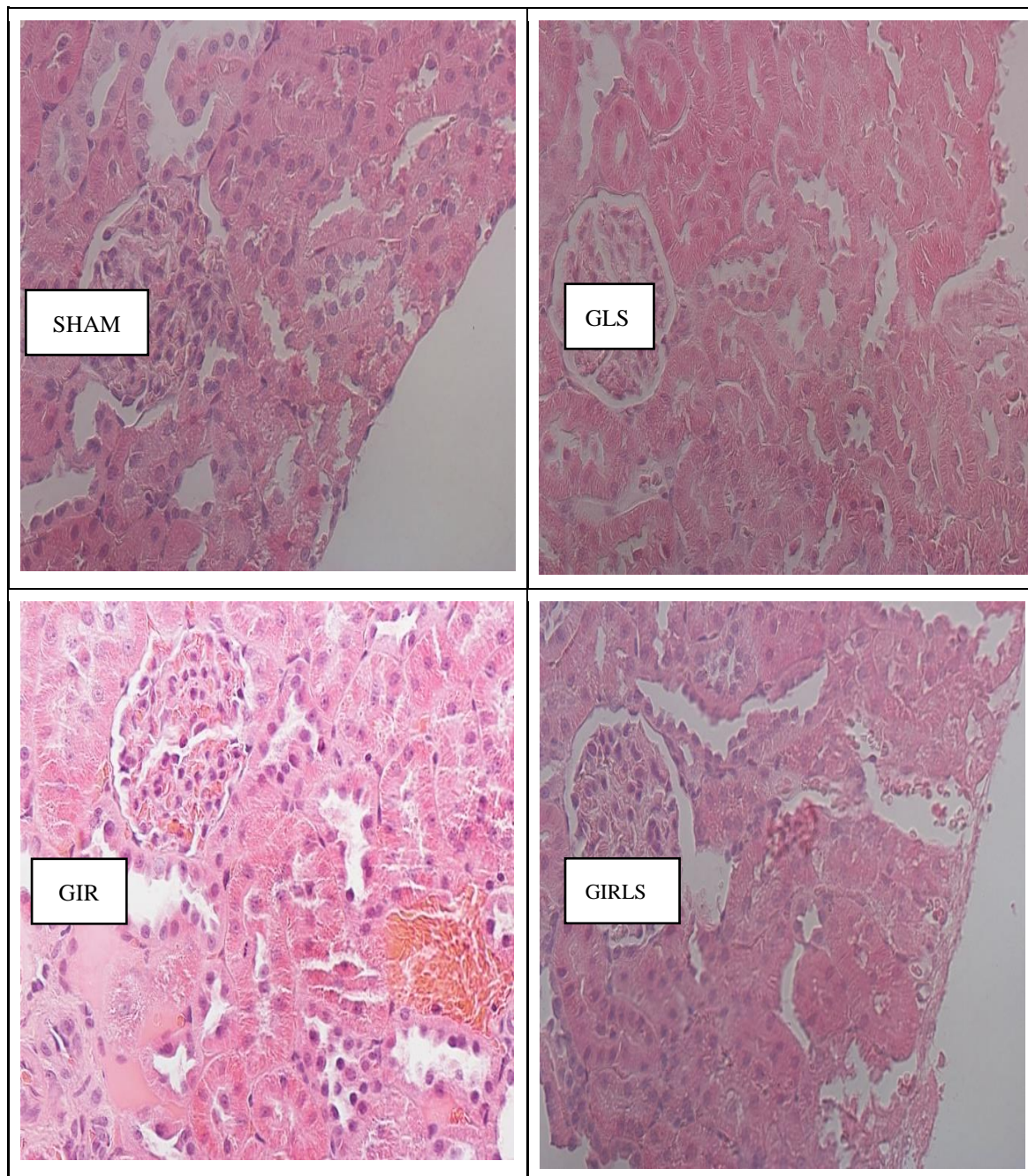


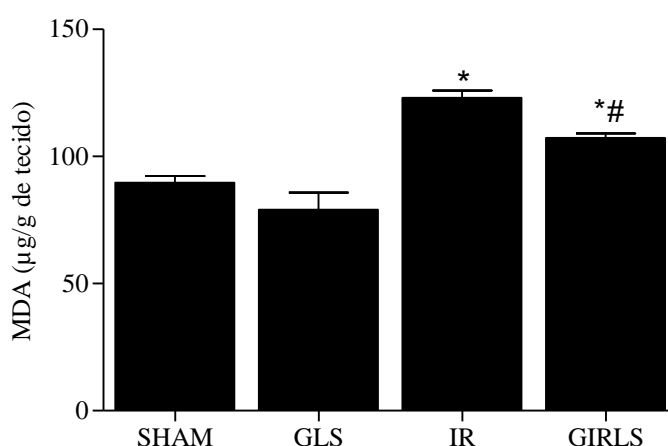
Fig. 12. Fotomicrografia de rim de rato ao final do experimento de Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperfusão (Hematoxilina-Eosina). Aumento 400x.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.5. Efeito da *Lippia sidoides* sobre os níveis de MDA no tecido renal após a LRA.

A figura 13 mostra que os valores de MDA no tecido renal no grupo que sofreu lesão por I/R estavam significativamente aumentados quando comparados com os valores de MDA do grupo que não sofreu lesão ($123 \pm 7,25$ mcg/g tecido vs $89,63 \pm 4,57$ mcg/g tecido) ($p < 0,05$), demonstrando um dano oxidativo considerável através da LRA por I/R. Entretanto, o grupo que recebeu tratamento com a *Lippia sidoides* diminuiu significativamente os valores de MDA no tecido em relação ao grupo sem tratamento ($107,4 \pm 3,4$ mcg/g tecido vs $123 \pm 7,25$ mcg/g tecido) ($p < 0,05$).

Fig. 13. Efeito da *Lippia sidoides* sobre os valores de malondealdeído (MDA) no tecido renal.



Legenda: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. de MDA/g tecido, *($p < 0,05$) vs SHAM, #($p < 0,05$) vs GIR.

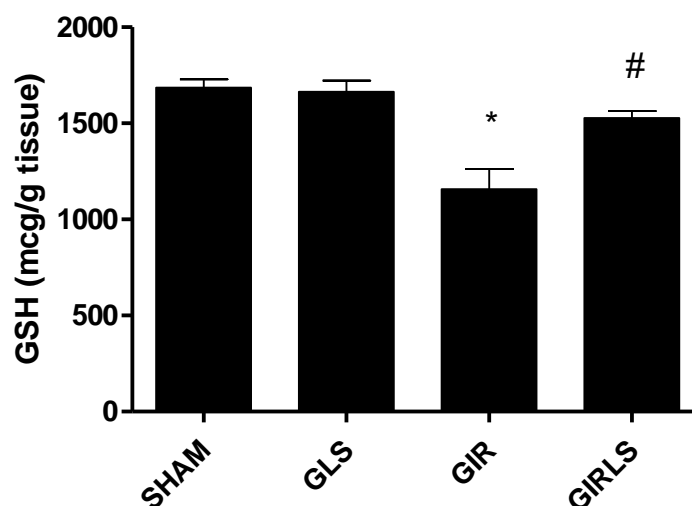
Fonte: elaborada pelo autor.

4.6. Efeito da *Lippia sidoides* sobre os níveis de GSH no tecido renal após a LRA.

A figura 14 mostra que o grupo que sofreu lesão por I/R apresentou valores de GSH significativamente reduzidos em relação ao grupo que não sofreu lesão ($1158 \pm 256,9$ mcg/g tecido vs $1686 \pm 103,9$ mcg/g tecido) ($p < 0,05$), demonstrando um dano oxidativo considerável resultante da LRA por I/R. Os animais do grupo que recebeu tratamento com *Lippia sidoides* apresentaram um aumento significativo nos valores de GSH quando comparados com o grupo que sofreu apenas a lesão ($1527 \pm 90,05$ mcg/g tecido vs

1158±256,9 mcg/g tecido) ($P < 0,05$), o que nos sugere uma proteção tecidual contra o dano oxidativo causada pela I/R.

Fig. 14. Efeito da *Lippia sidoides* nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido renal após LRA por I/R.



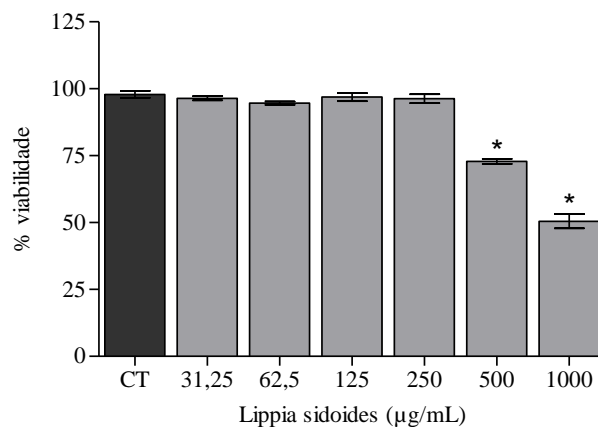
Legenda: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. dos valores de GSH (mcg/g tecido) *($p < 0,05$) vs SHAM, #($p < 0,05$) vs GIR.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.7. Ensaios de viabilidade celular

Inicialmente, com o objetivo de avaliar a citotoxicidade da *Lippia sidoides* nas células renais HK-2, foi realizado o ensaio MTT visando traçar uma faixa de concentrações adequadas para trabalho, ou seja, concentrações que não sejam consideradas tóxicas. Foi observado que, nas concentrações avaliadas, a *Lippia sidoides* diminuiu a viabilidade celular nas concentrações de 500 e 1000 μM em condições normais de aerobiose, portanto, essas concentrações foram descartadas dos ensaios posteriores (Figura 15).

Fig. 15. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a toxicidade da *Lippia sidoides* em células renais.

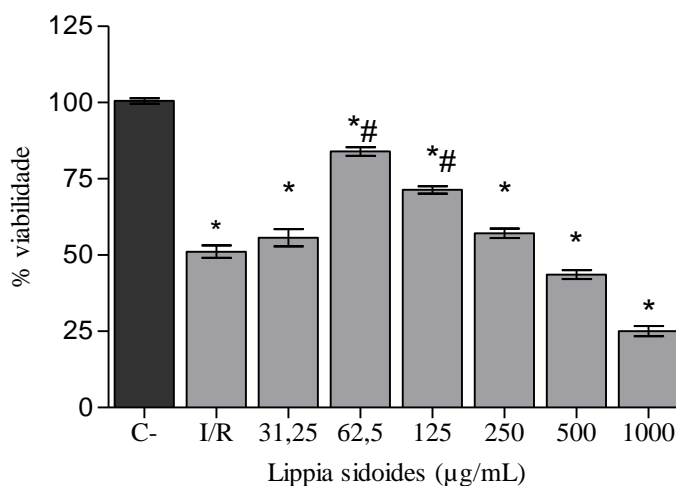


Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm SEM. *($p < 0,05$) comparado ao grupo controle de veículo.

Fonte: elaborada pelo autor.

A hipóxia associada à rápida oxigenação e consequente desequilíbrio redox é uma característica pronunciada de lesões por isquemia/reperfusão. Nesse contexto, na figura 16, é possível observar que a I/R foi capaz de reduzir a viabilidade celular para aproximadamente 50% quando comparado ao controle. Além disso, células que foram submetidas a I/R e foram subsequentemente tratadas com *Lippia sidoides* mostraram um efeito protetor, indicado pelo aumento ou manutenção da viabilidade, especialmente na concentração de 62,5 μ M, que após 24 horas de tratamento mostrou uma viabilidade de 83,98% em relação ao grupo controle, sendo considerada a mais baixa concentração a apresentar efeito protetor. Na concentração de 125 μ M apresentou-se uma viabilidade de 71,37%; então essas duas concentrações foram escolhidas para os próximos experimentos.

Fig. 16. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a morte de células renais HK2 após isquemia/reperfusão e a recuperação após a exposição à *Lippia sidoides*.



Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm SEM. $p < 0,05$ comparado aos grupos de controle de veículo. *($p < 0,05$) vs C-, #($p < 0,05$) vs I/R. I/R = Isquemia/Reperfusão.

Fonte: elaborada pelo autor.

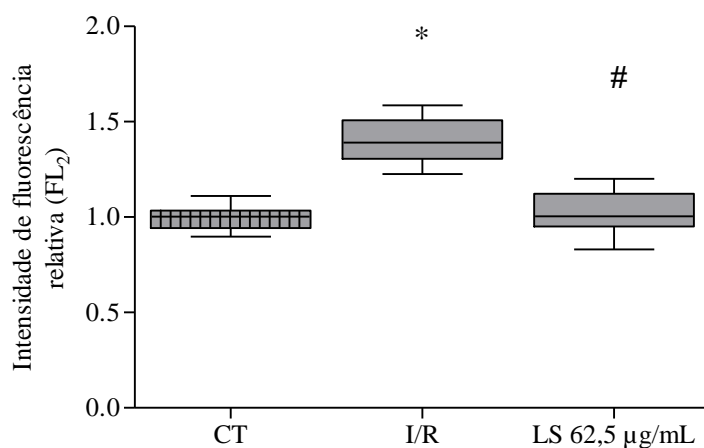
4.8. Ensaio por citometria de fluxo

4.8.1. Análise da produção de ERO citoplasmáticas

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

Inicialmente, a figura 17 mostra, em termos de intensidade de fluorescência relativa, que o protocolo I/R foi capaz de aumentar a produção de ERO em 40% dentro da célula. Além disso, o tratamento com *Lippia sidoides* 62,5 µg/mL após I/R reduziu essa elevação para 2,6%. Histogramas representativos das populações celulares são mostrados na figura 18.

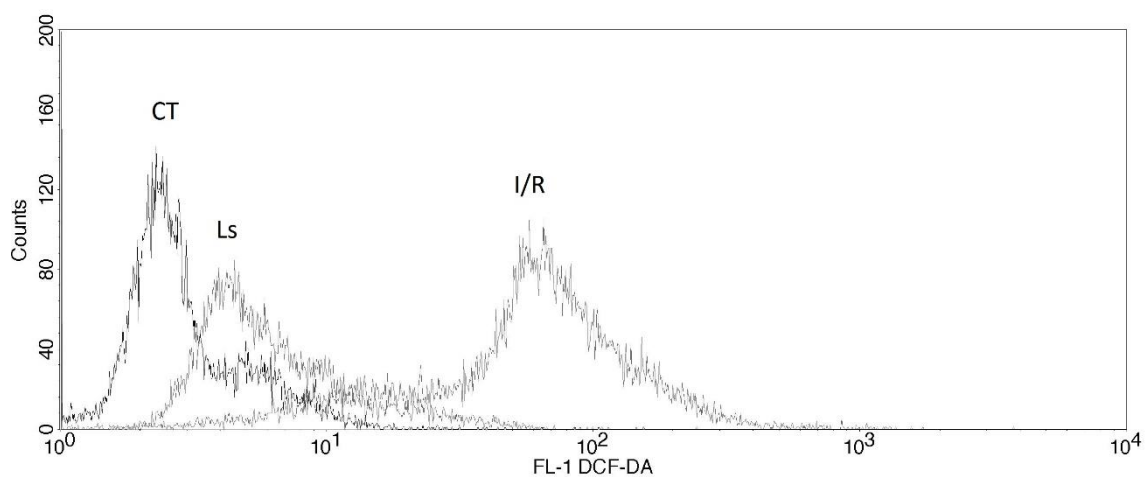
Fig. 17. Análise do estresse oxidativo e produção de ERO citoplasmáticas em células renais HK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando o DCFH-DA.



Legenda: Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle \pm SEM. $p < 0,05$. * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. I/R. I/R = Isquemia/reperfusão.

Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 18. Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentando o grupo tratado com *Lippia sidoides* na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$



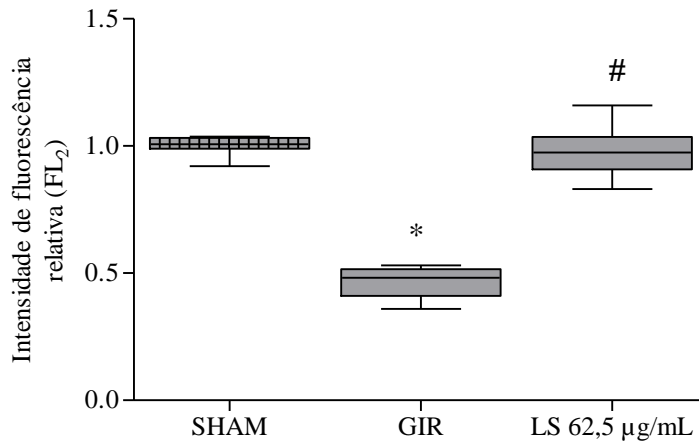
Legenda: Estão apresentados o grupo controle, I/R (isquemia/reperfusão) e tratado com *Lippia sidoides* 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.8.2. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Situações de hipóxia ou acúmulo de ERO podem levar à disfunção mitocondrial, especialmente no contexto do potencial elétrico transmembrana, essencial para a respiração celular. O $\Delta\Psi_m$ foi medido usando uma sonda fluorescente chamada Rhodamine-123. A figura 19 mostra os resultados em termos de intensidade de fluorescência relativa. Os dados permitem observar que o grupo I/R mostrou aproximadamente apenas metade do potencial mitocondrial comparado ao grupo controle, indicado pela diminuição no acúmulo e, conseqüentemente, na marcação de Rho-123. Além disso, a *Lippia sidoides* aproximou o $\Delta\Psi_m$ dos grupos tratados com o do grupo controle. O grupo tratado com a *Lippia sidoides* 62,5 $\mu\text{g/mL}$ apresentou 97,58% de $\Delta\Psi_m$ com relação ao controle. Histogramas representativos das populações celulares são mostrados nas Figuras 20.

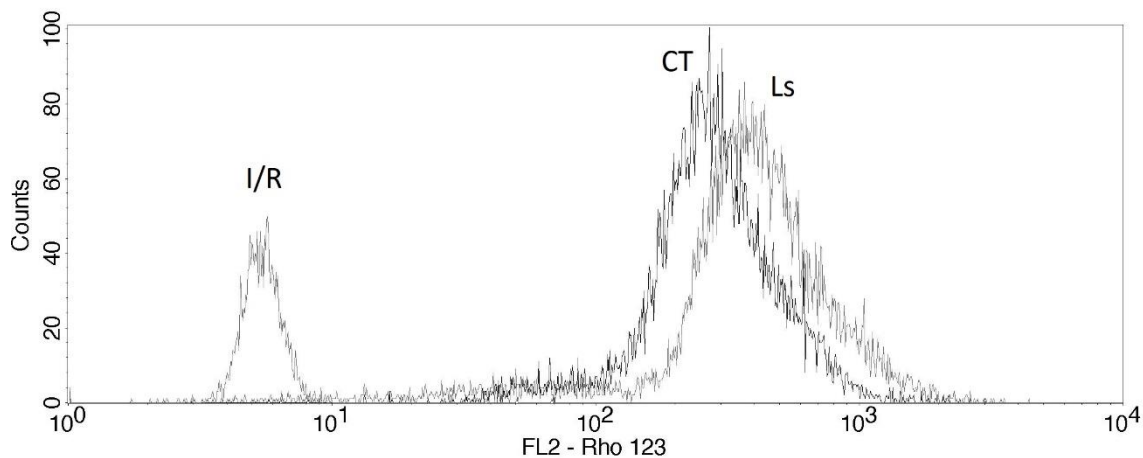
Fig. 19. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células renais por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.



Legenda: Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle \pm SEM. $p < 0,05$. *($p < 0,05$) vs SHAM, #($p < 0,05$) vs GIR. GIR: Grupo Isquemia/Reperusão.

Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 20. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando grupo tratado com *Lippia sidoides* na concentração de 62,5 µg/mL.



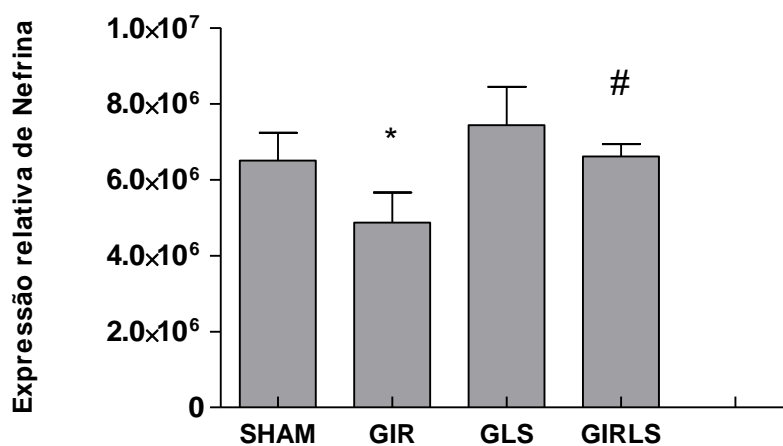
Legenda: Estão apresentados o grupo controle, I/R (isquemia/reperfusão) e tratado com *Lippia sidoides* 62,5 µg/mL. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.9. Avaliação da expressão de Nefrina por Western Blot

Foi analisada a expressão da Nefrina normalizada pela análise concomitante da expressão da proteína constitutiva β -actina. Conforme a figura 21, as análises permitiram observar que, nas no grupo que passou pela lesão por I/R os níveis Nefrina praticamente diminuíram significativamente quando comparados com os do grupo SHAM. Ademais, o tratamento com a *Lippia sidoides* se mostrou capaz de aumentar significativamente os níveis de Nefrina após a I/R, indicativo de proteção celular.

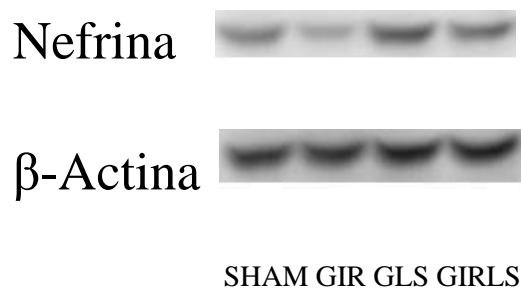
Fig. 21. Expressão relativa de Nefrina no tecido renal.



Legenda: Os dados estão expressos como média padrão ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs SHAM; #p<0,05 vs GIR.

Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 22. Fotografia representativa do ensaio de Western blot, representando a expressão da Nefrina no tecido renal em comparação com a expressão de β -actina no tecido renal expostas à isquemia/reperfusão (I/R).



Juntos, esses dados sugerem que o efeito nefroprotetor da *Lippia sidoides* pode se dar através da inibição da diminuição da expressão da Nefrina, sendo essa proteína uma das principais responsáveis pela manutenção da estrutura dos podócitos.

5. DISCUSSÃO

A LRA é caracterizada pela rápida perda da função renal e da incapacidade dos rins em excretar substâncias, concentrar a urina e de manter o balanço hidroeletrólítico adequado no organismo. Geralmente, é resultado de causas isquêmicas que se mantêm por períodos variáveis de tempo. Apesar do grande avanço no entendimento e no tratamento dos mecanismos fisiopatológicos, nos últimos 40 anos os índices de mortalidade ainda continuam excessivamente elevados (SCHRIER et al, 2004; BELLOMO, 2011). Isquemia, seguida de reperfusão, é uma das maiores causas de LRA, na qual é uma frequente síndrome clínica com alta morbidade e mortalidade (MENKE et al, 2014). Lesão por I/R no tecido renal inicia um complexo evento celular que resulta em dano e morte das células renais devido a uma combinação de apoptose e necrose (DITONNO et al, 2014). Os mecanismos que dão início à LRA ainda não estão claros. Contudo, já é bem descrito que, durante a I/R renal, as ERO produzidas pelas mitocôndrias desempenham um papel importante na lesão tecidual (KADKHODAEI et al, 2014). Os mecanismos subjacentes aos danos renais costumam ser multifatoriais e interdependentes, envolvendo hipóxia, dano por estresse oxidativo e resposta inflamatória. Nesse contexto, o estresse oxidativo pode levar à oxidação da membrana fosfolipídica e conseqüente inflamação (ZHAO et al., 2018). É um fenômeno complicado, devido ao fato de a reperfusão, apesar de ser essencial para a sobrevivência do tecido renal que sofreu isquemia, causar um dano adicional, chamado lesão por reperfusão (PALLER et al, 1984). Portanto, a fisiopatologia da LRA por I/R envolve um complexa relação entre a hemodinâmica renal, a lesão tubular e a geração de EROs (GILL et al, 2005).

Dessa forma, é válida a busca de substâncias que tenham ação protetora sobre células ou tecidos submetidos à isquemia/reperfusão. Sabe-se que, nas últimas décadas, foi observado um aumento no uso de produtos naturais em pesquisa (HAYACIBARA et al, 2005). Sendo assim, a *Lippia sidoides* se destaca nesse contexto como uma substância de potencial terapêutico, uma vez que inúmeros trabalhos demonstram as atividades biológicas desta, bem como suas possíveis aplicações terapêuticas (DE MORAIS et al, 2016). Entretanto, apesar desse grande número de estudos e do fato de existir uma considerável quantidade de informações disponíveis no que concerne aos aspectos químicos e biológicos da *Lippia*, sua aplicação terapêutica ainda pode ser considerada incipiente (ALMEIDA, 2018).

No presente estudo, conseguimos reproduzir um quadro de LRA induzida por I/R em um modelo animal, e utilizamos a *Lippia sidoides* com o objetivo de tentar prevenir danos no tecido renal através de uma possível nefroproteção. ABOUTALEB et al, (2018) e DA COSTA et al, (2015), demonstraram experimentalmente alternativas terapêuticas advindas de produtos naturais em diferentes tipos de nefropatia, expondo assim, a eficácia destes em relação a esta fisiopatologia.

Os modelos de lesão renal contribuem para o esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos e para o estudo de possíveis alternativas terapêuticas de nefroproteção, contribuindo para reduzir a severidade da lesão tubular frente ao insulto isquêmico.

O modelo de LRA do nosso estudo é válido e confiável, pois reproduzimos alterações renais conforme relatos clínicos de outros estudos. Foi observado uma elevação significativa da creatinina sérica no grupo que sofreu lesão por I/R, sendo esse dado reforçado pelo estudo de LASZLO et al (2018) e de GANG et al (2013), que relataram dados similares de creatinina sérica em animais que sofreram o mesmo processo de lesão renal (isquemia de 60min + nefrectomia, seguido de reperfusão). De acordo com os resultados apresentados, o tratamento com *Lippia sidoides* reduziu significativamente os valores de creatinina sérica comparado com o grupo que sofreu apenas a lesão por I/R.

Outro achado importante em nosso estudo foi a elevação da uréia sérica após I/R quando comparado com o grupo controle. Este resultado está de acordo com relatos descritos anteriormente na literatura, como o estudo de HU et al, (2018). No presente estudo, a *Lippia sidoides* também foi capaz de reduzir os valores de uréia sérica em relação ao grupo I/R.

Elevação na creatinina e uréia sérica é um sinal de deterioração da função glomerular, que resulta em uma disfunção renal de acordo com o tempo (SAHNA et al, 2006). A concentração de creatinina no plasma é mais significativa em relação aos níveis de uréia na fase inicial da doença renal, pois uma pequena elevação da creatinina resulta diretamente na queda da taxa de filtração glomerular (TFG), o que indica a possibilidade de haver algum problema renal (EATON & POOLER, 2006). Por outro lado, níveis de uréia começam a subir depois que acontece um dano no parênquima renal. Como a uréia também sofre filtração, nos infere o mesmo tipo de análise anterior, na qual uma medida de sua concentração plasmática também é um indicador da TFG. A excreção renal deve igualar-se à produção, pois os níveis plasmáticos podem aumentar até um valor patológico, produzindo uma condição chamada de uremia.

Em nosso estudo, foi observado um acentuado aumento nos níveis plasmáticos de uréia, sendo esses achados compatíveis com o dano renal relacionado com a lesão isquêmica (KLATTE et al, 2015). Portanto, a diminuição plasmática nos níveis destes compostos (creatinina e uréia) pelo tratamento com a *Lippia sidoides* no nosso estudo nos sugere um efeito benéfico dos componentes desta substância.

A TFG é um parâmetro de fundamental importância para avaliação da função renal, pois nos fornece uma estimativa do número de néfrons funcionantes, sendo então considerada uma estimativa legítima para a identificação de disfunção renal. A avaliação da TFG no nosso estudo se deu a partir do *Clearance* de creatinina (Clcr). A LRA causa uma queda acentuada da taxa de filtração glomerular (TFG) com consequente deterioração da função renal. Na prática clínica, o *clearance* de creatinina em urina de 24 horas, diretamente proporcional a medida da creatinina urinária e inversamente proporcional a de creatinina plasmática, ainda é utilizado para determinação da TFG (ANDRADE et al, 2018). Estudos recentes mostram o uso da medição da depuração de creatinina associada à dosagem de potássio sérico para avaliação do dano renal (BURNS & HO, 2018).

O presente estudo mostrou que o tratamento com o extrato alcoólico da *Lippia sidoides* reverteu a diminuição do *clearance* de creatinina, observada no grupo lesão (I/R), sugerindo possíveis efeitos da substância sobre o glomérulo renal, visto que apresenta influência diante da TFG.

Além disso, foi demonstrado que os níveis de albumina estavam elevados na urina dos animais submetidos à LRA induzida por I/R, estando de acordo com resultados descritos na literatura (LANE et al, 2018), que demonstraram aumento da albuminúria na Lesão Renal Aguda. O tratamento com a *Lippia sidoides* foi capaz de diminuir significativamente os níveis de albumina na urina.

Estudos prévios mostram que a taxa de filtração glomerular (TFG) e a medição dos níveis de proteínas na urina, principalmente de albumina, são parâmetros importantes no diagnóstico de LRA e da doença renal crônica (RADIŠIĆ BILJAK et al, 2017). A albumina é a mais abundante proteína de alto peso molecular (~66kDa) presente no plasma e é excretada na urina de forma contínua. Porém, devido seu tamanho e carga, a mesma não deve ser livremente filtrada. Quando a excreção de albumina é maior que 30mg/dia indica o processo de albuminúria, que reflete uma alteração na barreira de filtração glomerular, sendo assim, níveis altos de albumina na urina podem indicar danos renais a nível de glomérulo (VART et al, 2016).

O túbulo proximal é responsável pela reabsorção da maior parte das substâncias que são filtradas pelo glomérulo, principalmente pela reabsorção de sódio

através dos transportadores na membrana apical das células tubulares. Essa é uma função importante do rim, uma vez que o transporte de outros íons e de solutos necessita diretamente ou indiretamente da reabsorção de Na^+ . Esse mecanismo utiliza, indiretamente, a energia liberada pela quebra do ATP. Portanto, é fundamental a disponibilidade de energia advinda dos ATPs, que são fornecidos pelas vias metabólicas. Logo, alterações nestas vias, como a causada pela isquemia, modificam a integridade estrutural das células tubulares, resultando em modificações na taxa e na função tubular (KHUNDMIRI et al, 2004; FATIMA et al, 2005). Em condições normais, cerca de 65% da carga filtrada de sódio são reabsorvidos (EATON & POOLER, 2006). Por outro lado, em condições isquêmicas, devido a um déficit de energia, ocorre um desequilíbrio da bomba de Na^+K^+ -ATPase, o que gera uma disfunção dessa proteína transportadora na membrana da célula do túbulo. Isso resulta em uma falha na reabsorção de Na^+ nessa região, levando à elevação da FENa^+ (DEVARAJAN et al, 2006).

No presente estudo, foi visto que houve um comprometimento da função tubular pelo aumento da FENa^+ após a instalação da LRA. Este resultado está de acordo com os resultados de outros estudos, como o de SINGH et al (2018), que relatou que mesmo com o tempo de isquemia de 60min houve um aumento significativo na excreção de sódio.

Também foi possível observar que *Lippia sidoides* foi capaz de reduzir a elevação na FENa^+ provocada pela LRA.

Em condições normais, a intensa reabsorção de Na^+ pelo túbulo proximal forma o gradiente químico que favorece a reabsorção passiva de outras substâncias permeáveis ao epitélio tubular, como o K^+ (KOO et al, 2018). Dessa forma, um aumento na excreção de Na^+ acarreta também um aumento da excreção de K^+ .

Outra justificativa para elevada excreção de potássio, é que no ducto coletor a secreção de K^+ está diretamente relacionada com a reabsorção de Na^+ . Logo, devido ao aporte aumentado de sódio para o ducto coletor, uma vez que este não está sendo reabsorvido no túbulo proximal, mais sódio acaba entrando nas células principais e mais potássio é secretado (BERNE E LEVY, 2009).

Assim, da mesma forma como encontrado para a FENa^+ , obteve-se uma elevação significativa da FEK^+ em animais submetidos à LRA. A *Lippia sidoides* também foi capaz de reduzir a elevação na FEK^+ provocada pela LRA, mostrando assim um efeito protetor da substância em estudo. Dessa forma, os resultados encontrados em relação à FENa^+ e à FEK^+ indicaram elevados níveis desses íons excretados na urina,

caracterizando bem o comprometimento tubular na LRA por I/R. De acordo com estudos como o de KIM et al (2013), disfunções na excreção de sódio e potássio observados no quadro de LRA isquêmica está associado com necrose do túbulo proximal, condizente com os nossos achados da microscopia.

O diagnóstico precoce de lesão renal aguda (LRA) permanece como uma problemática, devido à falta de biomarcadores iniciais adequados de lesão renal e da função renal. Os biomarcadores são, de fato, úteis e devem ser incorporados como essenciais em estudos experimentais de LRA, em particular para rastrear danos precoces e sutis. A Lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL), como um marcador precoce de LRA, supera tais limitações e parece demonstrar que o diagnóstico de LRA em seus estágios iniciais é possível e útil. A NGAL está aumentada significativamente em pacientes com LRA, mas não nos controles correspondentes. Além disso, esse aumento na NGAL é descrito em vários estudos entre 24 e 48 horas antes do aumento da creatinina (RONCO, 2007), indicando que um aumento mais rápido do nível de NGAL comparado ao nível de creatinina sérica em resposta à LRA é um dos seus benefícios em substituição ao uso da creatinina. Portanto, pode ser um melhor marcador na fase reversível ou menos grave da LRA (HAASE et al, 2009).

Durante a lesão renal, a expressão de NGAL é induzida em segmentos proximais de maneira predominante, mas também em segmentos distais do néfron. O papel do NGAL parece ser de regeneração das células renais através do transporte de ferro durante a nefrogênese. De fato, estudos em camundongos com LRA por isquemia, tiveram melhora das injúrias no tecido renal após administração de NGAL externo (MISHRA et al, 2005).

Sem a LRA e em condições normais, o NGAL é produzido em pequenas quantidades no néfron distal, e o NGAL sistêmico é filtrado pelo glomérulo e totalmente reabsorvido no túbulo proximal. Desse modo, pequenos níveis de NGAL são detectados na urina e no plasma. Durante a LRA, a expressão de NGAL é induzida no túbulo distal, resultando em um aumento dos níveis urinários. Além disso, na LRA a reabsorção tubular proximal está comprometida, diminuindo a reabsorção de NGAL e aumentando seus níveis urinários (DAVIDE BOLIGNANO, 2008; SCHMIDT-OTT, 2011).

Ademais, a Molécula de Lesão Renal-1 (KIM-1) é um novo biomarcador para lesão de túbulo proximal renal, indetectável em rins normais, mas é marcadamente elevada na lesão renal aguda (LAHOUD et al, 2015) . É considerado um marcador único, com alta sensibilidade e especificidade, mas, acima de tudo, utilizado para o diagnóstico

de lesão renal precoce, especialmente de células tubulares proximais lesadas (TAN et al, 2015).

O KIM-1, uma glicoproteína (90 kDa) transmembrânica, está localizado na membrana apical das células tubulares proximais. É conhecido que o seu domínio extracelular é clivado durante a injúria renal, o que é capaz de transformar células locais em fagócitos para remoção de corpos apoptóticos. O domínio clivado é então eliminado na urina e se torna detectável. No presente trabalho, a urina foi colhida para determinar a concentração de KIM-1 e correlacioná-la com a injúria renal por I/R e o efeito protetor da *Lippia sidoides*.

Foi observado um aumento estatisticamente significativo de KIM-1 e NGAL nas urinas dos animais submetidos à I/R. Este resultado é corroborado por estudos *in vivo* realizados previamente por nosso grupo de pesquisa (LIMA, 2016; SAMPAIO et al, 2016; DANTAS et al, 2018) e por outros autores (LUO et al, 2014). A detecção urinária de KIM-1 tem sido estudada como um potencial biomarcador precoce, sensível e específico do dano celular no epitélio tubular, uma vez que é detectável durante o início da LRA e sua presença nessa amostra representa sua produção intrarrenal (PARIKH; MANSOUR, 2017).

O presente estudo mostrou que os valores de KIM-1 e NGAL na urina foram significativamente menores nos grupos tratados com *Lippia sidoides* do que no grupo I/R. Estes parâmetros são biomarcadores confiáveis para a detecção precoce da LRA. O nível desses biomarcadores após a lesão pode identificar a LRA muito mais cedo do que os métodos convencionais. Além disso, nossos resultados mostraram que os marcadores de lesão tubular renal, como o NGAL e KIM-1, estavam aumentados no grupo I/R, com aumento da relação albumina-creatinina na urina, que por sua vez é um marcador de dano glomerular renal. Isso indica que, na lesão renal por I/R, estão envolvidas lesões tubulares e glomerulares renais. O tratamento com *Lippia sidoides* foi capaz de proteger contra danos tubulares e glomerulares.

Outro aspecto que merece destaque diz respeito aos podócitos, pois estes compreendem uma estrutura tripla com células endoteliais vasculares e uma membrana basal glomerular no glomérulo renal, formando uma barreira crítica para a filtração de moléculas grandes, como proteínas, por exemplo. Desta forma, disfunções dos podócitos podem levar à proteinúria (WADA et al, 2016), conforme visto nos resultados deste trabalho.

Outro novo e importante biomarcador relacionado aos podócitos foi investigado: a nefrina.

A nefrina é uma molécula estrutural chave do diafragma da fenda do podócito que fornece suporte arquitetônico aos podócitos por meio de conversa cruzada com o citoesqueleto de actina (LIU et al., 2015).

A alteração da expressão da nefrina no tecido renal pode estar relacionada à disfunção renal, particularmente à diminuição da razão de filtração glomerular (TFG) estimada (NG et al, 2011). Além disso, a nefrina é usada como marcador de dano renal glomerular específico em vários contextos e foi observada antes do desenvolvimento de albuminúria em um estudo anterior (HEIMLICH et al, 2017). Assim, a nefrina pode ser um biomarcador adequado para detecção precoce de LRA.

No presente estudo, a I/R causou uma regulação negativa da expressão da nefrina e o tratamento com LS pôde reverter essa diminuição da expressão da proteína. A progressão da LRA, incluindo diminuição da TFG, pode ser devido à diminuição do número de proteínas glomerulares, tal como a nefrina, e essa disfunção pode, portanto, contribuir para a redução da função renal.

É fato que a necrose tem sido proposta como mecanismo de morte celular em rins que sofrem lesão por I/R (SAIKUMAR et al, 2003). Os achados histopatológicos no presente estudo demonstraram que o os animais controles apresentaram aspecto morfológico normal, com preservação da arquitetura renal e sem alterações. Alguns estudos, com indução de I/R em ratos, observaram alterações na morfologia renal através da avaliação histológica, semelhantes às encontradas pelo presente trabalho, caracterizadas por necrose tubular, edema celular no interstício tubular do córtex renal, infiltrado de células inflamatórias e dilatação tubular (FERREYRA et al, 2013)

Do ponto de vista qualitativo, houve um quadro de alterações morfológicas dos tecidos de animais submetidos à I/R em relação ao grupo controle, a exemplo de edema celular no interstício tubular do córtex renal, infiltrado de células inflamatórias e dilatação tubular, o que está de acordo com relatos anteriores, como o de MENG et al (2018). Foi observado que a *Lippia sidoides* foi capaz de melhorar algumas alterações morfológicas após o estabelecimento da LRA por I/R, reforçando o efeito protetor tubular da substância.

No intuito de investigar efeitos mais diretos do extrato da *Lippia sidoides* e estudar a fisiopatologia do dano renal por I/R, foram realizados ensaios de citotoxicidad. Para tanto foram utilizadas células renais HK2, visto que são uma linhagem celular

imortalizada de túbulos proximais de humanos saudáveis e são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade, da função renal e de efeitos de substâncias em estudos translacionais (RYAN et al, 1994).

Portanto, os ensaios de cultura de células nos permitem avaliar os efeitos diretos de substâncias em cultivos de células, as quais podem ser provenientes de um cultivo primário (obtidas diretamente do tecido animal) ou podem ser desenvolvidos em linhagens celulares imortalizadas.

Os resultados obtidos e apresentados neste estudo, em relação às dosagens bioquímicas reforçadas pelas alterações na excreção de eletrólitos, à seletividade do KIM-1 pelo túbulo proximal e à indicação de alterações tubulares na análise histológica reafirmam a escolha desta linhagem na investigação dos efeitos renais da *Lippia sidoides*.

O modelo experimental *in vitro* utilizado neste estudo tem o objetivo de mimetizar de maneira confiável e reprodutível o dano causado pelo processo de I/R.

Observou-se que o extrato alcoólico de *Lippia sidoides* não apresentou toxicidade nas concentrações estudadas, exceto nas concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Assim, essas duas concentrações foram excluídas dos demais ensaios, mantendo-se no estudo as concentrações subtóxicas.

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

No processo de I/R *in vitro*, as células, quando comparadas ao grupo controle aerobiose, apresentaram redução significativa de percentual de viabilidade, demonstrando, assim, que foi estabelecida a lesão por isquemia e reperfusão. Contudo, ao serem tratadas com concentrações pré estabelecidas do extrato alcoólico de *Lippia sidoides*, as células tiveram reversão parcial dos danos celulares causados por I/R, com aumento do percentual de viabilidade. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que o rim possui alto potencial regenerativo e pode se recuperar completamente após o estabelecimento de uma lesão renal aguda (LRA), visto que a primeira fase do reparo após a lesão é caracterizada pela grande proliferação de células epiteliais nos túbulos renais, principalmente, o túbulo proximal (KRAMANN et al, 2015).

O estresse oxidativo e a formação de ERO a ele associada são descritos como mecanismos de disfunção epitelial na LRA induzida por I/R (TAO et al, 2018). No entanto, as ERO têm funções essenciais nos processos de sinalização celular, como a regulação da proliferação, diferenciação e migração celular (JEONG et al, 2018).

A busca farmacológica de substâncias antioxidantes com efeitos farmacológicos tem sido um desafio para os pesquisadores. No entanto, estudos anteriores mostraram que a suplementação com substâncias que combatem a formação de ERO, como vitamina C e E, glutathiona e acetilcisteína, se tornaram ineficazes na redução total de danos após lesões isquêmicas (YOUSEF et al, 2012; WENG et al, 2018).

Conhecendo o fato de que o processo de isquemia é responsável por causar lesão tecidual, devido ausência de oxigênio e que a reperfusão, que nada mais é que a reoxigenação do tecido, gera a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis por exacerbar a lesão isquêmica aguda, foi decidido estudar os efeitos do extrato alcoólico de *Lippia sidoides* sobre parâmetros que avaliam o equilíbrio óxido-reductor no tecido, visto que o extrato possui componentes majoritários que já apresentam efeitos farmacológicos antioxidantes previamente descritos (GUIMARÃES et al, 2015).

A lesão por I/R causa uma estimulação na produção de radicais livres de oxigênio, sendo um dos principais eventos que resultam na lesão. Diversos estudos têm associado esse aumento na produção de EROs na LRA induzida por I/R em modelos animais, como relatado por CHOI et al (2018).

No presente estudo, determinamos os níveis de MDA no tecido renal, e observamos um aumento significativo nos níveis de MDA em animais expostos à LRA por I/R, em comparação com o grupo que não sofreu a lesão. Esses resultados foram similares e estão de acordo com estudos prévios, como o de ZHENG et al (2018).

O tratamento com o extrato alcoólico de *Lippia sidoides* diminuiu a elevação de MDA no tecido renal causada pela lesão por I/R.

Sabe-se que durante as lesões renais ocorrem depleções significativas nos níveis de GSH, como a que ocorre durante um evento isquêmico. Nesses casos, é de fundamental importância o papel desta enzima para fornecer proteção à função renal (HEUVEL, 2012).

A determinação de níveis de GSH se baseia na reação entre duas moléculas de GSH, que doam um elétron cada uma para a glutathiona oxidada (GSSG), que pode ser reduzido novamente ao GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR). O desequilíbrio

redox é evidenciado pela baixa proporção das concentrações das moléculas de GSH e GSSG (GSH/GSSG) (GIUSTARINI et al, 2013).

No nosso estudo, foi observado que os níveis de GSH diminuíram significativamente após o estabelecimento da LRA por I/R, uma vez que os animais que não sofreram esse tipo de lesão estavam com níveis bem superiores de GSH. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores, como o de DING et al, (2018).

Foi observado que no grupo que recebeu tratamento com a *Lippia sidoides*, mesmo após o estabelecimento da lesão renal, os níveis de GSH sofreram um aumento significativo, demonstrando que o extrato foi capaz de reverter a depleção de GSH resultante da LRA por I/R, o que nos sugere um potencial antioxidante considerável.

Estudos anteriores mostram a utilização das determinações de MDA e GSH para avaliação do equilíbrio redox após o tratamento com substâncias naturais antioxidantes, como (-)- α -bisabolol e própolis vermelha, que foram capazes de promover melhoria da lesão renal aguda por I/R, sugerindo, assim, o envolvimento de mecanismos oxidativos na injúria renal (DA COSTA et al, 2015; SAMPAIO et al, 2016).

A partir dos dados obtidos no ensaio do MTT, decidiu-se avaliar as células por citometria de fluxo, com o objetivo de observar o efeito da *Lippia sidoides* sobre mecanismos oxidorredutores durante a I/R, utilizando o DCFH-DA e a Rho123 como marcadores de estresse oxidativo citoplasmático e mitocondrial, respectivamente. A presença da *Lippia sidoides* causou diminuição do acúmulo de ERO induzido pela I/R, além de melhorar o potencial transmembrânico mitocondrial, como observado pelo aumento do acúmulo mitocondrial de Rho123. Esses resultados apontam para o envolvimento da respiração celular e do equilíbrio redox nos processos de morte e de recuperação, bem como do mecanismo de ação da substância em estudo (SAMPALIO et al, 2016).

Sugere-se que o efeito benéfico da *Lippia sidoides* tenha sido evidenciado através da proteção diante do dano celular ocasionado pela lesão por I/R sobre as proteínas transportadoras na membrana do túbulo proximal. Tal efeito benéfico provavelmente foi advindo do seu papel antioxidante.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente estudo demonstraram a atividade do extrato alcoólico na redução da lesão renal, o que foi observado através da redução de parâmetros bioquímicos, como creatinina, uréia, albumina, fração de excreção de sódio e potássio. Além disso, foi observado envolvimento da ação da *Lippia sidoides* na taxa de filtração glomerular, o que é mostrado pela capacidade de aumentar o clearance de creatinina. Restou evidenciado a contribuição da para a manutencao da função renal.

Observou-se também que o tratamento com *Lippia sidoides* protege as células epiteliais tubulares renais humanas (HK2) contra o dano oxidativo causado pela hipóxia e reoxigenação na LRA causada por I/R, demonstrado pela melhora da função mitocondrial e aumentando a viabilidade celular.

Além do mais, restou evidenciada a participação de novos biomarcadores como o KIM-1, NGAL e Nefrina na LRA induzida por I/R, com o objetivo de obter informações importantes a respeito da localização da lesão renal, avaliando a intensidade da lesão, o diagnóstico diferencial da lesão, sua capacidade preditora de LRA e os impactos da intervenção terapêutica.

Dessa forma, este trabalho destaca a importância terapêutica da *Lippia sidoides*, pois a mesma apresenta diversificadas atividades biológicas, sobretudo por seu potencial antioxidante como estratégia de defesa no modelo de LRA por I/R.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUTALEB, N.; JAMALI, H.; ABOLHASANI, M.; PAZOKI, T.H. Lavender oil (*Lavandula angustifolia*) attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis. **Biomed Pharmacother.** Vol. 110:9-19, 2018.

ABUELO, J.G. Normotensive Ischemic Acute Renal Failure. **The New England Journal of Medicine.** v.357 p.797-805, 2007.

AL-GAYYAR, M. M.; HASSAN, H. M.; ALYOUSSEF, A.; ABBAS, A.; DARWEISH, M. M.; EL-HAWWARY, A. A. Nigella sativa oil attenuates chronic nephrotoxicity induced by oral sodium nitrite: Effects on tissue fibrosis and apoptosis. **Redox Rep.** 2015.

ALESSIO, H.M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in sport and exercise**, v. 25, p. 218-224, 1999.

ALMEIDA, J.R.G.S., SILVA-FILHO, R.N., NUNES, X.P., DIAS, C.S., PEREIRA, F.O., LIMA, E.O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Rev Bras Farmacogn.**; 16:638–41, 2006.

ALMEIDA, M.C.; PINA, E.S.; HERNANDES, C.; ZINGARETTI, S.M.; TALEB-CONTINI, S.H.; SALIMENA, F.R.G.; SLAVOV, S.N.; HADDAD, S.K.; FRANCA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W. Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). **BMC Res Notes.**; vol. 11(1):725, 2018.

ANDRADE, L. *et al.* Acute Kidney Injury as a Condition of Renal Senescence. p. 1–15, 2018.

ARTUNC-ULKUMEN, B.; GUVENC, Y.; GOKER, A.; GOZUKARA, C. Relationship of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and procalcitonin levels with the presence and severity of the preeclampsia. **J Matern Fetal Neonatal Med.** v. 28, n. 16, p. 1895-900, 2015.

ATKINS, S. Verbenaceae: the families and genera of flowering plants. **Berlim Springer**, vol. 7., p. 449–68, 2004.

BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.**, v. 390, p. 191–214, 2009.

BASS, D. A.; OLBRAND, P.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; McCALL, C.E. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 136-141, 1986

BASS, D. A.; PARCE, W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P. SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BASTOS, M. G.; BASTOS, R. M. R.; PAULA, R. B. Avaliação da função renal. Em Barros E, Gonçalves LF (Eds). **Nefrologia no consultório**. Artmed, Porto Alegre, 2007, pp 49-67.

BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H.. **Bioquímica Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A. et al. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs. **Crit Care**. v. 8, n. 4, p. 204-212, 2004.

BELLOMO. R. Acute Renal Failure. **Respir. Crit. Care Med.**, vol.32, p.639-650, 2011.

BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **Lancet**. v. 380, n. 9843, p. 756-766, 2012.

BELZER, F.O., SOUTHARD, J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. **Transplantation**, v.45, p. 673-676, 1988.

BERNE e LEVY. **Fisiologia**. 6ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2009.

BERTINI, L.M., PEREIRA, A.F., OLIVEIRA, C.L.L., MENEZES, E.A., MORAIS, S.M., CUNHA, F.A., CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma.**; 17:80–3, 2005.

BEZERRA, S. B.; LEAL, L. K.; NOGUEIRA, N. A.; CAMPOS, A. R. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP+ channels. **J Med Food.** v. 12, n. 6, p. 1403-6, 2009.

BLANTZ, R.C., DENG, A., MIRACLE, C.M., THOMSON, S.C. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. **Trans. Am. Clin. Climatol.Assoc.**,vol.118, p.23-43, 2007.

BONVENTRE, J.V., WEINBERG, J.M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **J Am SOC Nephrol**, vol.14(8), p.2199-210, 2003.

BONVENTRE, J. V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. **J Am SocNephrol.** v. 14, n. 1, p. 55–61, 2003.

BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, v. 241, p. 78–83, 2008

BONVENTRE, J. V. KIDNEY INJURY MOLECULE-1: A TRANSLATIONAL JOURNEY. **Transactions of the american clinical and climatological association**, v. 125, p. 293–299, 2014.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 123–128, 2012.

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

BOTELHO, M.A., NOGUEIRA, N.A.P., BASTOS, G.M., FONSECA, S.G.C., LEMOS T.L.G., MATOS, F.J.A., et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res**; 40:349–56, 2007.

BURNS, A. R.; HO, K. M. Urinary potassium excretion and its association with acute kidney injury in the intensive care unit. **Journal of Critical Care**, v. 46, p. 58–62, 2018.

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

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

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 167–170, 2008.

CAPASSO, F. et al. **Phytoterapy: a quick reference to herbal medicine**. Berlin: Springer, 2003. 424p.

CARVALHO PEDROSA, D. et al. Urinary KIM-1 in children undergoing nephrotoxic antineoplastic treatment: a prospective cohort study. **Pediatric Nephrology**, 2015.

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

CHATTERJEE, P.K, ZACHAROWSKI, K., CUZZOCREA, S., OTTO, M., THIEMERMANN, C. Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase reduce renal ischemia–reperfusion injury in the anesthetized rat in vivo. **FASEB J**, vol.14, p.641–651, 2000.

CHATURVEDI, S.; FARMER, T.; KAPKE, G. F. Assay validation for KIM-1: human urinary renal dysfunction biomarker. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 2, p. 128–34, 2009.

CHATTOPADHYAY, P.; SHEKUNOV, B. Y.; YIM, D.; CIPOLLA, D.; BOYD, B.; FARR, S. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 444-453, 2007.

CHERTOW, G. M., BURDICK, E., HONOUR, M., BONVENTRE, J. V., BATES, D.W. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol.16, no.11, p.3365–3370, 2005.

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

CHOI, E.K.; PARK, S.H.; LIM, J.A.; HONG, S.W.; KWAK, K.H.; PARK, S.S.; LIM, D.G.; JUNG, H. Beneficial Role of Hydrogen Sulfide in Renal Ischemia Reperfusion Injury in Rats. **Yonsei Med J.** 59(8):960-967, 2018.

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

COMPADRE, C. M.; ROBBINS, E. F.; KINGHORN, A. D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquires, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, p. 89-106, 1986.

CONG, G., CUI, L., ZANG, M., HAO, L. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by a polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides*. **Int J Biol Macromol.**, v.56, p. 14-19, 2012.

COSTA, S. M. O. et al. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 792-795. 2001.

COSTA, S. M. O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.

COSTA, J. C.; NETO, O. M. Insuficiência renal aguda. Simpósio: Urgência e emergência nefrológicas. V. 36, p.307-324, São Paulo, 2003.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

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

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

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

DAVIDE BOLIGNANO, VALENTINA DONATO, GIUSEPPE COPPOLINO, SUSANNA CAMPO, ANTOINE BUEMI, ANTONIO LACQUANITI, AND M. B. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 52, n. 3, p. 595–605, 2008.

DE BORST, M. H.; VAN TIMMEREN, M. M.; VAIDYA, V. S.; DE BOER, R. A.; VAN DALEN, M. B.; KRAMER, A. B. Induction of kidney injury molecule-1 in homozygous

Ren2 rats is attenuated by blockade of the reninangiotensin system or p38 MAP kinase. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 292, n. 1, p. 313-320, 2007.

DE MORAIS, S.R.; OLIVEIRA, T.L.; DE OLIVEIRA, L.P.; TRESVENSOL, L.M.; DA CONCEIÇÃO, E.C.; REZENDE, M.H.; FIUZA, T.S.; COSTA, E.A.; FERRI, P.H., DE PAULA, J.R. Essential Oil Composition, Antimicrobial and Pharmacological Activities of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) From São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil. **Pharmacogn Mag;** vol. 12(48):262-270, 2016.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–26, jun. 2009.

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

DESAI, M.M., GILL, I.S., RAMANI, A.P., SPALIVIERO, M., RYBICHI, L., KAOUK, J.H. The impact of warm ischemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. **BJU Int**, vol.95, p.377 – 83, 2005.

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

DING, C.; HAN, F.; XIANG, H.; WANG, Y.; LI, Y.; ZHENG, J. XUE, W.; DING, X.; TIAN, P. Probiotics ameliorate renal ischemia-reperfusion injury by modulating the phenotype of macrophages through the IL-10/GSK-3 β /PTEN signaling pathway. **Pflugers Arch**, 2018. doi: 10.1007/s00424-018-2213-1.

DITONNO, P., IMPEDOVO, S.V., PALAZZO, S., BETTOCCHI, C., GESULADO, L., GRANDALIANO, G., SELVAGGI, F.P. BATTAGLIA, M. Effects of ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: risk factors and early and long-term outcomes in a single center. **Transplant Proc.**, v. 45, n.7, p. 2641-4, 2014.

DITONNO, P.; IMPEDOVO, S. V.; PALAZZO, S.; BETTOCCHI, C.; GESUALDO, L.; GRANDALIANO, G.; SELVAGGI, F. P.; BATTAGLIA, M. Effects of ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: risk factors and early and long-term outcomes in a single center. **Transplant Proc.** v. 45, n. 7, p. 2641-4, 2015.

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

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

EATON, D.C., POOLER, J.P. **Fisiologia renal de Vander**. 6ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2006.

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

ESPOSITO E., MONDELLO, S., Di PAOLA, R., MAZZON, E., ITALIANO, D., PATERNITI, I., MONDELLO, P., ALOISI, C., CUZZOCREA, S. Glutamine contributes to ameliorate inflammation after renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, vol.383, p.493–508, 2011.

FABRI, R.L., NOGUEIRA, M.S., MOREIRA, J.R., BOUZADA, M.L.M., SCIO, E., 2011. Identification of Antioxidant and Antimicrobial Compounds of Lippia Species by Bioautography. **J Med Food**, vol. 14 (7/8), 840–846.

FATIMA, S., ARIVARASU, N.A., BANDAY, A.A., YUSUFI, A.N.K., MAHMOOD, R. Effect of potassium dichromate on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. **Human and Experimental Toxicology**, vol.24, p. 631–638, 2005.

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

FERREIRA, A.L.A. Ação de íons Fe^{+++} no sistema de óxido-redução do glutathione e na lipoperoxidação de membrana eritrócitos humanos [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 1994.

FERREYRA, C., VARGAS, F., GOMEZ, I.R., PEREZ, R., O'VALLES, F., OSUNA, A. Preconditioning with Triiodothyronine Improves the Clinical Signs and Acute Tubular Necrosis Induced by Ischemia/Reperfusion in Rats. **Plos One**, vol.8., 2013.

FOLEY, D.P., CHARI, R.S. Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies. **Transplant Rev**, vol.1, p.43– 53, 2007.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FONTENELLE, R.O.S., MORAIS, S.M., BRITO, E.H.S., KERNTOPF, M.R., BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A., et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **J Antimicrob Chemother.**; 59:934–40, 2007.

FUNARI, C. S. et al. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2086-2094, 2012.

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

GANG, G.T., HWANG, J.H., KIM, Y.H., NOH, J.R., KIM, K.S., LEONG, J.Y., CHOI, D.E., LEE, K.W., LUNG, J.Y., SHONG, M., LEE, C.H. Protection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, vol.67, p.139–149, 2013.

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

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

GERALDES, P. Protein phosphatases and podocyte function. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 27, n. 1, p. 49–55, 2018.

GILL, N., NALLY, J.V., FATICA, R.A. Failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis, and management. **Chest.**, vol.128, p.2847, 2005.

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

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

GIUSTARINI, D. *et al.* Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. **Nature Protocols**, v. 8, n. 9, p. 1660–1669, 2013.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMES, G. A. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, 2012.

GONZÁLES, J. Flora Digital de La Selva – **Verbenaceae. Draft-Borrador.** Organización para Estudios Tropicales, 2006. 10p.

GRANDALIANO, G.; GESUALDO, L.; RANIERI, E.; MONNO, R.; STALLONE, G.; SCHENA, F. P. Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. **Transplantation**, v. 63, p. 414–420, 1997.

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

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

GU, L.; TSENG, S. C.; ROLLINS, B. J. Monocyte chemoattractant protein-1. **Chemical immunology**, v. 72, p. 7–29, jan. 1999.

GUIMARÃES, L.G.; DA SILVA, M.L.; REIS, P.C.; COSTA, M.T.; ALVES, L.L. General Characteristics, Phytochemistry and Pharmacognosy of **Lippia sidoides**. at **Prod Commun**.10(11):1861-7, 2015.

GUYTON & HALL, **Tratado de Fisiologia Médica**, 9ª Edição Rio de Janeiro, 1997, Guanabara.

Haase, M., Bellomo, R., Devarajan, P., Haase-Fielitz A. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**. Vol.35:S215, 2009.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, vol.142, p.231-255, 2004.

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

HAN, W. K. et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**, v. 62, n. 1, p. 237– 244, 2002.

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

HARRIS, D. G.; MCCRONE, M. P.; KOO, G.; WELTZ, A. S.; CHIU, W. C.; SCALEA, T. M.; DIAZ, J. J.; LISSAUER, M. E. Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill surgical patients. **J Crit Care.** v. 30, n. 1, p. 102-6, 2015.

HAYASHI, T.; TOKURIKI, S.; OKUNO, T.; OHTA, G.; IGARASHI, A. Urinary podocalyxin as a possible novel marker of intrauterine nephrogenesis and extrauterine podocyte injury. **Pediatr Nephrol**, v. 32, p. 1891–1896, 2017.

HAYACIBARA, M.F., KOO, H., ROSALEN, P.L., DUARTE, S., FRANCO, E.M., BROWEN, W.H., IKEGAKI, M., CURY, J.A. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J. Ethno pharmacol**, vol.100, p.110-115, 2005.

HEIMLICH, J.B., CHIPOKA, G., ELSHERIF, L., DAVID, E., ELLIS, G., KAMTHUNZI, P., KRYSIAK, R., MAFUNGA, P., ZHOU, Q., CAI, J., GOPAL, S. Nephryn as a biomarker of sickle cell glomerulopathy in Malawi. **Pediatric Blood Cancer**, 65;e26993, 2017.

HEUVEL, M. G. W., VAN DEN A., BAST G.R.M.M., HAENEN A.W., AMBERGEN, J.F., MERMANS, R.R.W.J. The role of antioxidants in ischaemia-reperfusion in a human DIEP flap model. **British Journal of Plastic Surgery**, 2012.

HEYMAN, S.N., ROSENBERGER, C., ROSEN, S. experimental ischemia-reperfusion: biases and myths – the proximal vs distal hypoxic tubular injury debate revisited. **KidneyInt**, vol.77(1), p.9-16, 2010.

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

HOMMOSS, A. (2008) **Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations**. Department of Biology, Chemistry and Pharmacy of the Freie Universität, p. 202.

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

HÖRMANN, K.; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review. **J Control Release**. 2015 Dec 14. pii: S0168-3659(15)30268-6. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.016. [Epub ahead of print].

HOSTE, E.A.J, SCHURGERS, M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is this problem? **Crit Care Med**, vol.36, p.146-151, 2008.

HU, L., YANG, C., ZHAO, T. Erythropoietin ameliorates renal ischemia and reperfusion injury via inhibiting tubulointerstitial inflammation. **J. Surg. Res.**, vol.176, p.260, 2012.

HU, C.; LI, L.; DING, P.; LI, L.; GE, X.; ZHENG, L.; WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, W.; WANG, N.; GU, H.; ZHONG, F.; XU, M.; RONG, R.; ZHU, T.; HU, W. Complement Inhibitor CR1g/FH Ameliorates Renal Ischemia Reperfusion Injury via Activation of PI3K/AKT Signaling. **J Immunol**. 2018 Nov 14. pii: ji1800987. doi: 10.4049/jimmunol.1800987.

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

HUMPHREYS, B. D., SOIFFER, R.J., MAGEE, C.C. Renal Failure Associated with Cancer and Its Treatment:An Update. **Am Soc Nephrol**, v.16, p.151–161, 2005.

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

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

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

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

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético.** Porto Alegre: Artmed. 2009.

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

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

KASHANI, K.; CHEUNGPASITPORN, W.; RONCO, C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 55, n. 8, p. 1074–1089, 2017.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 991 p.

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

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

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

KERLEY, R. N.; MCCARTHY, C. Biomarkers of glomerular dysfunction in pre-eclampsia – A systematic review. **Pregnancy Hypertension**, n. March, p. 0–1, 2018.

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

KIM, E.J., LEE, Y.J., AHN, Y.M., LEE, H., KANG, D.G., LEE, H.S. Renoprotective effect of *Alpiniae oxyphyllae* Fructus on ischemia/ reperfusion-induced acute renal failure. **Arch. Pharm. Res.**, vol.36, p.1004–1012, 2013.

KLATTE, T.; FICARRA, V.; GRATZKE, C.; KAOUK, J.; KUTIKOV, A.; MACCHI, V.; MOTTRIE A.; ET AL. A Literature Review of Renal Surgical Anatomy and Surgical Strategies for Partial Nephrectomy. **Eur Urol.**;68(6):980-92, 2015.

KOVACIC. P., SOMANATHAN, R. Unifying mechanism for eyetoxicity: electron transfer, reactive oxygen species, antioxidantbenefits, cell signaling and cell membranes. **Res. Cell Membr. Free Radic.**, vol.2, p.56–69, 2008.

KHUNDMIRI, S.J., ASGHAR, M., KHAN, F., SALIM, S., YUSUFI, A.N.K. Effect of ischemia and reperfusion on enzymes of carbohydrate metabolism in rat kidney. **Journal of Nephrology**, vol.17, p.1–7. 2004.

KOO, H.; HWANG, S.; KIM, T.H.; KANG, S.W.; OH, K.H.; AHN, C.; KIM, Y.H. The ratio of urinary sodium and potassium and chronic kidney disease progression: Results from the KoreaN Cohort Study for Outcomes in Patients with Chronic Kidney Disease (KNOW-CKD). **Medicine (Baltimore)**;97(44):e12820, 2018.

KRAMANN, R.; KUSABA, T.; HUMPHREYS, B. D. Who regenerates the kidney tubule? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 6, p. 903–910, 2015.

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. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 296, n. 1, p. F25–F33, 2009.

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

LAMEIRE, N., VAN BIESEN, W., VANHOLDER, R. Acute renal failure. **The Lancet**, vol.365, no.9457, p.417–430, 2005.

LAMEIRE, N. H.; BAGGA, A.; CRUZ, D.; MAESENEER, J. De; ENDRE, Z.; KELLUM, J. A.; LIU, K. D.; MEHTA, R. L.; PANNU, N. Global Kidney Disease 2 Acute kidney injury : an increasing global concern. **The Lancet**, v. 382, n. 9887, p. 170–179, 2013.

LANE, B.R.; BABITZ, S.K.; VLASAKOVA, K.; WONG, A.; NOYES, S.L.; BOSHOVEN, W.; GRADY, P.; ZIMMERMAN, C.; ENGERMAN, S.; GEBBEN, M.; TENEN, M.; GLAAB, W.E. Evaluation of Urinary Renal Biomarkers for Early Prediction of Acute Kidney Injury Following Partial Nephrectomy: A Feasibility Study. **Eur Urol Focus**. 2018 Nov 10. pii: S2405-4569(18)30318-3. doi: 10.1016/j.euf.2018.10.017.

LASZLO, E.; JUHASZ, T.; VARGA, A.; CZIBERE, B.; KOVACS, K.; DEGRELL, P.; HORVATH, G.; JANCZO, G.; SZAKALY, P.; TAMAS, A.; REGLODI, D. Protective Effect of PACAP on Ischemia/Reperfusion-Induced Kidney Injury of Male and Female Rats: Gender Differences. **J Mol Neurosci**. 2018 Nov 16. doi: 10.1007/s12031-018-1207-y

LEE, S.-Y.; CHOI, M. E. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: Beyond albuminuria. **Pediatr Nephrol**, v. 30, n. 7, p. 1063–1075, 2016.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição, Clinica**, v.2, p.1-14, 2003.

LI, L.; NANDI, I.; KIM, H. K. Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. **Int. J. Pharm.**, v.237, p.77-85, 2002.

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

LIU, Y., LIANG, W., YANG, Y., PAN, Y., YANG, Q., CHEN, X., SINGHAL, P.C., DING, G. IQGAP1 regulates actin cytoskeleton organization in podocytes through interaction with nephrin. *Cell Signal*, 27:867–77, 2015.

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

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

LIoudAKI, E.; STYLIANOU, K. G.; PETRAKIS, I.; KOKOLOGIANNAKIS, G.; PASSAM, A.; MIKHAILIDIS, D. P.; DAPHNIS, E. K.; GANOTAKIS, E. S. Increased Urinary Excretion of Podocyte Markers in Normoalbuminuric Patients with Diabetes. **Nephron**, v. 131, n. 1, p. 34–42, 2015.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

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

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

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

MACAMBIRA, L. M. A. et al. Naphthoquinoids from *Lippia sidoides*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 310-312, 1986.

MACIEL, M. V. et al. Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* sobre *Lutzomyia longipalpis*. **Ciência Animal**, v. 19, n. 2, p. 77-87, 2009.

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

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

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 79, p. 84-87, 1998.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste brasileiro. 3. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 2007.

MAXWELL, S.R.J., LIP, G.Y.H. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **Int. J. Cardiol.**, vol.58, p.95-117, 1997.

MELGAREJO, E.; MEDINA, M. A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; URDIALES, J. L. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 5, p. 998–1001, maio 2009.

MENG, Y.; JIANG, Z.; LI, N.; ZHAO, Z.; CHENG, T.; YAO, Y.; WANG, L.; LIU, Y. Protective Effects of Methane-Rich Saline on Renal Ischemic-Reperfusion Injury in a Mouse Model. **Med Sci Monit**, 24: 7794-7801, 2018.

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

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

MISHRA, J.; MA, Q.; PRADA, A.; MITSNEFES, M.; ZAHEDI, K.; YANG, J.; BARASCH, J.; DEVARAJAN, P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. **Journal of the American Society of Nephrology.** n. 14, p. 2534-43, 2003.

MISHRA, J. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. **Lancet**, n. 365, p. 1231– 1238, 2005.

MOGHIMIA, R.; GHADERI, L.; RAFATIA, H.; ALIAHMADIB, A.; MCCLEMENTSC, D. J. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 410–415, 2016.

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

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

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

NAVRATILOVA, Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 150, n. 2, p. 191–204, nov. 2006.

NG, D.P., TAI, B.C., TAN, E., LEONG, H., NURBAYA, S., LIM, X.L., CHIA, K.S., WONG, C.S., LIM, W.Y., HOLTHOFER, H. Nephriuria associates with multiple renal traits in type 2 diabetes. **Nephrol Dial Transplant**; 26:2508–14, 2011.

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

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

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

OLIVEIRA, E.M., RAMIRES, P.R., LANCHA JUNIOR, A.H. Nutrição e bioquímica do exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, V. 18, p. 7-19, 2004.

PADHY, M.; KAUSHIK, S.; GIRISH, M. P.; MOHAPATRA, S.; SHAH, S.; KONER, B. C. Serum neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and cystatin C as early predictors of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary intervention. **Clin Chim Acta.** v. 435, p. 48-52, 2014.

PAGLIUSO, R.G., GOLONI-BERTOLLO, E.M., ABBUD FILHO, M., PAVARINO-BERTELLI, E.C. Estresse oxidativo e Disfunção Crônica do Enxerto: Renal Oxidative stress and Renal Chronic Allograft Dysfunction. **Arq. Ciênc. Saúde.**, v.13, n.4, p.223-227, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SABBISSETTI, V.; BONVENTRE, J. V. Brenner and Rector's The Kidney. Ninth Edit ed. [s.l.] **Elsevier**, 2012.

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

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

SAHNA, E., PARLAKPINAR, H., CIHAN, O.F., TURKOZ, Y., ACET, A. Effects of aminoguanidine against renal ischemiareperfusion injury in rats. **Cell Biochem Funct.**, vol.24, p.137–141, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, A. C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, D.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 158-165, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TORRAS, J., CRUZADO, J.M., GRYNIO, J.M. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. *Transplant. Proc.*, vol.31, p.2217-8, 1999.

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

VALENTIN, A. et al. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1439-1442, 1995.

VART, P.; GRAMS, M. E. Measuring and Assessing Kidney Function. **Seminars in Nephrology**, v. 36, n. 4, p. 262–272, 2016.

VERAS, H. N. H. et al. Topical anti-inflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 179–185, 2013.

VIEDT, C.; ORTH, S. R. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 17, n. 12, p. 2043–7, dez. 2002.

WADA, Y., ABE, M., MORITANE, H., MITORI, H., KONDO, M., KEIKO, T., EGUCHI, M., IMASATO, A., INOKI, Y., et al. Potential of urinary nephrin as a biomarker reflecting podocyte dysfunction in various kidney disease models. **Experimental Biology and Medicine**, 241: 1865–1876, 2016.

WELSH, G. I.; SALEEM, M. A. Nephrin — signature molecule of the glomerular podocyte ? **Journal of Pathology**, v. 220, p. 328–337, 2010.

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

WEVER, K.E., WAGENER, F.A.D.T.G., FRIELINK, C., BOERMAN, O.C., SCHEFFER, G.J. ALLISON, A. MASEREEUW, R., RONGEN, G.A. Diannexin

protects against renal ischemia reperfusion injury and targets phosphatidylserines in ischemic tissue. **PLoS One**, v.6, 2011.

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

XUEZHU, L. I.; CIJIANG, H. E. J. An update : the role of Nephtrin inside and outside the kidney. **Sci China Life Sci**, v. 58, n. 7, p. 649–657, 2015.

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

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

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

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

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

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

ZHENG, H.; LAN, J.; LI, J.; LV, L. Therapeutic effect of berberine on renal ischemia-reperfusion injury in rats and its effect on Bax and Bcl-2. **Exp Ther Med.**16(3):2008-2012, 2018.