



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

MARIANA MACIEL CAVALCANTI

**AS 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIFENILCHALCONAS PROTEGEM AS
CÉLULAS TUBULARES RENAIIS CONTRA OS DANOS OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS CAUSADOS PELA CETAMINA – POSSÍVEL
ENVOLVIMENTO DAS VIAS JNK/46A E MAPK/CJA**

Fortaleza – CE

2023

MARIANA MACIEL CAVALCANTI

**AS 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIFENILCHALCONAS PROTEGEM AS
CÉLULAS TUBULARES RENAIIS CONTRA OS DANOS OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS CAUSADOS PELA CETAMINA – POSSÍVEL
ENVOLVIMENTO DAS VIAS JNK/46A E MAPK/CJA**

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutorado em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

FORTALEZA – CE

2023

AS 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIFENILCHALCONAS PROTEGEM AS
CÉLULAS TUBULARES RENAIIS CONTRA OS DANOS OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS CAUSADOS PELA CETAMINA – POSSÍVEL
ENVOLVIMENTO DAS VIAS JNK/46A E MAPK/CJA

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutorado em Farmacologia.

Aprovada em: 10/03/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)

Prof. Dra. Suzana Barbosa Bezerra (UNIFAMETRO)

Prof. Dra. Renata de Sousa Alves (UFC)

Prof. Dra. Marcia Marinho Machado (UECE)

Prof. Dra. Lucienne da Silva Lara Morcillo (UFRJ)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C3662 Cavalcanti, Mariana Maciel.
As 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil chalconas protegem as células tubulares renais contra os danos oxidativos e inflamatórios causados pela cetamina - possível envolvimento das vias JNK/46A e MAPK/CJA / Mariana Maciel Cavalcanti. – 2023.
113 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
Coorientação: Profa. Dra. Tiago Lima Sampaio.
1. Chalconas. 2. Antioxidante. 3. Apoptose. 4. MAPK. 5. JNK. I. Título.

CDD 615.1

"Ore, trabalhe e leia"

São Bento.

Aos meus filhos, Júlia e Carlos Eduardo,

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, minha maior fonte de força e espiritualidade, sendo nele onde encontro minha fé para seguir em frente.

A **São Bento**, que ocupa um lugar em minha vida extremamente importante, sendo o santo que escolhi como meu guia. Em momentos difíceis, a Cruz Sagrada foi minha luz.

Aos meus filhos, a **Júlia**, minha companheira em todos os momentos, que sempre me resgatou para viver os meus sonhos e mostrou que com ela posso mais, e o **Cadu**, que não chegou ainda, mas já tomou um espaço imenso em meu coração, me encheu de vida e garra novamente, trazendo com sua chegada mais alegria e amor para nossa família.

Aos **meus pais**, pessoas as quais agradeço o dom da vida e todo o apoio diário e constante! Amo vocês! **Mamãe**, você foi meu pilar desde sempre e hoje mais ainda diante de qualquer circunstância vivida. **Papai**, sei do orgulho que sentes por mim e o tanto de amor que transborda de você.

Ao **Ítalo**, que além marido, namorado e cúmplice, foi a pessoa que mais segurou minha mão em toda minha caminhada! Uma história de amor, que se tornou meu pilar, meu sustento! Obrigada por todos os momentos que você acreditou em mim, quando nem eu acreditava! Te amo sempre.

Ao meu irmão, **Lucas Maciel**, que mesmo distante, sempre esteve presente quando precisei e mesmo para mandar mensagens me aperreando! Conte comigo, sempre.

As **minhas tias, primas e família**, por todo apoio e inspiração em sermos sempre unidos e fortes!

Ao **vovô Caruso**, que não está em plano terrestre, mas se fez presente em meus sonhos diversas vezes, sendo capaz de transmitir amor e calma!

A profa. **Alice Martins** e prof. **Tiago Sampaio**, que dedicaram seu tempo e experiência para me mostrar que tudo valeu a pena!

Aos **professores colaboradores desse trabalho**, bem como aos **professores da banca**, obrigada pelo auxílio nessa conquista!

As **minhas amigas e amigos**, que são poucos e bons, e isso basta! Obrigada por dedicarem seu tempo e me fazerem sentir especial diariamente!

Aos **colegas do LBFBC**, em especial, ao Emanuel Magalhães, por todo apoio. Essa conquista também é sua!

Gratidão a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de estudo concedida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Farmacologia** por me permitir concluir com grande louvor essa etapa e outras.

RESUMO

AS 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIFENILCHALCONAS PROTEGEM AS CÉLULAS TUBULARES RENAIIS CONTRA OS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS CAUSADOS PELA CETAMINA – POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DAS VIAS JNK/46A E MAPK/CJA

A nefrotoxicidade induzida por fármacos é uma das causas de lesão renal aguda (LRA), onde medicamentos, como a cetamina, podem causar danos renais por morte celular e estresse oxidativo. Diante do processo de alteração do equilíbrio óxido-redutor e morte celular produzida por esse fármaco, é importante o estudo de moléculas capazes de regular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como as chalconas. Essas moléculas anti-inflamatórias e antioxidantes, presentes na biodiversidade brasileira, permitem a otimização de suas estruturas, conferindo melhora na sua atividade farmacológica. O trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o efeito citoprotetor da 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalcona (HTMCX), proveniente da espécie *Croton anisodontus* Müll.Arg, contra o dano celular tubular induzido pela cetamina e comparar seu efeito com as suas chalconas semissintéticas. Células HK-2 foram tratadas com concentrações não tóxicas de chalconas (31,25 μ M e 15,62 μ M) e/ou Cetamina IC₅₀ (2,55 mM). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. A citometria de fluxo foi usada para avaliar a morte celular, estresse oxidativo e o potencial transmembrana mitocondrial. Parâmetros que avaliam o equilíbrio óxido-redutor (SOD e GSH), Molécula da Injúria Renal 1 (KIM-1) e biomarcadores inflamatórios (IL-6 e IFN- γ) foram determinados. Alterações ultraestruturais foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Por fim, foram realizados ensaios de *docking* molecular com possíveis vias de ação das moléculas em estudo. O tratamento com HTMCX e suas chalconas semissintéticas, dentre as quais se destaca a CPN2F, melhorou a viabilidade celular após indução da lesão com Cetamina, com redução da apoptose e liberação de KIM-1. Isso foi associado a uma atenuação parcial das alterações morfológicas, estando relacionado a um efeito antioxidante e protetor nas mitocôndrias. As chalconas reduziram a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por cetamina nas células. Esses efeitos parecem estar relacionados à ligação das chalconas às proteínas da via JNK/p38 MAPK.

Palavras-chave: Chalconas; Antioxidante; Apoptose; MAPK/JNK

ABSTRACT

2-HYDROXY-3,4,6-TRIMETHOXYPHENYLCHALKONES PROTECT RENAL TUBULAR CELLS AGAINST OXIDATIVE AND INFLAMMATORY DAMAGE CAUSED BY KETAMINE – POSSIBLE INVOLVEMENT OF THE JNK/46A AND MAPK/CJA PATHWAYS

Drug-induced nephrotoxicity is one of the causes of acute kidney injury (AKI), where drugs such as ketamine can cause kidney damage through cell death and oxidative stress. In view of the process of alteration of the oxide-reductive balance and cell death produced by this drug, it is important to study molecules capable of regulating the production of reactive oxygen species (ROS), such as chalcones. These anti-inflammatory and antioxidant molecules, present in Brazilian biodiversity, allow the optimization of their structures, improving their pharmacological activity. The objective of this work was to evaluate the cytoprotective effect of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenylchalcone (HTMCX), from the species *Croton anisodontus* Müll.Arg, against tubular cell damage induced by ketamine and to compare its effect with their semi-synthetic chalcones. HK-2 cells were treated with non-toxic concentrations of chalcones (31.25 μ M and 15.62 μ M) and/or Ketamine IC₅₀ (2.55 mM). Cell viability was assessed by the MTT assay. Flow cytometry was used to assess cell death, oxidative stress and mitochondrial transmembrane potential. Parameters that evaluate the oxide-reductive balance (SOD and GSH), Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1) and inflammatory biomarkers (IL-6 and IFN- γ) were determined. Ultrastructural changes were observed by scanning electron microscopy. Finally, molecular docking tests were carried out with possible pathways of action of the molecules under study. Treatment with HTMCX and its semi-synthetic chalcones, among which CPN2F stands out, improved cell viability after lesion induction with Ketamine, with a reduction in apoptosis and KIM-1 release. This was associated with a partial attenuation of morphological changes, being related to an antioxidant and protective effect on mitochondria. Chalcones reduced ketamine-induced production of pro-inflammatory cytokines in cells. These effects seem to be related to the binding of chalcones to proteins in the JNK/p38 MAPK pathway.

Keywords: Chalcones; Antioxidant; Apoptosis; MAPK/JNK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas da Cetamina e seus isômeros (R-Cetamina e S+Cetamina)	24
Figura 2: Formação de radicais livres através da molécula de oxigênio.....	27
Figura 3: Via apoptótica extrínseca.....	30
Figura 4: Via apoptótica intrínseca.....	31
Figura 5: Via apoptótica induzida pelo estresse do retículo endoplasmático.....	33
Figura 6: Estrutura geral das chalconas (E) (1,3-difenil-2-propen-1-ona) e (Z) (1,3-difenil-2-propen-1-ona)	36
Figura 7: Marmeleiro-cravo (<i>Croton anisodontus</i> Müll. Arg)	36
Figura 8: Estrutura química da 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX).....	37
Figura 9: Princípio da metodologia da utilização de Anexina V e Iodeto de Propídio para detecção de mecanismos de morte celular.....	49
Figura 10: Princípio do método de análise de formação de ERO citoplasmáticas usando DCFH-DA.....	50
Figura 11: Princípio do ensaio de acúmulo de superóxido.....	52
Figura 12: Síntese, degradação e regeneração da molécula de glutathiona (GSH).....	53
Figura 13: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de Cetamina.....	58
Figura 14: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de HTMCX.....	60
Figura 15: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes das chalconas semissintéticas CPN2F, CPNDIC1 e CPN3NO2.....	62
Figura 16: Níveis de Molécula da Injúria Renal (KIM-1) em células HK-2.....	64
Figura17: Eletromicrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células renais HK-2 em aerobiose.....	65
Figura 18: Eletromicrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células renais HK-2 submetidas a lesão pelo tratamento com Cetamina.....	66
Figura 19: Eletromicrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células renais HK-2 submetidas ao tratamento com HTMCX, CPN2F, CPNDIC1 e CPN3NO2.....	67
Figura 20: Ensaio de avaliação da via de morte celular em células tubulares renais. As células necróticas foram marcadas por PI e as células apoptóticas foram marcadas por Anexina-V.....	68

Figura 21: Gráficos <i>Density Plot</i> representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por PI (Iodeto de Propídio) e as células apoptóticas foram marcadas por Anexina V	69
Figura 22: Análise do estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas em células HK-2 por citometria de fluxo (Ensaio DCFH-DA) ..	70
Figura 23: Histograma representativo do ensaio (DCFH-DA), mostrando o grupo tratado com HTMCX e CPN2F 31,25 e 15,62 μ M.....	72
Figura 24: Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células HK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.....	73
Figura 25: Histograma representativo do ensaio (Rodamina 123), demonstrando o grupo tratado com HTMCX e CPN2F nas concentrações de 31,25 e 15,62 μ M.....	75
Figura 26: Avaliação do acúmulo superóxido (O_2^-) em células renais HK-2.....	76
Figura 27: Avaliação do estresse oxidativo por meio da medida dos níveis de glutatona reduzida (GSH) em células HK-2.....	78
Figura 28: Níveis de interferon-gamma (IFN- γ) no sobrenadante de células HK-2.....	79
Figura 29: Níveis de interleucina-6 (IL-6) no sobrenadante de células HK-2.....	81
Figura 30: Interações entre HTMCX, CPN2F, cetamina e o inibidor 46A com JNK....	85
Figura 31: Interações entre HTMCX, CPN2F, cetamina e o inibidor CJA com MAPK.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de classificação para lesão renal aguda (LRA), distúrbio renal agudo (DRA) e doença renal crônica (DRC).....	19
Tabela 2 – Estruturas das Chalconas semissintéticas derivadas da 2-hidroxi- 3,4,6-trimetoxiacetofenona.....	41
Tabela 3: Percentual de viabilidade celular das células HK-2 tratadas com diversas concentrações de HTMCX e Chalconas semissintéticas.....	57
Tabela 4: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de Cetamina.....	59
Tabela 5: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de HTMCX.....	61
Tabela 6: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes das chalconas semissintéticas CPN2F, CPNDIC1 e CPN3NO2.....	63
Tabela 7: Níveis de Molécula da Injúria Renal (KIM-1) em células HK-2.....	64
Tabela 8: Avaliação da produção de EROs citoplasmáticas. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células renais HK-2 submetidas ao tratamento com Cetamina e tratadas com diferentes concentrações de chalconas (produto natural e semissintética)	71
Tabela 9: Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células HK2 submetidas ao tratamento com Cetamina e tratadas com diferentes concentrações de chalconas (produto natural e semissintética)...	74
Tabela 10: Avaliação do acúmulo de superóxido (O_2^-) em células renais HK-2.....	77
Tabela 11: Níveis de IFN- γ (pg/mL) no sobrenadante de células HK-2.....	80
Tabela 12: Níveis de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante de células HK-2.....	81
Tabela 13: Energia de interação e RMDS das chalconas, cetamina e inibidores dos ligantes - alvo em ensaio de <i>docking</i> molecular.....	82
Tabela 14: Interações teóricas entre HTMCX, CPN2F, cetamina e o inibidor 46A com JNK.....	83
Tabela 15: Interações teóricas entre HTMCX, CPN2F e cetamina e o inibidor CJA com MAPK.....	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LRA – Lesão Renal Aguda

KDIGO - *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

DRA - Distúrbio e Doença Renal Aguda

DRC – Doença Renal Crônica

NTA – Necrose Tubular Aguda

HIV – Human Immunodeficiency Virus

COVID-19 – Doença do coronavírus 2019

TSR – Terapia de Substituição Renal

NIA - Nefrite intersticial aguda

ERO - espécies reativas de oxigênio

NMDA - N-metil D-Aspartato

LDH - Lactato desidrogenase

KIM-1 - Molécula da Injúria Renal 1

ATP - Adenosina trifosfato

CTE - cadeia transportadora de elétrons

SOD - superóxido dismutase

GSH - glutathiona reduzida

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

FASL - Fas ligante

RTNF-1 - Receptor do fator de necrose tumoral 1

RFas - receptor Fas

CSMC - complexo de sinalização de morte celular

APAF-1 - Fator de ativação de protease apoptótica-1

Cit C – Citocromo C

DNA - ácido desoxirribonucleico

PERK - Quinase do retículo endoplasmático semelhante ao RNA da proteína quinase

IRE-1 - Enzima que necessita de inositol 1

ATF6 - Fator de transcrição ativador 6 (ATF6).

TRAF2-ASK1- fator 2-apoptose regulador de sinal de quinase 1

JNK - cJun N-terminal quinase 1

CHOP - *CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein*

DR-5 - *death receptor 5*

BIM - *Bcl2-interacting mediator of cell death*

BCL-2 - *B-cell lymphoma 2*

HTMCX - 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona

CCD - cromatografia em camada delgada

CPNB - (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) -3-phenylprop-2-en-1-one

CPNC - (2E,4E) -1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) -5-phenylpenta-2,4-dien-1-one

CPN4Cl - (E)-3-(4-chlorophenyl) -1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one

CPNDICI - (E)-3-(2,4-dichlorophenyl) -1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one

CPN4F - (E)-3-(4-fluorophenyl) -1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one

CPN2F - (E)-3-(2-fluorophenyl) -1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one

CPN3NO2 - (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) -3-(3-nitrophenyl) prop-2-en-1-one

DMSO - dimetilsulfóxido

PBS - tampão fosfato

DMEM - Eagle Modificado por Dulbecco

SBF - soro bovino fetal

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

SDS - dodecilsulfato de sódio

ELISA – ensaio imunoabsorvente ligado à enzima

BSA - *Bovine Serum Albumin*

HRP - *Horseshoe Radish Peroxidase*

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

FSC – *Foward Scatter*

SSC – *Side Scatter*

FL - Leitores de fluorescência

IP - Iodeto de Propídio

DCFH-DA - (2',7'- diacetato de diclorofluoresceína).

DCFH - (2'-7'-diclorofluoresceína),

DCFoxi - (2'-7'-diclorofluoresceína oxidada),

Rho 123 - Rodamina 123

GSSG - dissulfeto de GSH oxidado

DTNB - (5,5'-ditiobis-(ácido 2- nitrobenzóico)),

IFN- γ - interferon-gama

IL-6 - Interleucina-6

TMB - substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

3D - tridimensionais

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

EPM - erro padrão da média

NK - Natural killer

JAK/STAT - Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 LESÃO RENAL AGUDA (LRA)	18
1.2 LESÃO RENAL INDUZIDA POR FÁRMACOS	20
1.2.1 <i>Cetamina</i>	23
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO	27
1.3.1 <i>Equilíbrio óxido-redutor celular.</i>	27
1.3.2 <i>O papel do estresse oxidativo na indução da morte celular.</i>	28
1.3.3 <i>O uso da Cetamina e o estresse oxidativo</i>	33
1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO APOPTÓTICA E SEUS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS ...	34
1.5 CHALCONAS E SUAS FONTES NATURAIS E SINTÉTICAS.	35
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 OBTENÇÃO DO PRODUTO NATURAL E CHALCONAS SEMISSINTÉTICAS	41
4.2 OBTENÇÃO DA CETAMINA	42
4.3 CULTURA DE CÉLULAS RENAIAS HK-2	43
4.3.1 <i>Obtenção, cultivo e manutenção da linhagem celular.</i> ,	43
4.3.2 <i>Citotoxicidade da HTMCX e chalconas semissintéticas em células renais HK-2.</i> 44	
4.3.3 <i>Citotoxicidade renal induzida por Cetamina em células renais HK-2.</i>	44
4.3.4 <i>Avaliação do efeito da HTMCX e das chalconas semissintéticas sobre a toxicidade em células renais induzida pela Cetamina</i>	45
4.4 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE KIM-1 NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS HK-2 TRATADAS COM CETAMINA.	45
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	46
4.6 ENSAIOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	47
4.6.1 <i>AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR.</i>	48
4.6.2 <i>Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) citoplasmáticas.</i> ...	49
4.6.3 <i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)</i>	51
4.7 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS RENAIAS HK-2	52

4.7.1 Avaliação do acúmulo de superóxido em células HK-2.....	52
4.7.2 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH).....	53
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS HK-2 TRATADAS COM CETAMINA, HTMCX E CPN2F.....	54
4.9 ESTUDO <i>IN SÍLICO</i>.....	54
4.9.1 Obtenção das estruturas moleculares.....	54
4.9.2 Docking molecular.....	55
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 CITOTOXICIDADE DA HTMCX E CHALCONAS SEMISSINTÉTICAS EM CÉLULAS HK-2.....	56
5.2 CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR CETAMINA EM CÉLULAS HK-2.....	58
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DA HTMCX SOBRE A TOXICIDADE EM CÉLULAS RENAI HK-2 INDUZIDA PELA CETAMINA.....	60
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DAS CHALCONAS SEMISSINTÉTICAS INTITULADAS CPN2F, CPNDICL E CPN3NO2 SOBRE A TOXICIDADE EM CÉLULAS RENAI HK-2 INDUZIDA PELA CETAMINA.....	61
5.5 LIBERAÇÃO DA MOLÉCULA DA INJÚRIA RENAL (KIM-1) EM CÉLULAS HK-2.....	63
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS RENAI HK2.....	65
5.7 ENSAIOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	67
5.7.1 Avaliação de mecanismos de morte celular.....	67
5.7.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) citoplasmáticas. ...	69
5.7.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	72
5.8 AVALIAÇÃO DO ACÚMULO DE SUPERÓXIDO EM CÉLULAS HK-2.....	75
5.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSH.....	78
5.10 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS HK-2 TRATADAS COM CETAMINA.....	79
5.11 ESTUDO <i>IN SÍLICO</i>.....	82
5.11.1 Docking molecular.....	82
6 DISCUSSÃO.....	90
7 CONCLUSÃO.....	98
8. REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão Renal Aguda (LRA)

A lesão renal aguda (LRA) é uma condição clínica grave e comumente encontrada em doenças críticas, tais como insuficiência cardíaca grave, infecções generalizadas e outros. Possui um impacto altamente negativo nas taxas de morbimortalidade, pois, apesar dos avanços na ciência, o prognóstico da doença permanece ruim.

Estudos anteriores, que utilizaram as definições da *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), mostraram que a incidência da lesão renal aguda em pacientes adultos internados foi de 21,6%, enquanto em crianças hospitalizadas essa taxa aumentou para 33,7%. Além disso, tal desordem está associada a um aumento de quase 10 vezes na taxa de mortalidade de pacientes hospitalizados (SUSANTITAPHONG, P. *et al.* 2013; CHAWLA *et al.* 2014; WILSON *et al.* 2021).

Uma redução inesperada e abrupta na taxa de filtração glomerular, associada, frequentemente, a redução do fluxo sanguíneo renal define a LRA (KOZA, 2016), que é responsável por gerar a perturbação da homeostase renal, quando acontece a perda da função excretora, gerando acúmulo de metabólitos residuais, como creatinina e ureia. A redução da taxa de filtração glomerular (TFG) e a ativação do sistema renina-angiotensina levam a retenção de líquidos no paciente, o que pode causar um agravamento do quadro. Aliado a isso, os pacientes podem apresentar alterações na excreção de eletrólitos, como sódio, fosfato, potássio e cálcio (MCCOY & CHERTOW, 2020; KELLUM *et al.* 2021).

Em termos de diagnóstico clínico, se utiliza, geralmente, a avaliação de dois principais fatores: o aumento da creatinina sérica e a redução do débito urinário (PEERAPORN RATANA *et al.* 2019). A LRA é parte de uma variedade de condições renais denominadas de “Distúrbio e Doença Renal Aguda (DRA)”, podendo ser classificada, conforme mostrado na Tabela 1, onde a lesão renal aguda possui duração de no máximo 7 dias, sendo, então, classificada como distúrbio renal após esse período (KELLUM *et al.* 2021).

Tabela 1: Critérios de classificação para lesão renal aguda (LRA), distúrbio renal agudo (DRA) e doença renal crônica (DRC).

	Duração	Critérios funcionais	Critérios estruturais
LRA	≤ 7 dias	Aumento da Creatinina sérica em 50%; Aumento da Creatinina sérica maior que 0.3mg/dL; Oligúria maior ou igual a 6 horas.	Não definidos
DRA	< 3 meses	LRA ou taxa de filtração glomerular TFG<60ml/min/1.73m ² . Redução da taxa de filtração glomerular maior que 35%. Aumento da Creatinina Sérica maior que 50%.	Aumento da albuminúria e hematória (mais comum)
DRC	> 3 meses	Taxa de filtração glomerular menor que 60ml/min/1.73m ² .	Aumento da albuminúria

Fonte: adaptado de Kellum *et al.* (2021).

A LRA abrange várias etiologias, sendo dividida em três categorias: pré-renal, intrarrenal e pós-renal. A lesão pré-renal é comumente observada em pacientes hospitalizados e com doenças pré-existentes, mas não se exclui o seu desenvolvimento devido a causas adquiridas na comunidade, tais como a sepse. A lesão cursa com hipoperfusão renal leve a moderada e não leva a alterações estruturais nos rins, podendo ser causada por síndrome cardiorrenal, choque (hemorrágico, séptico e hipovolêmico), transplante renal e pelo uso de medicamentos. A lesão intrarrenal é estabelecida devido a manutenção da situação de hipoperfusão renal, o que pode gerar necrose tubular aguda (NTA), doenças renais glomerulares e vasculites agudas, tendo como causas comuns anemias, sepses, pielonefrite causadas por medicamentos ou metais pesados, nefropatias, nefrite intersticial aguda e outros. Por fim, a LRA pós-renal ocorre devido a um processo de obstrução com repercussão renal bilateral ou unilateral, como obstrução do trato urinário, obstrução ureteral, disfunção da bexiga etc. (BHATRAJU *et al.* 2020, KELLUM *et al.* 2021).

Fatores ambientais, socioeconômicos e culturais contribuem para o aumento da incidência da LRA, bem como as características próprias de cada paciente (idade e etnia), e a presença de comorbidades, a exemplo da hipertensão arterial sistêmica, doença renal

crônica pré-existente e diabetes mellitus, assim como o uso de alguns fármacos em intervenções cirúrgicas e quimioterapias, a presença de infecções por HIV, sepse, venenos animais e, mais recentemente, a infecção pelo vírus causador da “doença do coronavírus 2019 - COVID-19” (NEGI *et al.* 2018; PETEJOVA *et al.* 2020; CHAN *et al.* 2021). Outros estudos mostraram, ainda, que em países de baixa e média renda, as infecções e o choque hipovolêmico são as causas predominantes da LRA, sendo essa classificada como “LRA adquirida na comunidade”, já em países com renda alta, o processo da lesão se dá, principalmente, em pacientes hospitalizados e está relacionada à sepse, uso de medicamentos e procedimentos invasivos (KELLUM *et al.* 2021, VERMA & KELLUM, 2021).

Atualmente, existem algumas estratégias para evitar o desenvolvimento da LRA em pacientes hospitalizados, tais como otimizar a hemodinâmica do paciente, evitar nefrotoxinas e controlar a terapia com medicamentos possivelmente nefrotóxicos. Porém, a terapia de substituição renal (TSR), que inclui o processo de hemodiálise, diálise peritoneal, hemofiltração e transplante renal, ainda é a única opção terapêutica para LRA grave. Diversos são os estudos que avaliam o momento ideal para começar a TSR, visto que seu início precoce pode corrigir e controlar distúrbios metabólicos e remover toxinas urêmicas de forma rápida e eficaz. Porém, para pacientes cuja função renal pode se recuperar de forma espontânea, esse início antecipado pode gerar o risco de eventos adversos associados à TSR, tais como instabilidade hemodinâmica, sangramento e infecção da corrente sanguínea (LI *et al.* 2021; VIJAYAN, 2021).

1.2 Lesão renal induzida por fármacos.

Diversos são os fatores para a origem da lesão renal aguda (LRA) em pacientes da comunidade e hospitalizados. Dentre eles, se destaca, a nefrotoxicidade de fármacos utilizados na clínica, visto que eles podem atuar nos rins através de mecanismos de inflamação, hipóxia e estresse oxidativo, levando à lesão celular renal (EHRMANN *et al.* 2019).

Estudos epidemiológicos identificaram a toxicidade dos medicamentos como um fator contribuinte em 15–25% dos casos de LRA e determinaram que a lesão renal induzida por fármacos pode ser resultante da toxicidade dependente da dose, que é passível de tratamento e monitorização; ou da toxicidade idiossincrática independente da

dose, sendo essa mais difícil de ser controlada e tratada precocemente (UCHINO *et al.* 2005; WU & HUANG, 2018).

O mecanismo fisiopatológico envolvido se dá pelo fato de que a excreção dos fármacos se inicia a partir da filtração do sangue pelos glomérulos, onde a maioria deles e de seus metabólitos são removidos para a urina, ao mesmo tempo em que fármacos ligados a proteínas plasmáticas se mantêm na circulação sanguínea. A partir disso, o ultrafiltrado urinário entra no processo de reabsorção tubular, que é seguida pela remoção de íons e outros metabólitos através da reabsorção tubular ativa. Ou seja, durante todo o processo farmacocinético de excreção, a lesão renal pode ocorrer nos compartimentos dos néfrons (glomérulos, túbulos intersticiais e ductos coletores) (SCHETZ *et al.* 2005; GOODMAN & GILMAN, 2017; WU & HUANG, 2018).

A nefrotoxicidade induzida por fármacos é considerada uma combinação ampla de fatores, que podem estar ligados ao próprio medicamento e a sua capacidade em induzir uma lesão com base em sua estrutura química, dose, interações, metabolização e via de excreção renal. Porém, também devem ser levadas em conta as características dos pacientes, como a presença de comorbidades, fatores genéticos para metabolização de fármacos e, até a resposta imunológica e inflamatória do paciente (PERAZELLA, 2018). Estudos demonstraram que as características do fármaco, do paciente e as alterações na maneira de tratar a excreção da droga pelo rim podem explicar a variabilidade envolvida na toxicidade renal induzida por fármacos (PERAZELLA, 2012; HARTY *et al.* 2008).

Nesse contexto, muitos fármacos utilizados na clínica médica, medicamentos isentos de prescrição e agentes de diagnóstico já possuem seus mecanismos de ação elucidados, assim como os protocolos clínicos e estratégicos para prevenir a possível instalação de lesão renal causada por elas. Fato é que a dose do medicamento, duração da terapia, características do fármaco, tais como solubilidade, polaridade e estrutura e suas interações medicamentosas podem levar a instalação do processo de lesão renal (SLATER *et al.* 2017; PERAZELLA, 2018).

A maneira mais comum para indução de lesão renal por fármacos é através do efeito direto nos túbulos renais, levando a lesão e morte celular. A necrose tubular aguda (NTA), a nefrite intersticial aguda (NIA), a nefrose osmótica e a nefropatia cristalina são outras vias de nefrotoxicidade induzida por fármacos. O processo de NTA se dá de maneira dose-dependente, ocorrendo, principalmente, por mecanismos não inflamatórios e em pacientes com predisposição para a instalação do processo, como idosos, pacientes

hospitalizados ou com lesões renais pré-existentes (PANNU & NADIM, 2008; PETEJOVA *et al.* 2020).

A classe de antimicrobianos denominada de aminoglicosídeos é o exemplo mais comum da instalação de NTA, podendo apresentar uma incidência de 10-20% em pacientes em uso do fármaco (PANNU & NADIM, 2008). A nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeos é caracterizada pelo direcionamento seletivo das células epiteliais do túbulo proximal do córtex renal. Aproximadamente, 5% da dose administrada se acumula dentro das células após o processo de filtração glomerular. Em seguida, esses fármacos se acumulam nos componentes celulares, tais como lisossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, o que leva a ligação deles aos fosfolipídios de membrana, inativando, assim, a enzima fosfolipase levando a saída dos lisossomos para o citoplasma. Dessa forma, o antimicrobiano atinge o citoplasma e atua nas mitocôndrias, levando a ativação de vias da apoptose e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LECLERQ & TULKENS, 1999; WILLIAM *et al.* 2017). Ainda, na classe de antimicrobianos e atuando na região tubular renal, pode-se ter ação do antifúngico anfotericina B, que tem seu mecanismo de nefrotoxicidade mediado por danos a membrana plasmática, através da interação do fármaco com os lipídios membranares, e processos de estresse oxidativo (MAGALHÃES *et al.* 2022).

Outro processo que ocorre, como resultado da toxicidade renal de fármacos, é a nefrite intersticial aguda (NIA). Na NIA, se observa uma condição que afeta, especificamente, os túbulos renais e o interstício e é responsável por cerca de 3-15% da lesão renal aguda causada por fármacos. A maioria dos casos possui a característica de ser autolimitada e reversível, podendo causar sintomas sistêmicos, como piúria, eosinofília e granulomas em biópsia renal. Os antibióticos da classe dos betalactâmicos e das fluoroquinolonas, especialmente, a ciprofloxacina, são em 75% dos casos os responsáveis pela instalação de NIA nos pacientes (CARAVACA-FONTÁN, JUÁREZ & PRAGA, 2019; PERAZELLA *et al.* 2018).

Na nefrose osmótica causada por agentes terapêuticos hiperosmolares se observam alterações em células tubulares proximais e lesão renal em curso inicial. Estudos relatam que fármacos, como sacarose intravenosa, radiocontrastes de alta osmolaridade e, principalmente, imunoglobulinas intravenosas, são capazes de induzir o processo de nefrose osmótica em pacientes com injúria renal pré-existente e idosos (SCHETZ *et al.* 2005; PANNU & NADIM, 2008).

Por fim, a nefropatia cristalina induzida por fármacos, que é mais comumente conhecida como cálculo renal, representa cerca de 1-2% dos processos de litíase renal analisados em laboratórios. Aqui, dois mecanismos estão envolvidos, onde no primeiro o fármaco se deposita formando o cálculo renal em si e, no segundo, onde o fármaco leva a formação de cálculos através do seu metabolismo, que é responsável por interferir na metabolização do cálcio, oxalato, fosfato, ácido úrico e, até no pH urinário. Antirretrovirais, como ritonavir, efavirenz e raltegravir, cefalosporinas, sulfonamidas, metotrexato, felbamato, alopurinol e outros são alguns exemplos de fármacos capazes de provocar nefrolitíase (DOUDON *et al.* 2018).

Além do que foi anteriormente relatado tem-se que a utilização de fármacos que atuam como anestésicos em procedimentos cirúrgicos pode causar alterações no funcionamento dos rins. O processo de LRA, causado pelo uso desses fármacos, pode ocorrer por diversos mecanismos, como através do efeito direto das substâncias anestésicas sobre as estruturas funcionais do rim, efeitos relacionados a individualidade de cada paciente e, por fim, efeitos provenientes da combinação entre o uso do anestésico e a cirurgia em si (MERCATELLO, 1990). A exemplo disso, a anestesia halogenada é utilizada como anestesia geral e pode causar redução do fluxo plasmático renal com redução acentuada da taxa de filtração glomerular e diminuição do débito urinário, podendo, ainda, causar excessiva liberação de íons flúor, com conseqüente formação de fluoretos, que podem gerar lesões graves à nível tubular renal.

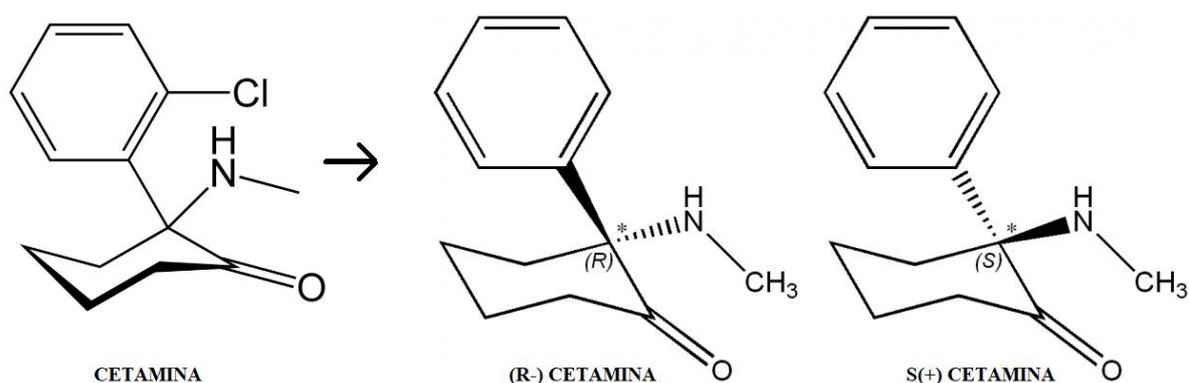
Dentre os fármacos que constituem o grupo, destaca-se o metoxiflurano, pois apresenta alta capacidade de provocar lesão tubular. Há, ainda, estudos demonstrando que halotano, isoflurano e enflurano foram responsáveis por alterar as concentrações de creatinina em pacientes hospitalizados (SARAIVA, 1994; DURAL *et al.* 1995; ALIZADEH & FARD, 2019). A literatura traz inúmeros relatos associando o uso de anestésicos e as alterações renais, como aquelas causadas pelo uso de opioides, relaxantes e bloqueadores neuromusculares, barbitúricos e anestésicos dissociativos, como a cetamina (ALIZADEH & FARD, 2019).

1.2.1 Cetamina

Cetamina (2-(2-clorofenil) -2-(metilamino) -ciclohexanona) é um anestésico intravenoso de ação rápida derivado da fenciclidina, que começou a ser comercializada para uso humano em 1970, pois ao contrário da sua precursora, apresentava menores efeitos adversos, como alucinações e disforia. Esse fármaco pode se apresentar na forma

de dois isômeros (Figura 1), que possuem potenciais clínicos diferentes, sendo a forma (S+) -cetamina, aproximadamente, três a quatro vezes mais potente que a forma (R-) – cetamina. A molécula da cetamina apresenta peso molecular de 274,4 M, ponto de fusão de 258°C a 261°C e a capacidade de ser solubilizada em água e lipídios, o que a permite ser administrada por diversas vias, dentre as quais estão intravenosa, intramuscular, retal, oral e intranasal, sendo vias utilizadas para procedimentos com anestesia geral, onde a concentração máxima, no plasma, deve estar entre 5-10 µM e, mesmo assim, pode acarretar efeitos adversos. Além disso, para procedimentos com analgesia, a cetamina pode ser utilizada pelas vias já citadas e de maneira transdérmica e subcutânea. (SCHUTTLER & SCHWILDEN, 2008; ZANOS *et al.* 2018; NOWACKA & BORCZYK, 2019).

Figura 1: Moléculas da Cetamina e seus isômeros (R-Cetamina e S+Cetamina).



Fonte: adaptado de Schuttler & Schwilden, (2008).

Em termos farmacocinéticos, existem dados mostrando que a cetamina é conhecida por proporcionar uma “anestesia dissociativa”, ou seja, o paciente apresenta o estado de analgesia e anestesia sem perda de consciência e com manutenção de seus reflexos faríngeos e laríngeos. Sua biodisponibilidade pode chegar a até 93%, quando administrada pela via intramuscular e seu volume de distribuição é alto, pois apresenta baixa ligação as proteínas plasmáticas. A meia vida dos dois isômeros da cetamina é semelhante e apresenta duração de 2 a 4 minutos. Esse fármaco é extensamente metabolizado pelas enzimas do citocromo P450, principalmente, a CYP2B6 e CYP3A4, que promovem a sua biotransformação através da desmetilação da cetamina em norcetamina, subsequentemente, metabolizada em desidronorcetamina e

hidroxinorcetamina. Esses metabólitos apresentam hidrofiliçidade, sendo, portanto, capazes de serem eliminados através da urina. No quesito via de administração, as principais são intramusculares e intravenosas, onde o fármaco é comumente utilizado como anestésico pediátrico em pacientes de alto risco e em ambientes com recursos limitados (NOWACKA & BORCZYK, 2019; KAMP *et al.* 2020; ORHURHU *et al.* 2021).

A cetamina tem como principal mecanismo de ação o antagonismo não competitivo do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA), um receptor ionotrópico ativado pelo glutamato, principal neurotransmissor excitatório. Esse fármaco age bloqueando o canal do receptor e impedindo o fluxo de Na^+ e de Ca^{2+} para dentro da célula e de K^+ para fora da célula. O efeito se dá através da ocupação de dois possíveis sítios no receptor, o primeiro que diminui o tempo de abertura do canal e o segundo que diminui a frequência de abertura dele. Dessa forma, a ligação aos receptores NMDA é determinante para a potência exercida pelos isômeros, ou seja, (S+) -cetamina possui de três a quatro vezes mais afinidade pelo receptor que a (R-) -cetamina. A molécula de cetamina pode apresentar ainda interações importantes com receptores opioides (μ , δ e κ), monoaminérgicos e colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) (ERSTAD & PATANWALA, 2016; NOWACKA & BORCZYK, 2019).

O uso da cetamina, na prática clínica, é corriqueiro e diverso, onde a sua utilização como anestésico, apesar de seus efeitos adversos psicodislépticos, pode ocorrer como primeira escolha em procedimentos veterinários, medicina de campo e, principalmente, na anestesia pediátrica, pois, devido à sua segurança, baixa toxicidade comparativa e boa recuperação, o fármaco desempenha papel importante em cirurgias e procedimentos emergenciais infantis (GAO *et al.* 2016; KIM *et al.* 2011; ORHURHU *et al.* 2021).

O fármaco apresenta um papel importante no controle da dor tanto na medicina humana quanto na veterinária, sendo um analgésico potente, que proporciona alívio ao paciente em baixas doses antes, durante e após o processo cirúrgico. Estudos demonstraram que o uso da cetamina em casos de crises epiléticas prolongadas é benéfico, além, ainda, de atuar positivamente em estados de depressão resistente ao tratamento (MORGAN *et al.* 2012; CORRIGER & PICKERING, 2019; NOWACKA & BORCZYK, 2019).

Apesar de conferir muitos benefícios clínicos, principalmente no que tange a pediatria e veterinária, a cetamina é um fármaco repleto de efeitos adversos. Sua

toxicidade pode causar uma variedade de sintomas cardiovasculares, neurológicos, psiquiátricos, urogenitais, renais e outros. Em relação a sua neurotoxicidade, estudos não mostraram comprometimento da cognição e aprendizagem em pacientes que receberam a cetamina como anestésico (DIAMOND *et al.* 2014; SHIROMA *et al.* 2020). Por outro lado, alguns autores relatam que esse fármaco age no sistema nervoso causando neuroapoptose, dependente da dose e do tempo de exposição, desregulação da expressão de receptores do tipo NMDA e indução de estresse oxidativo neuronal (DONG & ANAND *et al.* 2013; KALOPITA *et al.* 2021). A cardiotoxicidade, em doses anestésicas administradas no coração em experimentos *in vivo*, foi demonstrada por mecanismo envolvendo estresse oxidativo e presença de radicais livres. Além disso, a cetamina também se mostrou capaz de aumentar os níveis de troponina e lactato desidrogenase (LDH) sanguínea e alterar o ritmo cardíaco em animais (CHAN *et al.* 2011; AHISKALIOGLU *et al.* 2018).

A toxicidade renal exercida pela cetamina é extremamente relevante, uma vez que os rins são responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, pela excreção e pela metabolização de fármacos. A utilização da cetamina e outros anestésicos deve ser precedida de uma avaliação para que se possa evitar o desenvolvimento de LRA e outras doenças. A escolha do fármaco anestésico é baseada no local de biotransformação e eliminação dele. Para substâncias como a cetamina, o mecanismo renal ainda é incerto e inclui a expressão de genes ligados ao processo apoptótico, ativação do sistema inflamatório e causas idiossincráticas (GOLDEN, CORBETT & FORNI, 2016; LOPES *et al.* 2017).

Wai *et al.* (2012), demonstraram que o fármaco foi capaz de conferir hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em camundongos, onde o tecido renal se apresentou com degeneração hidrópica dos túbulos renais e oclusão glomerular. Outros estudos mostraram que a cetamina foi capaz de conferir nefrotoxicidade em ratos, que apresentaram alterações dos níveis da Molécula da Injúria Renal 1 (KIM-1) e atrofia tubular. Ademais, a cetamina, que pode ser utilizada como droga de abuso em doses baixas, pois produz elevações de humor, alucinações visuais e dissociação, foi capaz de promover alterações renais, tais como necrose tubular aguda (NTA), cistite inflamatória e nefropatia obstrutiva em pacientes. Conforme observado por Li *et al.* (2015) e Kovacova *et al.* (2016), o uso de cetamina em células renais, de forma independente da dosagem, foi capaz de promover citotoxicidade relacionada a danos por estresse oxidativo. Assim, além dos estudos citados anteriormente, outros autores, em seus trabalhos, atribuem como

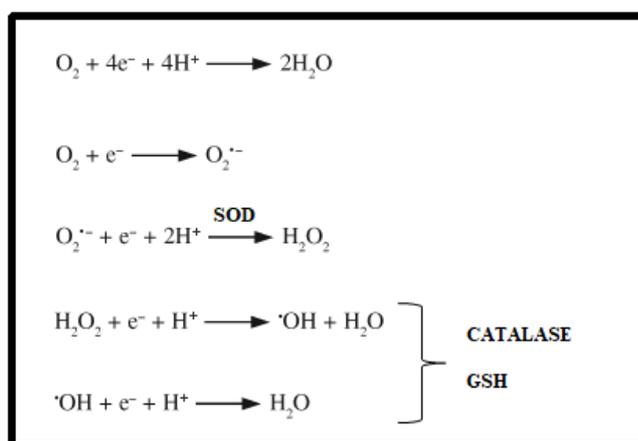
possível causa de nefrotoxicidade os efeitos oxidativos da cetamina (SELBY *et al.* 2008; WANG *et al.* 2014; LOPES *et al.* 2017).

1.3 Estresse Oxidativo

1.3.1 Equilíbrio óxido-redutor celular.

O mecanismo do metabolismo oxidativo mitocondrial, para gerar a maior parte da adenosina trifosfato (ATP) celular, ocorre através da passagem de elétrons de moléculas com alto potencial redox para moléculas com baixo potencial óxido-redutor, como o oxigênio molecular (O_2), que é o aceptor final dos elétrons na cadeia transportadora de elétrons (CTE) na mitocôndria. Após a transferência, a molécula de oxigênio é reduzida a duas moléculas de H_2O com o consumo de 4 elétrons. Inicialmente, ocorre a conversão do oxigênio em superóxido ($O_2 \cdot^-$) que será, então, convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), a partir daí, a molécula de peróxido de hidrogênio formará o radical hidroxila ($\cdot OH$), que vai gerar a segunda molécula de água pela reação com hidrogênio (H^+) através da ação das vias antioxidantes da catalase e da glutatona reduzida (GSH) como mostra a Figura 2 (BARREIROS *et al.* 2006; SACK *et al.* 2017).

Figura 2: Formação de radicais livres através da molécula de oxigênio.



Legenda: GSH = glutatona; SOD = superóxido dismutase; $O_2^{\cdot -}$; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $\cdot OH$ = radical hidroxila; O_2 = oxigênio molecular; H_2O = água; H^+ = íon hidrogênio; e^- = elétron

Fonte: Elaborado pelo autor.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas por esses sistemas enzimáticos são produzidas em baixas quantidades e desempenham um papel relevante para o mecanismo funcional celular e mitocondrial, durante a homeostase, sendo prontamente debeladas pelas vias antioxidantes internas (superóxido dismutase, catalase e glutatona). Porém, devido a ação de agentes externos ou em casos de doenças que perturbem esse processo e levem a produção excessiva de ERO, podem ocorrer danos oxidativos celulares e teciduais, tais como apoptose e necrose (SACK et al. 2017; ALKADI *et al.* 2020).

1.3.2 O papel do estresse oxidativo na indução da morte celular.

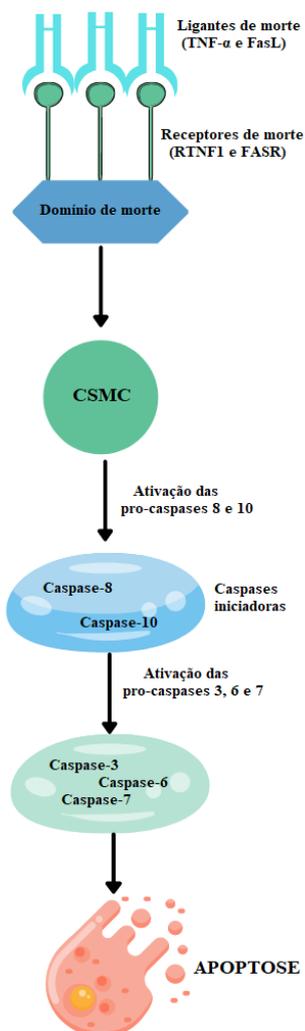
O estresse oxidativo é definido como um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a degradação insuficiente desses radicais pelos sistemas antioxidantes do organismo. Peroxidação lipídica, danos oxidativos ao DNA e proteínas e morte celular são alguns mecanismos derivados do estresse oxidativo (DAENEN *et al.* 2019). O entendimento do processo de morte celular é importante para esclarecer aspectos celulares, conhecer a fisiologia de diversas doenças, bem como para a elaboração de novas estratégias terapêuticas. A classificação desses processos se dá com base em seu modo de execução e através da observação de suas características bioquímicas, sendo esses mecanismos classificados em apoptose, necrose e autofagia (KROEMER *et al.* 2009).

A apoptose é a chamada morte celular programada e desempenha um papel crucial no mecanismo celular. As manifestações morfológicas do processo de apoptose são a formação de corpos apoptóticos, retração do citoplasma celular, fragmentação bolhosa na membrana da célula, redução ou perda da adesão na matriz extracelular, oxidação dos lipídios da membrana e fragmentação de material genético (NIRMALA & LOPUS, 2020).

A apoptose pode ocorrer durante o desenvolvimento (organogênese) e envelhecimento celular, sendo o mecanismo homeostático para manutenção das populações celulares teciduais. Além disso, esse processo apoptótico pode se instalar como resposta a células danificadas por doenças, a agentes nocivos ao maquinário celular e em reações autoimunes. Algumas doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, lesões associadas ao processo isquêmico e outros, podem levar ao desencadeamento da morte celular programada no organismo (ELMORE, 2007; NIRMALA & LOPUS, 2020).

São três as principais vias de execução da apoptose: via extrínseca, via intrínseca e via induzida (através do estresse do retículo endoplasmático). Todas as vias envolvem a ação das proteases de cisteína, comumente denominadas de caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*), que clivam substratos, levando ao processo de externalização de lipídios membranares, os resíduos de fosfatidilserina. Essas moléculas residuais emitem a sinalização para que ocorra o processo de fagocitose de células apoptóticas (GALLUZZI *et al.* 2018). No caso dos néfrons, as células dos túbulos proximais, durante o processo de apoptose, são também capazes de externalizar essas moléculas sinalizadoras da lesão do tecido, tais como a Molécula da Injúria Renal 1 (KIM-1), que se apresenta como um receptor de fosfatidilserina, mediando a fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados, sinalizando a morte celular programada (BROOKS *et al.* 2015).

A via extrínseca (Figura 3) ocorre através da interação de ligantes, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Fas ligante (FASL), respectivamente, a receptores transmembranares de morte celular, denominados de receptor do fator de necrose tumoral 1 (RTNF1) e o receptor Fas (RFas). Essa ligação é responsável por agrupar os domínios do citoplasma desses receptores, que recrutam proteínas contendo o domínio de morte. A partir daí, estes domínios servirão como ponto de ligação para pro-caspase 8 e pro-caspase 10, que formarão o complexo de sinalização de morte celular (CSMC). O CSMC ativa as caspases iniciadoras (caspases 8 e 10), que ativam as pro-caspases 3, 6 e 7, precursoras das caspases executora 3, 6 e 7. Assim, para a finalização da via extrínseca, nucleotídeos, liberados pela célula apoptótica, sinalizam aos macrófagos a necessidade da realização do processo de “engolfamento” dessas células (OBENG, 2021; ELMORE, 2007).

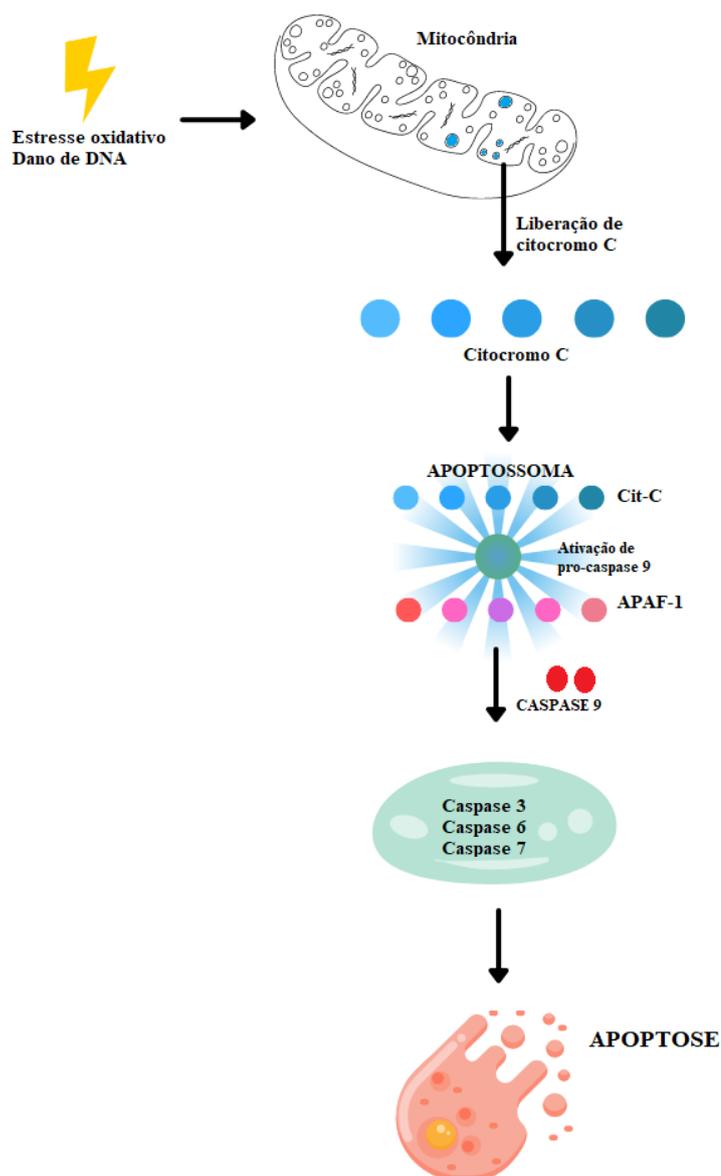
Figura 3: Via apoptótica extrínseca

Legenda: TNF- α = Fator de Necrose Tumoral Alfa; FasL= fas ligante; RTNFI= receptor de TNF; FASR= receptor de FAS.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A via intrínseca é também denominada de mitocondrial e envolve a formação de uma molécula denominada apoptossomo, formada pela associação de citocromo C e fator de ativação de protease apoptótica-1 (APAF-1). No ambiente do apoptossomo, ocorre a ativação da pro-caspase 9, que se torna caspase-9 e promove a ativação das caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), levando a apoptose celular (Figura 4) (EDLICH, 2018).

Figura 4: Via apoptótica intrínseca.



Legenda: DNA= ácido desoxirribonucleico; Cit-C= citocromo C; APAF-1= Fator Ativador de Protease Apoptótica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

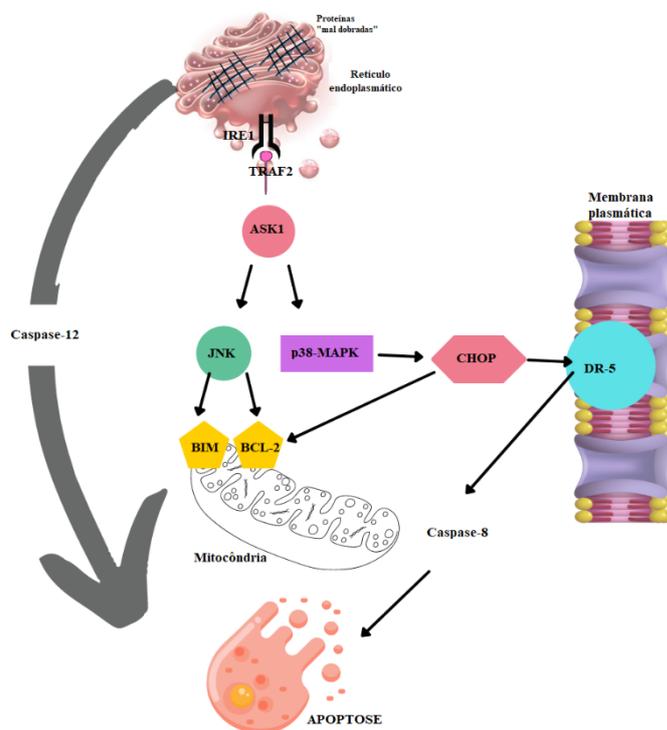
A via induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (Figura 5) é ativada pela presença de processos infecciosos, hipóxia celular, fome, produtos químicos e medicamentos, pois esses fatores são responsáveis por contribuir para o acúmulo de proteínas “mal dobradas”. O processo de formação de proteínas dobradas incorretamente ativa um mecanismo que sinaliza a necessidade de substituição dessas proteínas por outras dobradas de maneira correta, sendo essa via ativada por três mecanismos: o da

quinase do retículo endoplasmático semelhante ao RNA da proteína quinase (PERK), o da enzima que necessita de inositol 1 (IRE1) e o do fator de transcrição ativador 6 (ATF6).

Dentre os três, o IRE1 é o responsável por induzir o processo apoptótico mediado por caspase-12 e pelo fator 2-apoptose regulador de sinal de quinase 1 (TRAF2-ASK1), que é mediado pelo complexo cJun N-terminal quinase 1 (JNK) e pela cascata de sinalização p38-MAPK. Uma vez ativada a via JNK, haverá a inibição da proteína BCL-2, que é anti-apoptótica, e a ativação da proteína BIM, pró-apoptótica. Já a via de p38-MAPK leva a morte celular pela ativação da proteína CHOP, localizada nas vias PERK e ATF6, que age como ativadora de proteínas pró-apoptóticas (TNF, receptor de morte 5-DR5, proteína de dano ao DNA-34- GADD-34 e outros), promovendo a apoptose dependente da caspase-8, além de inibir a transcrição de BCL-2 e promover a expressão de BIM (SANO & REED, 2013; NIRMALA & LOPUS 2020).

A necrose ocorre de maneira não programada e através da alteração estrutural da célula. Esse processo pode acontecer devido a infecções, radiação, eletricidade, substâncias químicas, venenos, asfixia, medicamentos variados e como alternativa à apoptose, caso haja bloqueio na via das caspases (LIN *et al.* 2004). Durante o mecanismo necrótico, a célula tem a sua integridade membranar decomposta, levando ao “vazamento” dos constituintes celulares, o que resulta em um processo inflamatório. Alguns fatores são responsáveis por influenciar diretamente no desencadeamento da morte celular por necrose, tais como a produção elevada de espécies reativas de oxigênio, redução ou inativação da via das caspases, baixo nível de ATP celular, elevada concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular (NIRMALA & LOPUS, 2020). Estudos demonstraram, que a associação desses fatores, como os elevados níveis de íon cálcio e o estresse oxidativo intracelular, podem promover a entrada de diversas moléculas de soluto para as mitocôndrias, o que compromete a produção de ATP e leva a liberação de proteínas mitocondriais no citosol celular, ocasionando, também, a morte por necrose (GALLUZZI *et al.* 2018).

Figura 5: Via apoptótica induzida pelo estresse do retículo endoplasmático.



Legenda: IRE-1= *inositol requiring protein*; TRAF2= *tumor necrosis fator receptor-associated factor 2*; ASK1= *apoptosis-1 signal regulation kinase*; JNK= *N-terminal kinase Jun*; p38-MAPK= *p-38 map kinase*; CHOP= *CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein*; DR-5= *death receptor 5*; BIM= *Bcl2-interacting mediator of cell death*; BCL-2= *B-cell lymphoma 2*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, conforme dito anteriormente, o processo de morte celular e o mecanismo de estresse oxidativo estão intimamente ligados, podendo ocorrer devido a vários fatores externos como infecções, uso de medicamentos, doenças e outros.

1.3.3 O uso da Cetamina e o estresse oxidativo.

A cetamina tem se mostrado capaz de induzir efeitos tóxicos em culturas de células variadas e em estudos realizados *in vivo*. O processo de morte celular instalado após o uso desse fármaco, principalmente como anestésico e como droga de abuso, pode estar diretamente relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estudos anteriores demonstraram a interrelação entre a morte celular programada e o aumento de Ca^{2+} no citosol de células neuronais submetidas ao tratamento com cetamina, o que é

explicado pelo fato de as mitocôndrias contribuírem diretamente para a sinalização do cálcio intracelular sendo essas organelas, quando em sobrecarga de cálcio, submetidas ao tamponamento que quando associado a redução do potencial de membrana, altera a CTE, levando a célula ao estresse oxidativo, com consequente produção de ERO (WANG *et al.* 2010; BUSTAMANTE *et al.* 2019).

Segundo Li *et al.* 2015, é provável que o estresse oxidativo causado pelo uso da cetamina seja um dos principais contribuintes para o comprometimento cardíaco e renal, onde a toxicidade é exercida pela instalação do processo de apoptose em células desses tecidos, sendo atribuídas às espécies reativas de oxigênio danos como fibrose intersticial e inflamação renal.

Dessa forma, apesar de ter o uso aprovado em situações da prática clínica, se observa que o uso da cetamina pode estar associado ao processo de morte celular em tecidos como os do coração, cérebro e rins, pois a sua utilização poderá provocar aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio. Trazendo à tona a necessidade de terapias antioxidantes para os pacientes, que venham a utilizar esse medicamento.

Além de promover o estresse oxidativo celular, a cetamina é conhecida como uma droga pró-inflamatória para as células do trato urinário, o que pode influenciar diretamente no processo de instalação de lesão renal por esse fármaco (XI *et al.* 2020).

1.4 Vias de sinalização apoptótica e seus biomarcadores inflamatórios

A via de apoptose induzida pelo estresse do retículo endoplasmático, após iniciação por fatores citados anteriormente, pode ser ativada por três principais mecanismos, dentre os quais o da enzima que necessita de Inositol 1 (IRE1) se destaca por induzir apoptose através da sinalização mediada pela via MAPK (GUO *et al.* 1998; COOB, 1999; NIRMALA & LOPUS 2020). Estudos mostram a relevância da atuação das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) na fisiopatologia das células renais, principalmente, devido a ativação de JNK e p38 em células renais tubulares e mesangiais. As MAPKs se apresentam em três grandes grupos: quinases clássicas reguladas por sinal extracelular, chamadas de ERKs, JNK e p38, estando as duas últimas presentes na resposta das células ao estresse oxidativo e a inflamação (TIAN, ZHANG & COHEN, 2000; GARRINGTON & JOHNSON, 1999). As famílias JNK e p 38 pode ser ativadas por citocinas pró-inflamatórias ou em resposta a estresses celulares, tais como estresse osmótico, hipóxia celular e estresse oxidativo (TIAN, ZHANG & COHEN, 2000; KIM & CHOI, 2010).

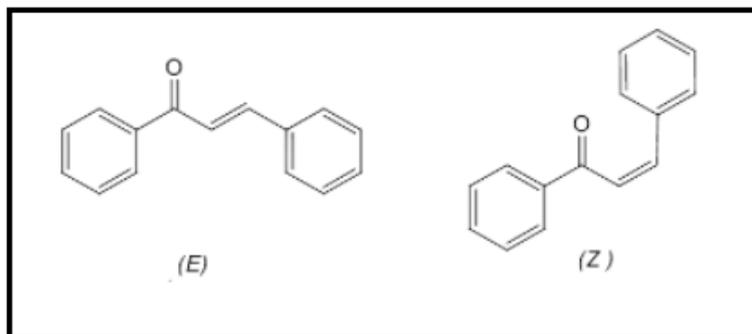
São inúmeras as citocinas pró e anti-inflamatórias envolvidas no processo de estresse oxidativo e apoptose. A família de citocinas do tipo interleucinas (IL) é responsável pela ativação de genes envolvidos na diferenciação, sobrevivência, apoptose e proliferação celular, sendo a IL-6 uma molécula pró-inflamatória, que possui a cascata MAPK como via de sinalização, envolvendo principalmente a via JNK, onde, estudos anteriores mostraram, que a ativação de JNK é responsável pela expressão gênica de IL-6 (HEINRICH *et al.* 2003; NISHITAI *et al.* 2004; JOHN, 2018). Assim como IL-6, interferon gamma está envolvido no processo inflamatório, visto que a sua atividade excessiva pode levar a dano tecidual, necrose e inflamação, agravando possíveis doenças associadas. Estudos mostraram que situações de estresse oxidativo causado por infecções podem promover a sinalização mediada por IFN- γ e levar à iniciação da cascata de MAPK-p38, induzindo morte celular (CHEALLAIGH *et al.* 2016; KAK, RAZA & TIWARI, 2018).

Assim, considerando o envolvimento da cetamina na ativação de vias pró-oxidantes e pró-inflamatórias, é importante salientar que substâncias com potencial antioxidante e anti-inflamatório podem se destacar na redução dos danos à função renal.

1.5 Chalconas e suas fontes naturais e sintéticas.

As chalconas são as precursoras responsáveis pela biossíntese de flavonoides na natureza e possuem estruturas químicas derivadas da estrutura geral da classe: (E) [1,3-difenil-2-propen-1-ona], sendo essas moléculas cetonas aromáticas que se apresentam em um sistema carbonila α , β – insaturado, unindo dois anéis aromáticos. Além disso, possuem dois estereoisômeros (E) e (Z) (Figura 6), que influenciam como parte do processo de formação dos flavonoides. Essas moléculas podem ser classificadas na família das fitoalexinas e apresentam ampla quantidade de efeitos biofarmacológicos evidenciados, tais como propriedade anti-inflamatória, anticonvulsivante, antifúngica, antibacteriana, antioxidante, antinociceptiva e outras (VIANA, BANDEIRA & MATOS, 2003; HEIDARI *et al.* 2009; FERREIRA *et al.* 2018; LOPES, 2019).

Figura 6: Estrutura geral das chalconas (E) (1,3-difenil-2-propen-1-ona) e (Z) (1,3-difenil-2-propen-1-ona)



Fonte: adaptado de Santana *et al.* (2015).

As chalconas podem ser encontradas, na natureza, em diversas plantas das famílias Compositae, Moraceae, Leguminosae e Euphorbiaceae. Essa última é pertencente às regiões, predominantemente, tropicais e subtropicais, estando distribuída em ecossistemas como mata atlântica, cerrado e caatinga. O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae e está distribuído mundialmente em, aproximadamente, 8.000 espécies, das quais 700 estão no Brasil, o que o torna o segundo maior gênero da família (SILVA, 2010; LOPES, 2019).

O Nordeste brasileiro é conhecido por apresentar grande variedade de espécies de plantas pertencentes ao gênero *Croton* com as mais diversificadas utilidades dentro da medicina popular, sendo o marmeleiro-cravo (*Croton anisodontus* Müll. Arg.) (Figura 7) uma planta típica de um bioma, exclusivamente brasileiro, denominado caatinga, que apresenta em sua estrutura (folha, flor, caule e raiz) variados componentes químicos potencialmente terapêuticos, como os terpenos, taninos, flavonoides e as chalconas. No contexto popular, essa espécie é utilizada em processos infecciosos, hemorragias e inflamações (FERREIRA *et al.* 2018; SANTIAGO *et al.* 2018).

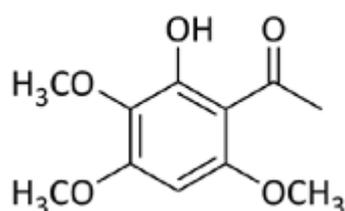
Figura 7: Marmeleiro-cravo (*Croton anisodontus* Müll. Arg.).



Fonte: SILVA *et al.* (2020).

As cascas dos caules das plantas do gênero *Croton*, em especial da espécie *C. anisodontus* Müll. Arg., são ricas em uma fonte alternativa de chalcona, denominada de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX) (Figura 8), que se apresenta em uma estrutura simples e privilegiada pois, através de reações químicas básicas, se podem realizar inúmeras substituições nos anéis aromáticos da chalcona, levando a formação de moléculas semissintéticas que, de forma semelhante, possuem atividade farmacológica comprovada (FONTENELLE *et al.* 2008; SANTIAGO *et al.* 2018; FREITAS *et al.* 2021).

Figura 8: Estrutura química da 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX).



Fonte: De Freitas *et al.* (2020).

Estudos anteriores demonstraram que a classe das chalconas naturais e semissintéticas apresentam capacidade de agir como moléculas antioxidantes, anti-inflamatórias, ansiolíticas, antimicrobianas, anticancerígena, dentre outros (FREITAS *et al.* 2021).

As chalconas naturais podem originar, pela substituição e adição de radicais em sua estrutura, as chamadas chalconas semissintéticas que apresentam extensa atividade farmacológica (TEIXEIRA *et al.* 2019). De acordo com De Freitas e colaboradores (2020), as chalconas semissintéticas são fortes candidatas a serem usadas como moléculas antibacterianas ou em combinação com antibióticos para o tratamento de infecções causadas por cepas de bactérias multirresistentes. Além disso, chalconas semissintéticas, análogas estruturalmente à curcumina, foram capazes de inativar vias de apoptose importantes para o processo inflamatório na diabetes em camundongos, bem como inibir a produção de citocinas no processo de hiperlipidemia (FANG *et al.* 2015; CHEN *et al.* 2018).

Derivados das chalconas apresentaram alta capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio, demonstrando, ainda, atividades como antioxidante geral *in vitro*,

óxido-redutora, sequestrante de radicais hidroxila e capacidade de inibição de enzimas oxidantes do tipo polifenoloxidasas em alimentos (DE FREITAS et al. 2008; GACCHE et al. 2008; POLO et al. 2019). Chu e Guo, (2016) demonstraram *in vitro* a habilidade anti-inflamatória de chalconas semissintéticas, que foram capazes de inibir consideravelmente a atividade de NF- κ B em macrófagos. Somado a isso, no mesmo estudo, observaram, ainda, a capacidade dessas moléculas sobre radicais livres como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, inibindo o processo apoptótico, demonstrando, assim, forte influência desses compostos sobre mecanismos de morte celular.

As chalconas naturais e semissintéticas, como previamente citado, são moléculas importantes como antioxidantes e anti-inflamatórias e o processo da lesão renal aguda (LRA) envolve, justamente, os mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio e de liberação de fatores pró-inflamatórios. Estudos, como o de Lee et al. (2015) demonstraram que chalconas semissintéticas foram capazes de reduzir a citotoxicidade em células renais tratadas com cisplatina, droga comprovadamente nefrotóxica, e de inibir a via de sinalização MAPKs-p53-caspase-3 da apoptose celular. A redução da toxicidade renal da cisplatina foi observada também em células tubulares renais e em ratos, envolvendo moléculas ricas em flavonoides, dos quais as chalconas são precursoras (KHULMANN et al. 1998; JONES & SHOSKES, 2000). Somado a isso, chalconas semissintéticas foram capazes de reduzir a LRA *in vivo* através da inibição de fatores pró-inflamatórios, como NF- κ B, além de serem responsáveis pela redução do dano renal causado por diabetes e hiperlipidemia em animais submetidos ao tratamento com essas moléculas (FANG et al. 2015; HU & LIU, 2016; CHEN et al. 2018).

Dessa forma, produtos naturais e seus derivados com potencial antioxidante e anti-inflamatório, tais como as chalconas, vêm sendo investigados como ferramentas farmacológicas ou substâncias com valor terapêutico, que poderão contribuir para futuras terapias.

2 JUSTIFICATIVA

A lesão renal aguda (LRA) causada por fármacos é uma condição multifatorial, que corresponde a cerca de 25% dos casos de LRA em pacientes adultos jovens e de 60% em pacientes idosos (KOHLI *et al.* 2000; JACOB, DANNENHOFFER & RUTTER, 2020). No contexto de saúde pública, no Brasil, a lesão renal foi responsável, nos últimos anos, por gerar um impacto financeiro superior a R\$ 37,6 milhões aos cofres públicos, somente na região Nordeste do país (SOUZA JR. *et al.* 2019). Esse processo pode ocorrer por mecanismos como a efeito direto da lesão e morte celular nos túbulos renais, necrose tubular aguda, dentre outras condições, que são estabelecidas, principalmente, pela condição de estresse oxidativo e pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (PERAZELLA, 2018; WU & HUANG, 2018; PETEJOVA *et al.* 2020).

A cetamina é um anestésico intravenoso utilizado na prática clínica pediátrica e veterinária, sendo de primeira escolha nesses casos. Os efeitos adversos associados a esse fármaco são amplos, tais como alterações neuronais, cardiovasculares, urogenitais e renais. Parte desses efeitos pode estar ligada ao processo de morte celular induzida pelo uso do anestésico em procedimentos clínicos, despertando a necessidade de estratégias protetoras frente ao uso desse fármaco (SELBY *et al.* 2008; LI *et al.* 2015; SHIMORA *et al.* 2020).

As chalconas são moléculas presentes na biodiversidade brasileira e que apresentam facilidade de síntese de outras moléculas derivadas delas. São amplamente estudadas devido às suas atividades farmacológicas e biológicas, tais como os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, que são determinantes no processo de instalação da injúria renal (SANTIAGO *et al.* 2018; FREITAS *et al.* 2021).

Dessa forma, sabendo da necessidade da comunidade científica de buscar novas alternativas terapêuticas para garantir a melhora da qualidade de vida de pacientes com lesão renal aguda, bem como observando os gastos de saúde pública com essa condição e entendendo a importância da ampla diversidade botânica presente no Brasil, em especial no estado do Ceará, o presente trabalho estuda o potencial efeito citoprotetor de chalcona HTMCX e suas moléculas semissintéticas em modelo de LRA induzida por cetamina *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o potencial efeito citoprotetor de chalcona 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX) e suas moléculas semissintéticas em modelo de LRA induzida por cetamina *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

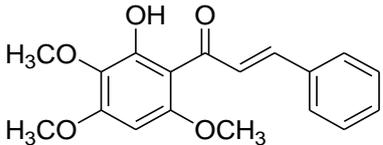
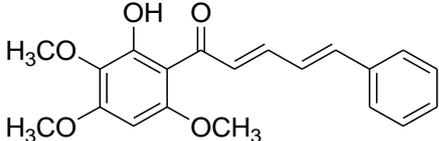
- Avaliar a citotoxicidade da cetamina sobre as células de túbulo proximal humano;
- Avaliar o efeito citoprotetor da chalcona 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX) e suas moléculas semissintéticas sobre a viabilidade de células tubulares renais submetidas à lesão induzida por cetamina;
- Analisar a participação da chalcona 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX) e suas moléculas semissintéticas no balanço REDOX citoplasmático e mitocondrial após lesão induzida por cetamina, bem como avaliar o possível tipo de morte celular envolvido nesse processo.
- Comparar os efeitos citoprotetores da chalcona 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX) e de suas moléculas semissintéticas. sobre células tubulares renais humanas
- Investigar o envolvimento das vias de sinalização MAPKs e JNK e a consequente liberação de citocinas no efeito protetor das chalconas através de estudos *in silico*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do produto natural e chalconas semissintéticas

As amostras da *Croton anisodontus* foram coletadas na cidade de Itapiúna/CE e identificadas botanicamente pelo Professor Edson Nunes da Universidade Federal do Ceará, com exsicata depositada no Herbário Prisco Bezerra-UFC sob número 48964.20, e cedidas ao estudo pelo Professor Hércio Silva dos Santos, Universidade Estadual do Vale do Acaraú. A partir desse processo, o produto natural, 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona, foi extraído através da utilização do solvente hexano e identificado por cromatografia em camada delgada (CCD). As chalconas semissintéticas, descritas na tabela 2, foram sintetizadas através das reações de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico, onde em um frasco de Erlenmeyer contendo 50 ml de KOH a 10% (m/v) e 40 ml de etanol, foram adicionados, lentamente sob agitação, 7 ml de uma mistura de aldeídos:cetona (5:2) em temperatura ambiente. Em seguida, decorridos 30 minutos, a mistura foi filtrada para obtenção de um precipitado, que foi lavado com água destilada em pequena quantidade. Esse composto foi dissolvido em etanol e deixado em gelo para obtenção de cristais. Esses cristais foram lavados com etanol frio e secos a temperatura ambiente (SILVA *et al.* 2020). A HTMCX e suas chalconas semissintéticas foram cedidos pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA). O produto natural isolado foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional (SISGEN) com número AC40B4C.

Tabela 2 – Estruturas das Chalconas semissintéticas derivadas da 2-hidroxi- 3,4,6-trimetoxiacetofenona.

Chalcona Semissintética	Estrutura	Nomenclatura
CPNB		(E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one
CPNC		(2E,4E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one

CPN4Cl		(E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one
CPNDICl		(E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one
CPN4F		(E)-3-(4-fluorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one
CPN2F		(E)-3-(2-fluorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one
CPN3NO2		(E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl) prop-2-en-1-one

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para realização dos experimentos, foram preparadas soluções estoques da HTMCX (0,2 M) e das chalconas semissintéticas (0,2 M) em dimetilsulfóxido (DMSO). As alíquotas foram armazenadas em freezer a -20°C para a utilização em experimentos posteriores. A partir dessas soluções, foram realizadas diluições seriadas para cada chalcona e para o produto natural nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 e 15,62 μM . Diluições de duplo passo foram realizadas em tampão fosfato (PBS), de forma a respeitar a concentração máxima de DMSO por poço igual a 0,5%.

4.2 Obtenção da Cetamina

A solução de cloridrato de dextrocetamina (50 mg/ml) – KETamin ® solução injetável - foi obtida do Laboratório CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA ® (São Paulo, Brasil). O armazenamento da solução foi realizado de acordo com as orientações do fabricante.

Para a utilização da cetamina em cada um dos experimentos programados, foi realizada a preparação de uma solução estoque a 10 mM, utilizando solução salina

tamponada com fosfato estéril (PBS – NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; pH 7,4) e, em seguida, foram feitas diluições seriadas nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,156 mM. As concentrações de cetamina foram estabelecidas de acordo com KOVACOVA *et al.* (2016). Os grupos controle foram tratados apenas com o solvente.

4.3 Cultura de células renais HK-2

4.3.1 Obtenção, cultivo e manutenção da linhagem celular.,

As células HK-2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Invitrogen, EUA, contendo glutamina, bicarbonato de sódio (3.7 g/L), glicose, piruvato de sódio, sais inorgânicos, vitaminas e aminoácidos e, acrescido de penicilina (200 UI/ml), estreptomicina (130 mg/ml) e soro bovino fetal (SBF) a 10%, em garrafas plásticas mantidas em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ para obtenção da confluência celular (BUTLER & DAWNSON, 1992).

As células mantidas no cultivo foram utilizadas ao atingirem a confluência, onde tiveram o meio de cultivo removido, sendo lavadas com 3-5 ml de PBS estéril, pH 7,4. As células foram incubadas com 1 ml de solução tripsina-EDTA (0,05 %/0,02 %) por 5 minutos a 37°C para que as células aderidas fossem deslocadas. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA foram adicionados 2 ml de DMEM contendo SBF a 10%.

Para realização dos experimentos, as células foram lavadas com PBS estéril, descoladas com tripsina e adicionadas a tubo para centrifugação (1500 G por 5 minutos). A seguir, o pellet de células foi suspenso para contagem em câmara de Neubauer (as células contabilizadas foram aquelas presentes nos campos de contagem de leucócitos) a fim de se obter densidade celular de 1×10^5 células/ml, para que a suspensão celular fosse distribuída em placas de 96 (200 µl/poço) ou 24 poços (1 ml/poço). As células foram incubadas durante 24 horas em condições ideais, visando aderência celular e, então, os tratamentos previstos foram realizados.

A estocagem das células para futuros experimentos foi realizada após descolamento (tripsina) e centrifugação (1500 G por 5 min) para ressuspensão do *pellet* de células em DMEM suplementado com SBF 10% e DMSO 10%. Os tubos de criopreservação foram conservados em nitrogênio líquido e em *freezer* a -80°C.

4.3.2 Citotoxicidade da HTMCX e chalconas semissintéticas em células renais HK-2.

A fim de determinar a viabilidade celular foi realizado o ensaio de redução do [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (Sigma®). Tal protocolo se baseia na capacidade metabólica de células viáveis em internalizarem o sal de MTT e promoverem a sua transformação, através da ação de desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas, em um produto de cor azul violácea, chamado sal de formazan. O formazan, fora da célula, apresenta capacidade de ser solubilizado por dodecilsulfato de sódio (SDS) e, sabe-se que a concentração de formazan é diretamente proporcional à densidade de células viáveis, considerando o controle com 100% de viabilidade. Assim, torna-se possível observar a viabilidade celular, visto que em células não viáveis esse processo não ocorre (MOSMANN, 1983; VANDENBERGHER *et al.* 2013).

Células renais HK-2 presentes em placas de 96 poços foram tratadas nas diferentes concentrações das chalconas semissintéticas e da HTMCX (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 e 15,62 μM) e incubadas por 24 horas em estufa de CO_2 . A seguir, foi realizado o ensaio com MTT (2,5 mg/ml em PBS estéril), onde, após retirada de 100 μl do sobrenadante de cada poço da placa foram adicionados 10 μl de MTT 2,5 mg/ml (Sigma®) e, depois de 17 horas, na incubadora a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$, acrescentou-se 90 μl de tensoativo SDS (10% em HCl 0,01 N). Assim, passadas 4 horas, foi realizada a leitura por espectrofotometria em 570 nm, sendo, então, calculada a viabilidade celular, considerando a absorbância média do grupo controle, tratado apenas com veículo, como 100% de viabilidade e as demais leituras com viabilidade proporcional.

4.3.3 Citotoxicidade renal induzida por Cetamina em células renais HK-2.

A fim de avaliar a citotoxicidade induzida pela cetamina em células renais, foi realizado o ensaio de MTT, conforme descrito anteriormente nesse trabalho, utilizando as concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,156 mM para o tratamento das células por 24 horas. Após a obtenção dos valores de viabilidade celular, foi calculada, por regressão linear, concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células, denominada de IC_{50} (KIKUCHI *et al.* 2016). Os valores de IC_{50} foram utilizados em experimentos posteriores.

4.3.4 Avaliação do efeito da HTMCX e das chalconas semissintéticas sobre a toxicidade em células renais induzida pela Cetamina.

Após a determinação da faixa citotoxicidade das moléculas previamente apresentadas, foram selecionadas aquelas com menor citotoxicidade tubular renal para dar continuidade aos experimentos. A fim de avaliar o efeito citoprotetor da HTMCX e de suas chalconas semissintéticas, foi realizado o ensaio de redução do MTT.

Inicialmente, as células foram expostas com a Cetamina na concentração referente a sua IC₅₀. Após 24 horas, foi trocado o meio e, então, realizado o tratamento com a HTMCX (125; 62,5; 31,25 e 15,62 µM) ou com as chalconas semissintéticas (62,5; 31,25 e 15,62 µM) nas concentrações não tóxicas selecionadas previamente. Assim, após 24 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, se deu o protocolo de ensaio do MTT descrito anteriormente.

4.4 Avaliação da liberação de KIM-1 no sobrenadante de células HK-2 tratadas com cetamina.

Para a determinação das concentrações de KIM-1 no sobrenadante de células HK-2 foi utilizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (R&D Systems, Inc – Cat. DY1750, Minneapolis, MN), que consiste em um ensaio bioquímico analítico específico e sensível, utilizado na detecção (quantitativa e qualitativa) de uma amostra, a qual pode ser uma proteína ou complexo molecular. A detecção de antígenos por essa técnica depende da ligação específica entre antígeno e anticorpo, que gera um sinal fluorescente a ser medido por espectrofotômetro (JASCHKE, 2020).

O experimento foi realizado utilizando placa específica para ELISA (R & D Systems, Inc - Cat. DY1750, Minneapolis, MN), onde os poços foram cobertos, diluindo o anticorpo de captura (720 µg/ml) para uma concentração de 4 µg/ml em PBS, obtendo-se o volume de 100 µL em cada poço. A seguir, a placa foi incubada *overnight* à temperatura ambiente. Após 24 horas, a placa foi lavada duas vezes com 400 µL da “solução de lavagem” (PBS+Tween 20 – 0,5 ml de Tween/1L de PBS) e realizou-se a etapa de bloqueio com 300 µL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) + PBS (10g BSA/1L de PBS) por 1 hora. Por conseguinte, 100 µL de padrão de KIM-1 recombinante humano (nas concentrações de 1000 - 1,56 pg/mL) e o sobrenadante das células HK-2 foram adicionados aos seus poços e incubados durante 2 horas. As lavagens foram repetidas e 100 µL do anticorpo de detecção (biotinilado caprino anti-KIM-1) foram adicionados aos

poços, que novamente foram lavados e, a seguir, adicionados de 100 µL de solução de estreptavidina – HRP (*Horseradish Peroxidase*) e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens, 100 µL da solução de substrato (TMB- 3,30,5,50-tetra-methylbenzidine) foram adicionados aos poços, na ausência de luz, e incubados por 20 minutos. Por fim, 50 µL da solução de parada (H₂SO₄ 2N) foram colocados nos poços e foram medidas as absorvâncias a 450 nm com uma correção para 570 nm. A concentração de KIM-1 nas amostras foi calculada, baseando-se na curva padrão e expressa em termos absolutos em ng/mL de sobrenadante. Em seguida, a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (KIELKOPF *et al.* 2020) e o resultado foi expresso em ng/mg de proteína.

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fim de visualizar as alterações qualitativas na superfície celular foi realizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a qual consiste na utilização de um microscópio, que apresenta uma coluna de elétrons, angulada a uma coluna de íons, que gera íons carregados positivamente e os acelera em direção a amostra de maneira controlada. As duas colunas (elétrons e íons) tem bobinas de varredura, que possibilitam a passagem de feixes pela superfície da amostra, gerando imagens altamente precisas de valor tridimensional (SMITH & STARBORG, 2019).

As células HK-2 foram plaqueadas em uma concentração de 5×10^4 células/ml em placa de 24 poços, contendo uma lamínula de vidro circular no fundo de cada poço, e mantidas 24 horas incubadas para a completa adesão celular. A seguir, a placa foi submetida ao tratamento com IC₅₀ de Cetamina. Após 24 horas, foram adicionados aos poços o produto natural e as chalconas semissintéticas na concentração de 31,25 µM, que apresentou resultados satisfatórios nos ensaios de MTT. Por fim, após a incubação, as células foram fixadas durante 2 horas com 2,5% de glutaraldeído em PBS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), lavadas duas vezes com PBS e duas vezes com água destilada e foi realizada centrifugação (800 G/10 min). A seguir, as amostras foram desidratadas utilizando séries crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), fixadas com glutaraldeído a 2,5 % a 37°C com 5% de CO₂ e secas em dessecador contendo sílica gel *overnight*, metalizadas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura Microscópio Quanta 450 FEG-FEI, (Oregon, USA) (MELLO *et al.* 2017). As eletromicrografias digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0.

As células HK-2 foram plaqueadas em uma concentração de 5×10^4 células/ml em placa de 24 poços, contendo uma lamínula de vidro circular no fundo de cada poço, e mantidas 24 horas incubadas para a completa adesão celular. A seguir, a placa foi submetida ao tratamento com IC₅₀ de Cetamina. Após 24 horas, foram adicionados aos poços a HTMCX e as chalconas semissintéticas na concentração de 31,25 μ M, que apresentou resultados satisfatórios nos ensaios de MTT. Por fim, após a incubação, as células foram fixadas durante 2 horas com 2,5% de glutaraldeído em PBS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), lavadas duas vezes com PBS e duas vezes com água destilada e foi realizada centrifugação (800 G/10 min). A seguir, as amostras foram desidratadas utilizando séries crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), fixadas com glutaraldeído a 2,5 % a 37°C com 5% de CO₂ e secas em dessecador contendo sílica gel *overnight*, metalizadas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura Microscópio Quanta 450 FEG-FEI, (Oregon, USA) (Mello *et al.* 2017). As eletromicrografias digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0

4.6 Ensaio por citometria de fluxo.

A realização do método de citometria de fluxo permite que sejam quantificados cerca de até 50 parâmetros para milhões de células por amostra, dentre os quais diferentes parâmetros biológicos. O aparelho tornou-se cada vez mais complexo ao longo dos anos, devido a adição de lasers, detectores, filtros e, principalmente, o desenvolvimento de novos corantes, tais como os fluorocromos (VELDHOEN, 2017).

O princípio do ensaio por citometria de fluxo se baseia na contagem de células por contadores ativados por fluorescência. O processo ocorre através da injeção de células no centro de um feixe de solução salina continuamente, levando a passagem das células de forma individual pela câmara de leitura, transpassando feixes de luz de comprimentos de onda específicos. A forma de dispersão do feixe luminoso é responsável por cada tipo de medida. Por exemplo, a dispersão frontal (FSC – *Foward Scatter*) é utilizada para medir o tamanho da célula, já a dispersão lateral da luz (SSC – *Side Scatter*), que ocorre devido ao encontro do feixe de luz com organelas celulares e o núcleo, é utilizada para avaliação da complexidade celular. Adicionalmente, quando as células em análise são marcadas por sondas fluorescentes específicas, o feixe de luz pode ser detectado em leitores de fluorescência (FL), que são numerados de 1 a 5, que auxiliarão na determinação da identidade celular, status celular e fisiologia (MONTANTE e BRINKMAN, 2019).

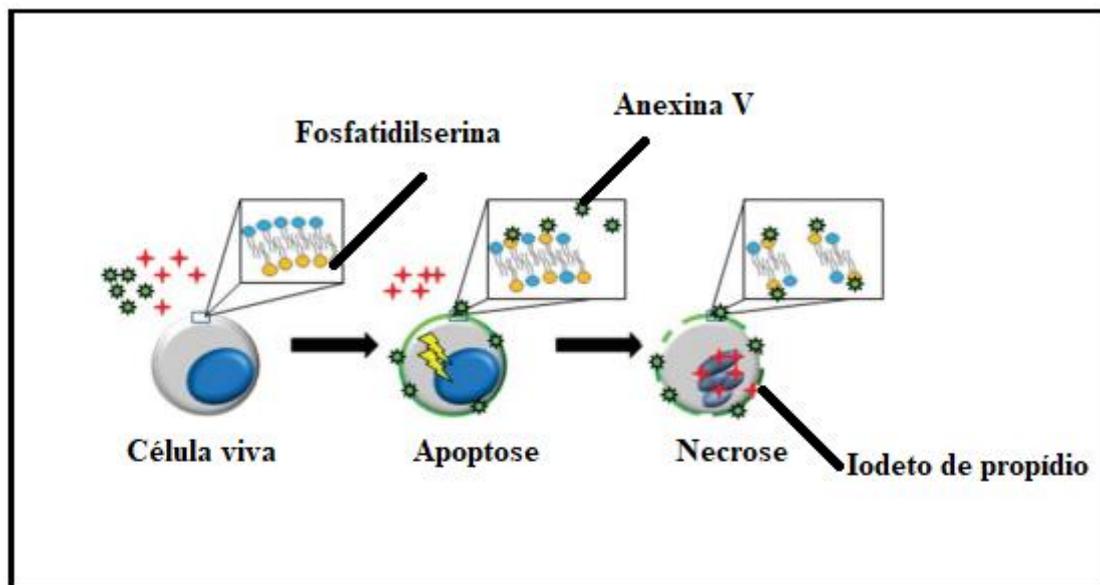
As análises por citometria de fluxo foram antecedidas do cultivo de células renais HK-2 em placa de 24 poços, divididas em grupo controle negativo, grupo controle positivo (Cetamina) e nos grupos tratados com chalconas semissintéticas e HTMCX. As células da placa foram lavadas com PBS, tripsinizadas e descoladas e, para que fosse possível a marcação fluorescente, o sobrenadante foi retirado e substituído por tampão de marcação (Hepes 10mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4). Por fim, em cada tubo foram analisadas 1×10^4 células no equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, New Jersey, USA), utilizando o *CellQuest Pro™ software*.

4.6.1 Avaliação do mecanismo de morte celular.

Para avaliar o mecanismo de morte celular envolvido no processo de interação entre as células HK-2 e a Cetamina foi realizada a marcação com as substâncias fluorescentes: Anexina V-PE (conjugada com ficoeritrina) e Iodeto de Propídio (PI).

Conforme demonstrado na figura 10, a superfície de células saudáveis é composta por moléculas lipofílicas, dentre as quais se destaca a fosfatidilserina. A molécula de fosfatidilserina é disposta de maneira internalizada na célula, porém, durante o processo de apoptose, por perda de assimetria celular, essa molécula é externalizada na membrana plasmática. A anexina V, uma proteína de ligação ao cálcio de 36 kDa, liga-se a fosfatidilserina, sendo utilizada, portanto, marcada com fluorescência, para detectar a fosfatidilserina externalizada por células apoptóticas. Sabendo disso e, para haver distinção entre células apoptóticas e necróticas, foi utilizada a marcação por Iodeto de Propídio (PI), molécula fluorescente que se liga ao material genético (DNA) de células necróticas com membrana permeabilizada (CROWLEY et al. 2016).

Figura 9: Princípio da metodologia da utilização de Anexina V e Iodeto de Propídio para detecção de mecanismos de morte celular.



Fonte: adaptada de Crowley *et al.* (2016).

O procedimento de análise se deu através do seguinte protocolo: as células-HK2 de cada poço da placa de 24 poços foram suspensas em 100 μ L de tampão de ligação; nos tubos foram adicionados 5 μ L de PI e 5 μ L de Ax/PE (0,5 mg/mL cada), sendo o processo realizado utilizando um kit comercial (Annexin V PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences). Em seguida, após 15 minutos de incubação sob abrigo da luz, foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no FACSCalibur (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em percentual de células não marcadas; células marcadas por PI, indicativo de necrose; células marcadas por anexina-V, indicativo de apoptose, e células duplamente marcadas, indicativo de apoptose tardia.

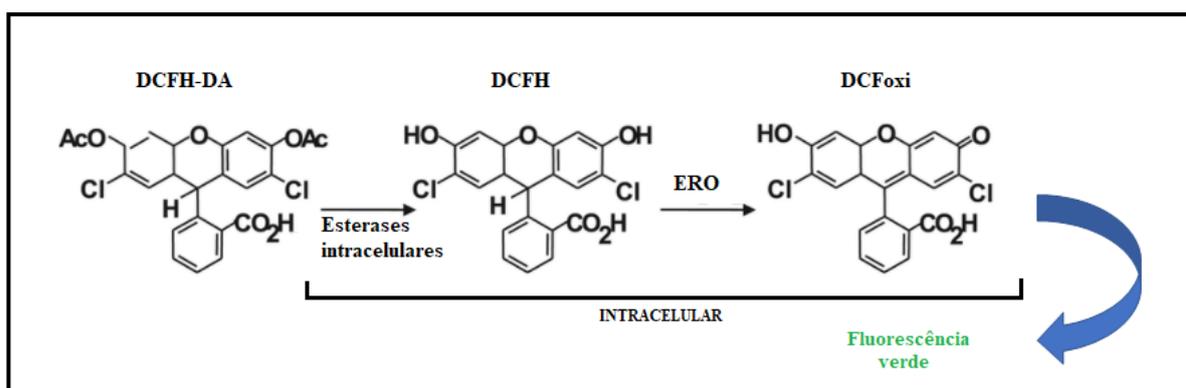
4.6.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) citoplasmáticas.

As células geram constantemente espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo aeróbico, sendo o dano oxidativo por ERO responsável pelos mecanismos de várias doenças. A fim de avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio no citoplasma de células HK-2 foi realizado o ensaio do DCFH-DA (2',7'- diacetato de diclorofluoresceína).

O DCFH-DA, uma molécula lipofílica, “célula-permeável”, não fluorescente e precursora do DCFH (2'-7'-diclorofluoresceína), pode ser usado como sonda intracelular

para estresse oxidativo. Essa molécula, dentro da célula, como mostra a figura 11, sofre a ação de enzimas esterases que desacetilam o DCFH-DA, formando, assim, o DCFH (2'-7'-diclorofluoresceína) que, por apresentar alta polaridade, fica preso na célula. A produção de ERO, durante a respiração celular, promove a oxidação do DCFH, formando, assim, o DCFOxi (2'-7'-diclorofluoresceína oxidada), molécula que apresenta fluorescência verde. O estado redox da amostra pode ser monitorado através da detecção do aumento dessa fluorescência a 530nm e, quando a amostra é excitada, a 488 nm pelo sensor FL1 do citômetro de fluxo. Assim, a medida da fluorescência verde emitida pela formação de DCFOxi é diretamente proporcional a capacidade oxidativa da célula, sendo um parâmetro confiável para a análise da produção de ERO citoplasmáticas (ARMSTRONG, 2010).

Figura 10: Princípio do método de análise de formação de ERO citoplasmáticas usando DCFH-DA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A fim de introduzir a sonda DCFH-DA na célula, 5µL (concentração final 20 µM) da solução estoque foram adicionados aos poços da placa de 24 poços contendo as células em cultivo tratadas imediatamente antes com Cetamina, HTMCX e CPN2F, que foi escolhida por apresentar resultados satisfatórios nos estudos anteriores, (ARMSTRONG, 2010). Após 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo. Dessa forma, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida, durante a respiração celular, pela oxidação do DCFH foi processada através do filtro de fluorescência verde, que é produzida através da formação de DCFOxi e é proporcional à capacidade oxidativa da célula, ou seja, a

intensidade de fluorescência intracelular é importante para a mensuração dos metabólitos oxidativos produzidos pela célula (ERUSLANOV & KUSMARTSEV, 2010).

Os resultados do ensaio acima 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 a média de fluorescência do controle. As demais leituras receberam valores proporcionais calculados por regra de três simples, conforme previamente descrito (JOHNSON *et al.*, 1980; POKORNÝ *et al.*, 2014).

4.6.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A fim de avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho 123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que apresenta a capacidade de ser absorvido, especificamente, por mitocôndrias de células vivas. Sabe-se que a membrana mitocondrial apresenta potencial elétrico negativo e que a rodamina 123 possui caráter catiônico permanente, sendo, então, atraída pela membrana da mitocôndria. Dessa forma, esse fluorocromo se incorpora nas organelas mitocondriais e emite fluorescência vermelha. Porém, quando são observadas alterações da integridade da mitocôndria, essas podem ser detectadas por ensaios de citometria de fluxo devido ao aumento da fluorescência verde citosólica frente a fluorescência vermelha mitocondrial, o que demonstra, assim, a presença da Rodamina 123 no citoplasma de células danificadas (PORTER *et al.* 1995).

O ensaio foi realizado com células HK2, que foram tratadas com cetamina, HTMCX e CPN2F nas concentrações previamente estabelecidas e descritas. Ao fim de 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células marcado com 5 μ L de Rodamina 123 (concentração final de 10 μ g/ mL) por meia-hora e, assim, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm.

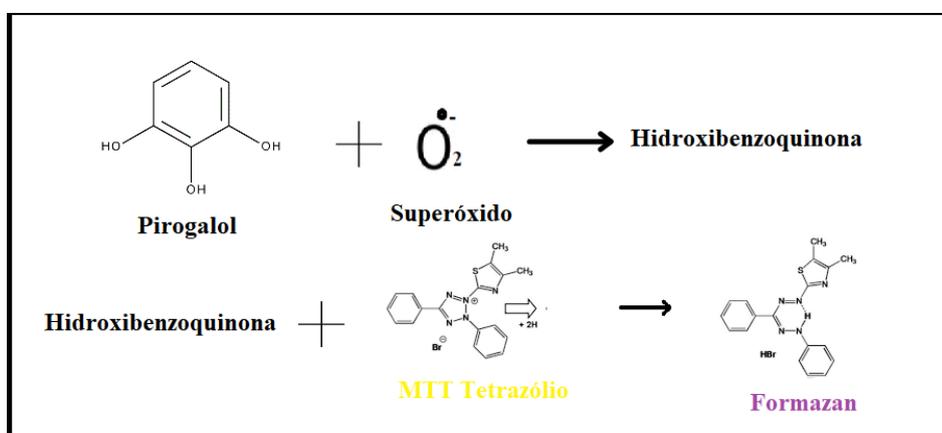
Os resultados do ensaio foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, a qual foi obtida a partir dos valores absolutos de intensidade de fluorescência dos quais foi calculada uma média geométrica e atribuído valor 1,0 para o controle, as médias dos demais grupos receberam valores proporcionais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

4.7 Ensaios de avaliação do estresse oxidativo em células renais HK-2

4.7.1 Avaliação do acúmulo de superóxido em células HK-2.

A avaliação do acúmulo do radical superóxido em células HK-2 foi adaptada do método indireto descrito por Bannister e Calabrese, (1987). O princípio do ensaio se baseia na auto oxidação do pirogalol, levando à formação da hidroxibenzoquinona. Este produto inibe a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Figura 12). O formazan formado a partir da redução do MTT pode ser detectado em um espectro de 570 nm.

Figura 11: Princípio do ensaio de acúmulo de superóxido.



Fonte: Elaborado pelo autor.

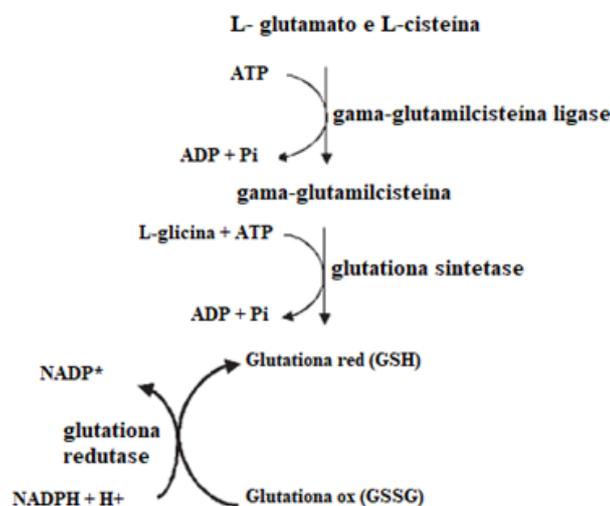
Para a realização da metodologia anteriormente citada, 30 μ L de amostra de sobrenadante de células HK2, 99 μ L de tampão de fosfato (PBS), 6 μ L de 1,25 mmol / L de MTT e 15 μ L de 100 μ mol/L de pirogalol foram dispostos em placa de 96 poços, onde o poço referente ao branco da reação continha apenas 144 μ L de tampão fosfato e 6 μ L de MTT. A placa foi incubada a 37 ° C por 10 min e, em seguida, 150 μ L de dimetilsulfóxido foram adicionados à placa para promover a parada da reação.

Para o cálculo do acúmulo de superóxido, o resultado obtido da amostra foi subtraído do valor encontrado para o branco e, a seguir, esse valor foi dividido pelo valor encontrado para o controle (leitura do poço subtraída do branco). A partir da correção para a concentração de proteínas totais no sobrenadante (LOWRY; ROSEBROUGH; RANDALL, 1951), a avaliação do acúmulo de superóxido foi expressa em nmol/mg de proteína.

4.7.2 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

Um ponto importante na determinação dos mecanismos do estresse oxidativo e da sinalização redox é a medição das diferentes formas de tióis nas células. A glutathiona (GSH) é um tri-peptídeo (gama-glutamilcisteinilglicina) que atua como um antioxidante endógeno e está envolvida na regulação metabólica. Sua síntese ocorre a partir de L-glutamato, L-cisteína e L-glicina em duas etapas, que geram gasto de ATP, sendo essas etapas catalisadas pelas enzimas gama-glutamilcisteína ligase e glutathiona sintetase. A porção tiol da cisteína confere ao GSH suas propriedades antioxidantes. O tiol é oxidado por pró-oxidantes celulares, como radicais livres e aldeídos reativos, para formar dissulfeto de GSH oxidado (GSSG). A redução de GSSG de volta ao GSH requer a presença de NADPH e é catalisado pela enzima glutathiona redutase, regenerando assim o GSH para a defesa antioxidante celular (Figura 13) (SLIVKA *et al.* 1987; OWEN & BUTTERFIELD, 2010).

Figura 12: Síntese, degradação e regeneração da molécula de glutathiona (GSH)



Fonte: adaptado de OWEN & BUTTERFIELD, (2010).

A fim de determinar a glutathiona reduzida (GSH), 400 uL das amostras da suspensão de lisado celular foram adicionados a 800 uL de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 uL do cromógeno DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2- nitrobenzóico)), denominado reagente de Ellman. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 412 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido), usando como curva de calibração um padrão de

GSH. Os resultados foram expressos em nmol GSH/ mg de proteínas (SHARMA et al., 1997).

4.8 Quantificação de biomarcadores inflamatórios no sobrenadante de células HK-2 tratadas com cetamina, HTMCX e CPN2F.

Os biomarcadores inflamatórios interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-6 (IL-6) foram dosados no sobrenadante de células HK-2, através da técnica de ELISA, um ensaio imunoenzimático de alta sensibilidade e especificidade, conforme explicitado anteriormente (JASCHKE, 2020).

Os níveis de IL-6 (Cat. D6050) e IFN- γ (Cat. DIF50C) no sobrenadante de células HK-2 foram determinados através de um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) comercial (R & D Systems, Minneapolis, EUA). Inicialmente, os poços das placas foram revestidos com o anticorpo de captura (IL-6 – 2,00 $\mu\text{g/mL}$; IFN- γ - 4,00 $\mu\text{g/mL}$) em um volume de 100 μL , e a placa foi selada e incubada *overnight* sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (400 μL de Tween-20 a 0,05% em PBS).

Após o bloqueio com 300 μL de albumina sérica bovina (BSA 1% em PBS) por 2 horas, 100 μL dos padrões de IFN- γ (1000 – 15,63 pg/mL) ou IL-6 (600 – 9,38 pg/mL) recombinantes humanos e sobrenadante de cultivo de células foram adicionados a cada poço e incubadas sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas, sendo a placa novamente lavada. Logo após, 100 μL de anticorpo anti-IFN- γ (200 ng/mL) ou anti-IL-6 (50 ng/mL) foram adicionados a cada poço e a placa incubada durante duas horas, sendo repetida a lavagem.

Por fim, em cada poço foram adicionados 100 μL de estreptavidina-HRP e incubados durante 20 minutos. Após realizada a lavagem, 100 μL do substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo a reação cessada com 50 μL de solução de parada. A absorbância foi medida a 450 nm, com correção de absorbância em 540 nm. As concentrações dos analitos foram calculadas com base nas curvas padrão (pg/mL).

4.9 Estudo *in silico*

4.9.1 Obtenção das estruturas moleculares

Os estudos *in silico* foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN/UECE), sob coordenação do professor Emmanuel Silva Marinho, com

o objetivo de observar possíveis mecanismos de ação das chalconas no modelo de indução de lesão renal por cetamina e baseando-se no que foi descrito por Lee *et. al* 2015, que demonstraram a capacidade de chalconas semissintéticas em reduzir a citotoxicidade em células renais através da inibição da via apoptótica de sinalização MAPKs-p53-caspase-3. Assim, a estrutura da cetamina foi importada do repositório virtual PubChem© (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (PubChem CID: 3821) e as estruturas das chalconas PN e CPN2F foram projetadas no *software* Marvin Sketch (<https://chemaxon.com/products/marvin>).

4.9.2 Docking molecular

As estruturas tridimensionais (3D) das proteínas estudadas foram obtidas no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), MAPK (PDB ID: 6MC1), JNK (PDB ID: 3O2M). Já os ligantes inibidores foram importados do repositório virtual PubChem © (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) JNK/46A (PubChem CID: 15658026) e MAPK/CJA (PubChem ID: 2820916). As simulações de docking molecular foram realizadas utilizando o *software* Autodoc Vina versão 1.1.2. Para cada análise, foram realizados 100 ciclos de 10 simulações independentes, utilizando o algoritmo Lamarkiano (TROTT & OLSON, 2010). Os escores de docking são usados como critério de seleção (e estes valores devem ser iguais ou inferiores a 6,0 kcal/mol e o RMSD (*Root Mean Square Deviation* menor que 2,0 Å) (SHITYAKOV & FORSTER, 2014). Com base nas observações das interações entre as moléculas e proteínas, as ligações de hidrogênio foram plotadas e classificadas de acordo com estudos anteriores que agrupam interações com distâncias entre 2,5 e 3,1 Å como fortes, de 3,1 a 3,55 Å como médias e > 3,55 Å como fracas (IMBERTY *et al.* 1991). Para análise de resultados e plotagem dos mapas, foram utilizados o UCSF Chimera 1.8 (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), LigPlot e o visualizador Discovery.

4.10 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A fim de comparar estatisticamente os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido de post-test de Bonferroni. Como critério de significância foi aceito $p < 0,05$. Para as análises estatísticas foi utilizado o *software* GraphPad Prism 7.03 (EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade da HTMCX e chalconas semissintéticas em células HK-2.

Foram realizadas as avaliações dos efeitos do produto natural e das chalconas semissintéticas em células tubulares HK-2, através do ensaio de redução do MTT, para que houvesse a seleção das concentrações não citotóxicas. Conforme mostra a Tabela 3, as concentrações 1000, 500, 250 μM da HTMCX foram tóxicas. Quando são observadas as toxicidades relacionadas as chalconas semissintéticas todas apresentaram toxicidade nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 μM . Sendo a concentração de 31,25 e 15,62 μM não tóxicas nas moléculas CNPDICI, CPN2F e CPN3NO₂. As substâncias semissintéticas, que apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade significativa em relação ao grupo controle (CT), e o produto natural foram escolhidos para posterior experimento de citoproteção.

Tabela 3: Percentual de viabilidade celular das células HK-2 tratadas com diversas concentrações da HTMCX e Chalconas semissintéticas.

Viabilidade Celular (%) HK-2								
(μ M)	HTMCX	CPNB	CPNC	CPN4Cl	CPNDICI	CPN4F	CPN2F	CPN3NO2
1000	32,9 \pm 0,8*	6,02 \pm 0,48*	32,9 \pm 0,8*	2,67 \pm 0,9*	47,7 \pm 1,9*	2,75 \pm 0,7*	17,0 \pm 0,6*	51,4 \pm 1,1*
500	52,9 \pm 1,3*	4,25 \pm 0,97*	52,9 \pm 1,4*	4,76 \pm 2,3*	67,9 \pm 0,3*	4,13 \pm 1,0*	19,2 \pm 1,6*	54,0 \pm 0,4*
250	57,6 \pm 0,4*	10,5 \pm 4,4*	28,4 \pm 2,8*	16,4 \pm 3,6*	62,1 \pm 4,8*	6,73 \pm 1,0*	32,2 \pm 1,0*	53,6 \pm 0,5*
125	80,1\pm5,6	20,6 \pm 6,0*	47,8 \pm 0,2*	33,5 \pm 3,3*	67,2 \pm 0,3*	16,8 \pm 1,8*	62,4 \pm 0,4*	72,9 \pm 1,4*
62,5	96,9\pm6,6	32,1 \pm 1,67*	55,8 \pm 4,2*	37,8 \pm 1,7*	71,2 \pm 3,2*	40,6 \pm 5,0*	72,5 \pm 0,5*	75,9 \pm 0,9*
31,25	110,5\pm2,6	30,3 \pm 3,5*	49,5 \pm 0,3*	46,9 \pm 1,7*	75,8\pm0,8	48,8 \pm 8,6*	84,3\pm2,7	80,2\pm2,0
15,62	101,4\pm0,8	-	79,7 \pm 3,0*	-	85,4\pm2,2	-	87,1\pm3,0	91,3\pm2,1
0 (CT)	93,9 \pm 0,9	8,1 \pm 1,0	93,9 \pm 0,9	81,1 \pm 1,0	93,9 \pm 0,9	81,1 \pm 1,0	93,9 \pm 0,9	93,9 \pm 0,9

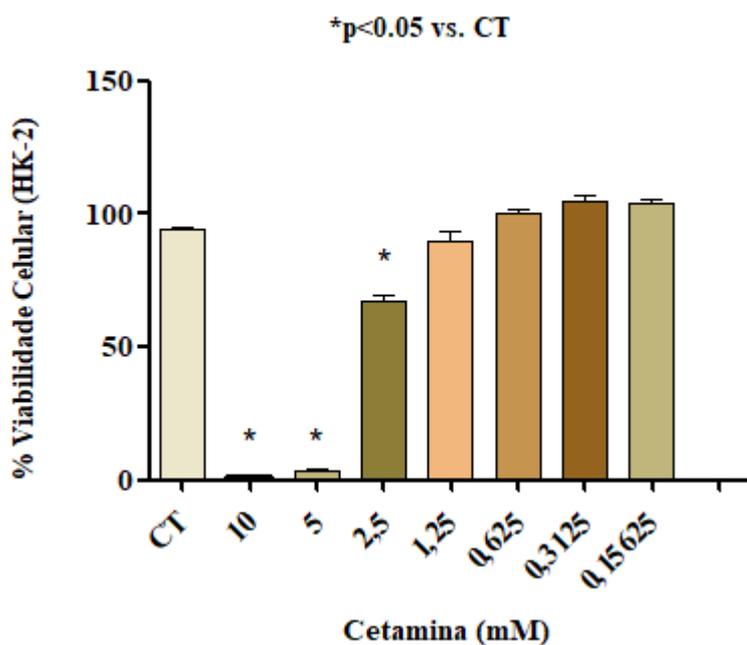
Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, * p <0,05 vs. CT (controle negativo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Citotoxicidade induzida por Cetamina em células HK-2.

A fim de avaliar a citotoxicidade da Cetamina nas células HK-2 foi realizado o ensaio de redução do MTT, o qual mostrou que a Cetamina apresentou toxicidade elevada nas concentrações 10, 5, 2,5, 1,25 mM. Através dos cálculos de regressão linear, a $IC_{50} = 2,55 \pm 0,18$ foi calculada para utilização em experimentos posteriores (Figura 14 e Tabela 4).

Figura 13: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de Cetamina.



Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, * $p < 0,05$ vs. CT (controle negativo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 4: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de Cetamina

	Cetamina (mM)							
	CT	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625
Viabilidade	93,9 ± 1,2							
Celular (%) HK-2		1,37 ± 0,1*	3,46 ± 0,5*	67,2 ± 0,2*	90,0 ± 3,4	100,5 ± 1,4	105,1 ± 1,8	104,1 ± 1,5

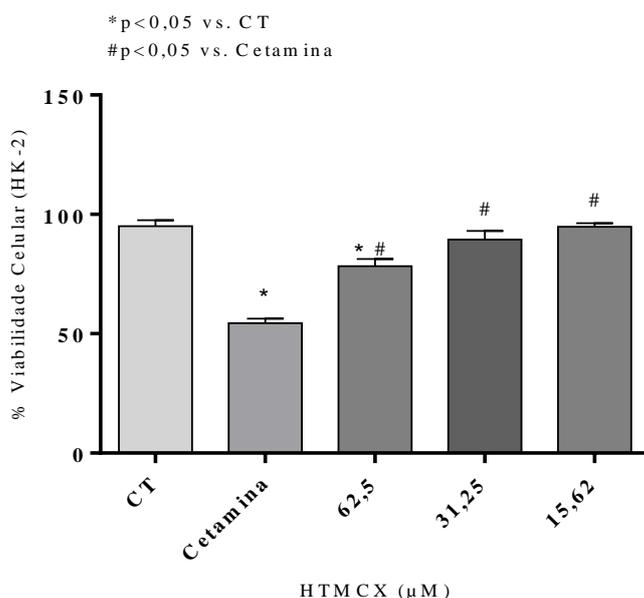
Legenda: Os dados estão expressos como média padrão ± EPM, *p<0,05 vs. CT (controle negativo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 Avaliação do efeito citoprotetor da HTMCX sobre a toxicidade em células renais HK-2 induzida pela Cetamina.

Como observado na figura 15 e na tabela 5, as células HK-2 tratadas com Cetamina na concentração de $2,55 \pm 0,18$ mM (IC_{50}) apresentaram 50% de viabilidade celular. As concentrações 62.5, 31.25 e 15.62 μ M da HTMCX foram escolhidas para o tratamento das células, por serem não tóxicas no ensaio anterior. Após avaliação, o produto natural demonstrou promover proteção em todas as concentrações, sendo as concentrações de 31.25 e 15,62 μ M capazes de gerar valores de viabilidade, respectivamente, de 89% e 94%, promovendo, dessa forma, uma redução da toxicidade de aproximadamente 35% para a concentração de 31,25 μ M e 40% para concentração 15,62 μ M em relação ao grupo tratado com Cetamina.

Figura 14: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de HTMCX



Legenda: Os experimentos foram realizados com $n=3$ e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Na análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido de pós teste de Bonferroni, * $p<0,05$ vs. CT (controle negativo); # $p<0,05$ vs. Cetamina IC_{50} (mM).

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 5: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes de HTMCX.

Viabilidade Celular (%) HK-2	
(μM)	HTMCX
62,5	78,3 \pm 3,0*#
31,25	89,3 \pm 3,7#
15,62	94,5 \pm 1,5#
Cetamina	54,4 \pm 1,8*
0 (CT)	94,5 \pm 2,2

Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, * $p < 0,05$ vs. 0 CT (controle negativo); # $p < 0,05$ vs. Cetamina IC₅₀ (mM). HTMCX= 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona. Na análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

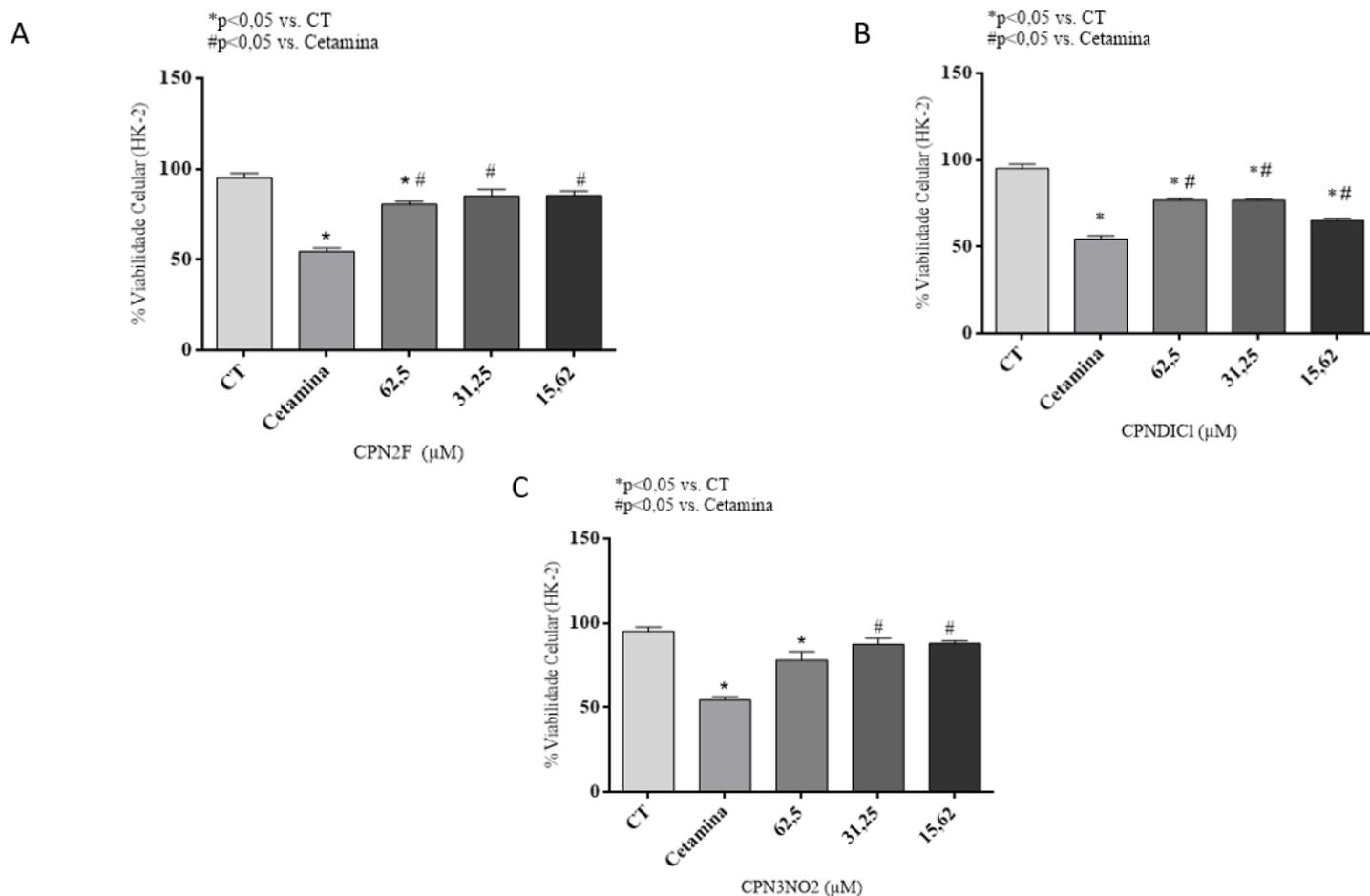
Fonte: Dados da pesquisa.

5.4 Avaliação do efeito citoprotetor das chalconas semissintéticas intituladas CPN2F, CPNDICI e CPN3NO2 sobre a toxicidade em células renais HK-2 induzida pela Cetamina.

A figura 16 e a tabela 6 mostram os dados da avaliação do efeito citoprotetor das chalconas semissintéticas derivadas da HTMCX sobre a toxicidade induzida por cetamina em células renais. As células tratadas com Cetamina na concentração de 2,55 mM apresentaram 50% de viabilidade celular. Assim como para HTMCX, a chalcona semissintética CPN2F foi utilizada para o tratamento e nas concentrações de 31,25 e 15,62 μ M apresentou viabilidade de cerca de 80%, sendo capaz de reduzir a toxicidade da Cetamina, nas células HK-2, em 25,6%, quando comparadas ao grupo controle positivo (cetamina). A chalcona semissintética CPNDICI, nas concentrações de 31,25 e 15,62 μ M, foi capaz de manter a viabilidade celular em cerca de 70%, 79% e 67% nas concentrações 62,5, 31,25 e 15,62 μ M, respectivamente, o que mostra uma redução da toxicidade da Cetamina de 15,6%, 24,6% e 12,6% quando comparadas ao grupo controle positivo (cetamina). Porém, mesmo alcançando a citoproteção, o tratamento com a chalcona ainda gerou citotoxicidade nas células HK-2, quando comparado ao grupo controle negativo (CT). Por fim, a CPN3NO2 foi capaz de aumentar a viabilidade celular de forma significativa nas concentrações de 31,25 e 15,62 μ M em torno de 87,5% e 87,9%, respectivamente. Promovendo, assim, uma redução de 27% na toxicidade da

Cetamina, quando comparamos os grupos tratados com o grupo controle positivo (cetamina).

Figura 15: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes das chalconas semissintéticas CPN2F, CPNDIC1 e CPN3NO2.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=3 e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Na análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido de pós teste de Bonferroni, *p<0,05 vs. CT (controle negativo); #p<0,05 vs. Cetamina IC₅₀ (mM). A) viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes da chalcona semissintética CPN2F; B) viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes da chalcona semissintética CPNDIC1; C) viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes da chalcona semissintética CPN3NO2.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 6: Percentual de viabilidade das células HK-2 tratadas com concentrações decrescentes das chalconas semissintéticas CPN2F, CPNDIC1 e CPN3NO2.

Viabilidade Celular (%) HK-2			
(μM)	CPN2F	CPNDIC1	CPN3NO2
62,5	78,9 \pm 1,8*#	70,2 \pm 4,1*#	69,7 \pm 6,1*
31,25	80,7 \pm 2,7#	79,6 \pm 2,0*#	87,5 \pm 3,7#
15,62	80,5 \pm 3,5#	67,0 \pm 2,1*#	87,9 \pm 1,6#
Cetamina	54,4 \pm 1,8*	54,4 \pm 1,8*	54,4 \pm 1,8*
0 (CT)	94,5 \pm 2,2	94,5 \pm 2,2	94,5 \pm 2,2

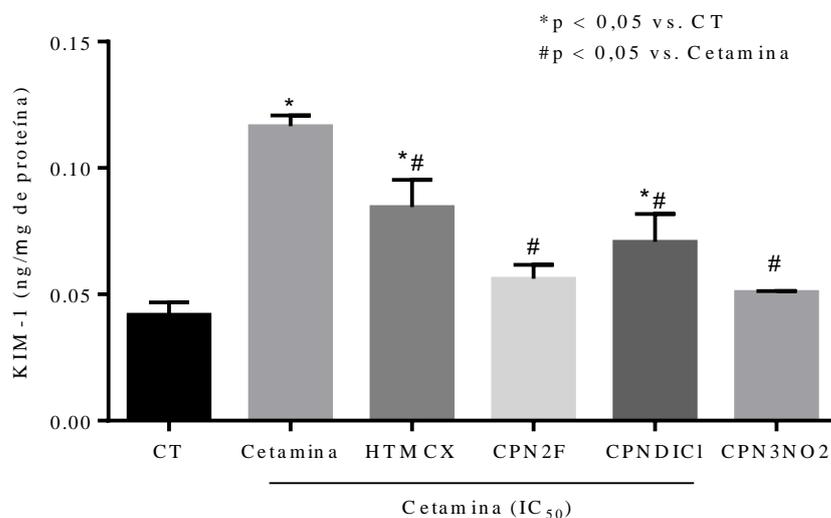
Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, *p<0,05 vs. 0 CT (controle negativo); #p<0,05 vs. Cetamina IC₅₀ (mM). Na análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.5 Liberação da Molécula da Injúria Renal (KIM-1) em células HK-2.

Para analisar o dano específico causado pelo tratamento com cetamina em células renais tubulares, foi realizada a mensuração da liberação de KIM-1, onde se utilizou o sobrenadante da cultura celular. Observando a figura 17 e tabela 7, se visualiza que o tratamento com a Cetamina (IC₅₀) foi capaz de aumentar em, aproximadamente, três vezes os níveis basais de KIM-1 nas células, quando comparado ao grupo controle negativo (CT).

A fim de avaliar esse acúmulo de KIM-1 na presença do tratamento com as chalconas (PN, CPN2F, CPNDIC1 e CPN3NO2) foi utilizada a concentração intermediária de 31,25 μ M e se observou que todas as chalconas foram capazes de inibir a liberação de KIM-1 pelas células. Adicionalmente, as chalconas semissintéticas CPN2F e CPN3NO2 apresentaram capacidade de reversão completa dos níveis de KIM-1, diminuindo-os, respectivamente, em 52% e 57%, quando comparadas ao grupo Cetamina.

Figura 16: Níveis de Molécula da Injúria Renal (KIM-1) em células HK-2

Legenda: Os dados foram expressos como média \pm EPM, onde CT = Controle Negativo, PN = Produto Natural, CPN2F, CPNDICI e CPN3NO2 = Chalconas semissintéticas. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.
Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 7: Níveis de Molécula da Injúria Renal (KIM-1) em células HK-2

Grupos	KIM-1 (ng/mg de proteína)
Controle	0,04194 \pm 0,002
Cetamina (IC ₅₀)	0,1166 \pm 0,002*
HTMCX 31,25 μ M	0,08451 \pm 0,005*#
CPN2F 31,25 μ M	0,05621 \pm 0,002#
CPNDICI 31,25 μ M	0,07082 \pm 0,005*#
CPN3NO2 31,25 μ M	0,05093 \pm 0,0001*#

Legenda: Os dados foram expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós tese de Bonferroni *p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. Cetamina.
Fonte: Dados da pesquisa.

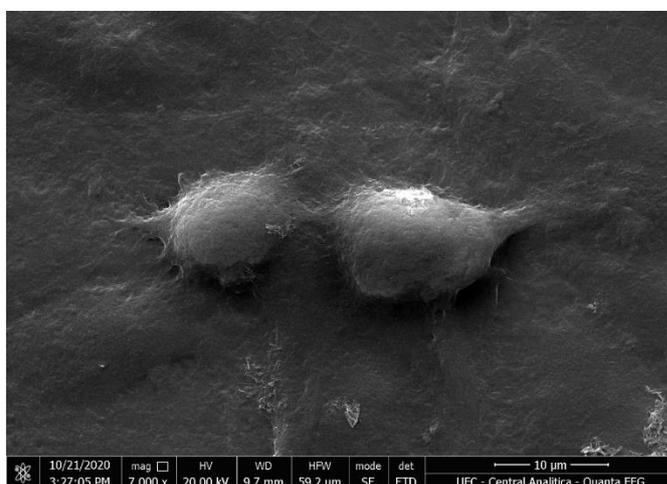
5.6 Microscopia eletrônica de varredura de células renais HK2.

A fim de observar o dano celular renal produzida pela Cetamina e da citoproteção conferida as células pela HTMCX e por suas chalconas semissintéticas (CPN2F, CPNDICI e CPN3NO2) foram realizadas análises utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme demonstrado nas figuras (Figuras 18,19,20).

Para o grupo controle negativo (CT), células renais HK-2 não tratadas foram utilizadas, enquanto para demonstrar as lesões obtidas pela Cetamina, se utilizou a concentração definida pela IC_{50} ($2,55 \pm 0,18$ mM) e se observaram alterações, tais como formação de corpos apoptóticos devido a fragmentação do citoplasma, redução acentuada do volume celular e encolhimento do citoplasma.

Para que fosse possível a observação do processo de citoproteção, a concentração intermediária de $31,25 \mu\text{M}$ foi escolhida como padrão para todos os grupos tratados (HTMCX, CPN2F, CPNDICI e CPN3NO2). A partir disso, temos que os tratamentos foram capazes de reverter parcialmente as alterações causadas pelo uso da Cetamina, principalmente, no grupo denominado CPN2F (figura 20)

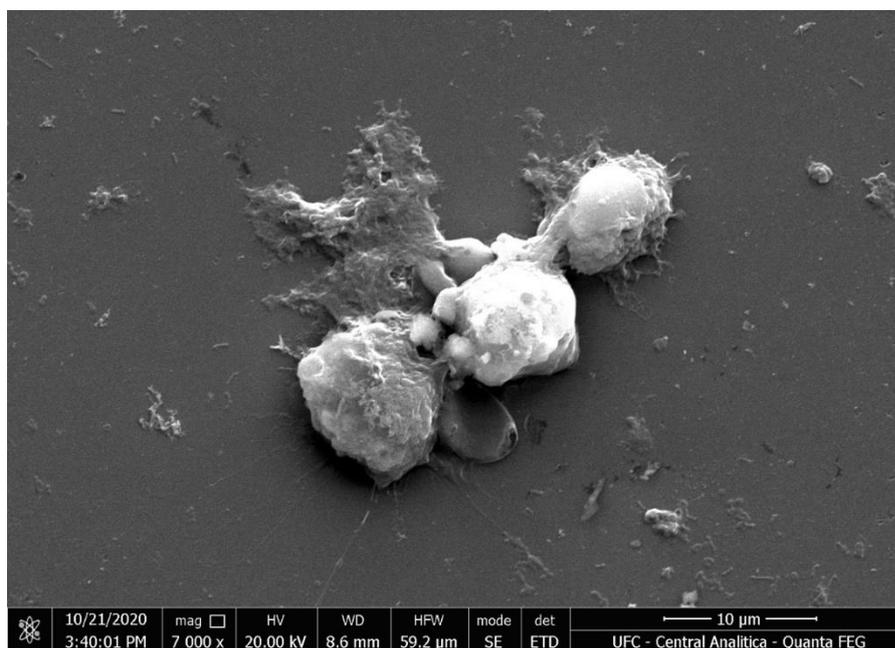
Figura 17: Eletromicrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células renais HK-2 em aerobiose.



Legenda: São observadas células renais HK-2 em aerobiose. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ($\times 50.000$).

Fonte: Dados da pesquisa.

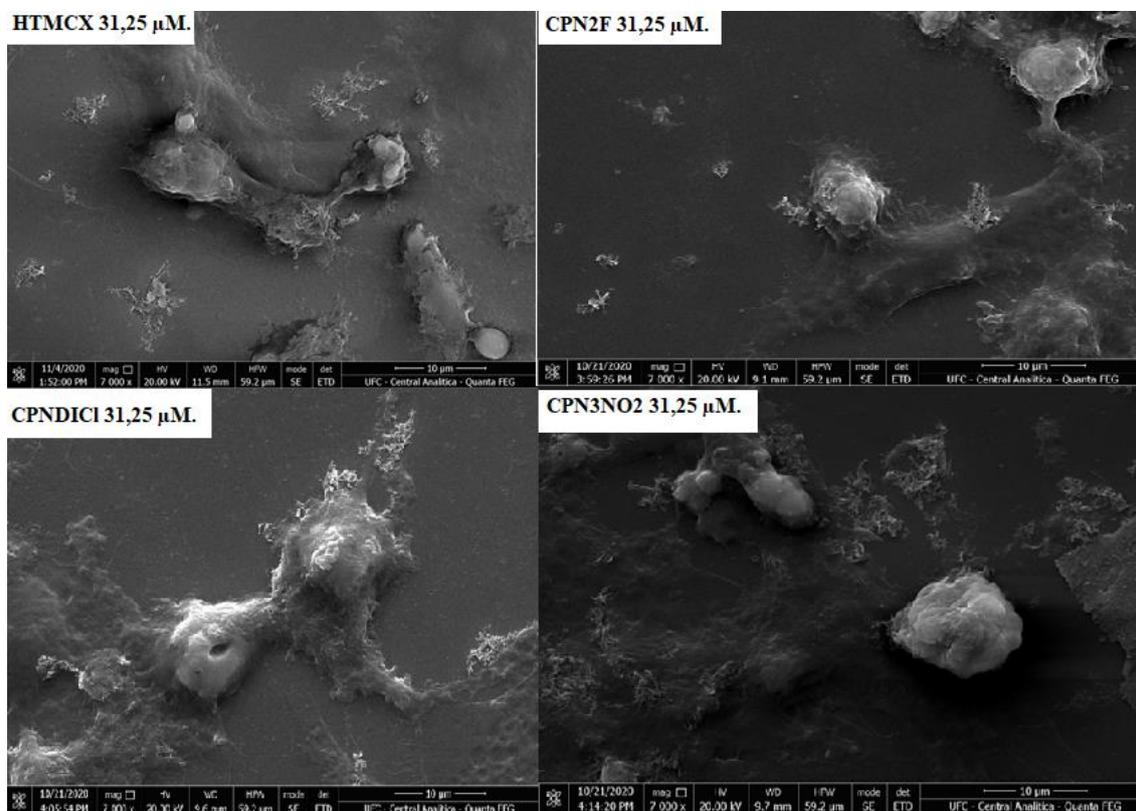
Figura 18: Eletromicrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células renais HK-2 submetidas a lesão pelo tratamento com Cetamina.



Legenda: São observadas células renais HK-2 em processo indicativo de apoptose. Barra de escala: 10 μm. As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI (×50.000).

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 19: Eletromicrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células renais HK-2 submetidas ao tratamento com HTMCX, CPN2F, CPNDICI e CPN3NO2.



Legenda: São observadas células renais HK-2 em processo indicativo de apoptose. Barra de escala: 10 μm. As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI (×50.000).

Fonte: Dados da pesquisa.

5.7 Ensaios por citometria de fluxo.

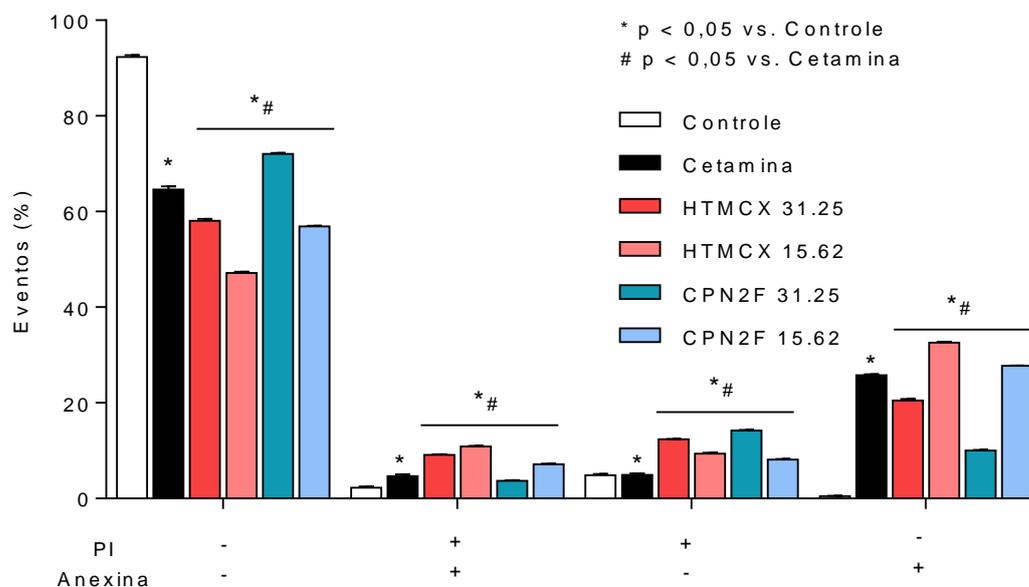
Devido a compilação de resultados prévios e com base na análise microscópica das células, se optou por prosseguir o estudo utilizando-se, apenas, a HTMCX e a chalcona semissintética (CPN2F) nas concentrações de 31,25 μM e 15,62 μM, que foram submetidos a ensaios de análise do potencial óxido-redutor por citometria de fluxo.

5.7.1 Avaliação de mecanismos de morte celular.

A figura 21 mostra a ocorrência de marcação representativa com Anexina-V nas células tratadas com a Cetamina (IC₅₀), apresentando 25,78 ± 0,17 % de marcação, percentual este que era próximo a zero no controle negativo (0,52 ± 0,05 %). Avaliando

os grupos tratados HTMCX e CNP2F, na concentração de 31,25 μ M, foi possível evidenciar os efeitos antiapoptóticos dessas substâncias, que reduziram significativamente o percentual de células marcadas com Anexina-V para $20,46 \pm 0,36$ % (grupo HTMCX) e $10,03 \pm 0,14$ % (CNP2F) em relação ao grupo Cetamina. A figura 21 mostra densidade comparativa da avaliação da via de morte celular, onde no controle as células estão no quadrante inferior direito. Se observou, que o deslocamento da população de células para cima indica marcação com PI e para a direita com a anexina-V.

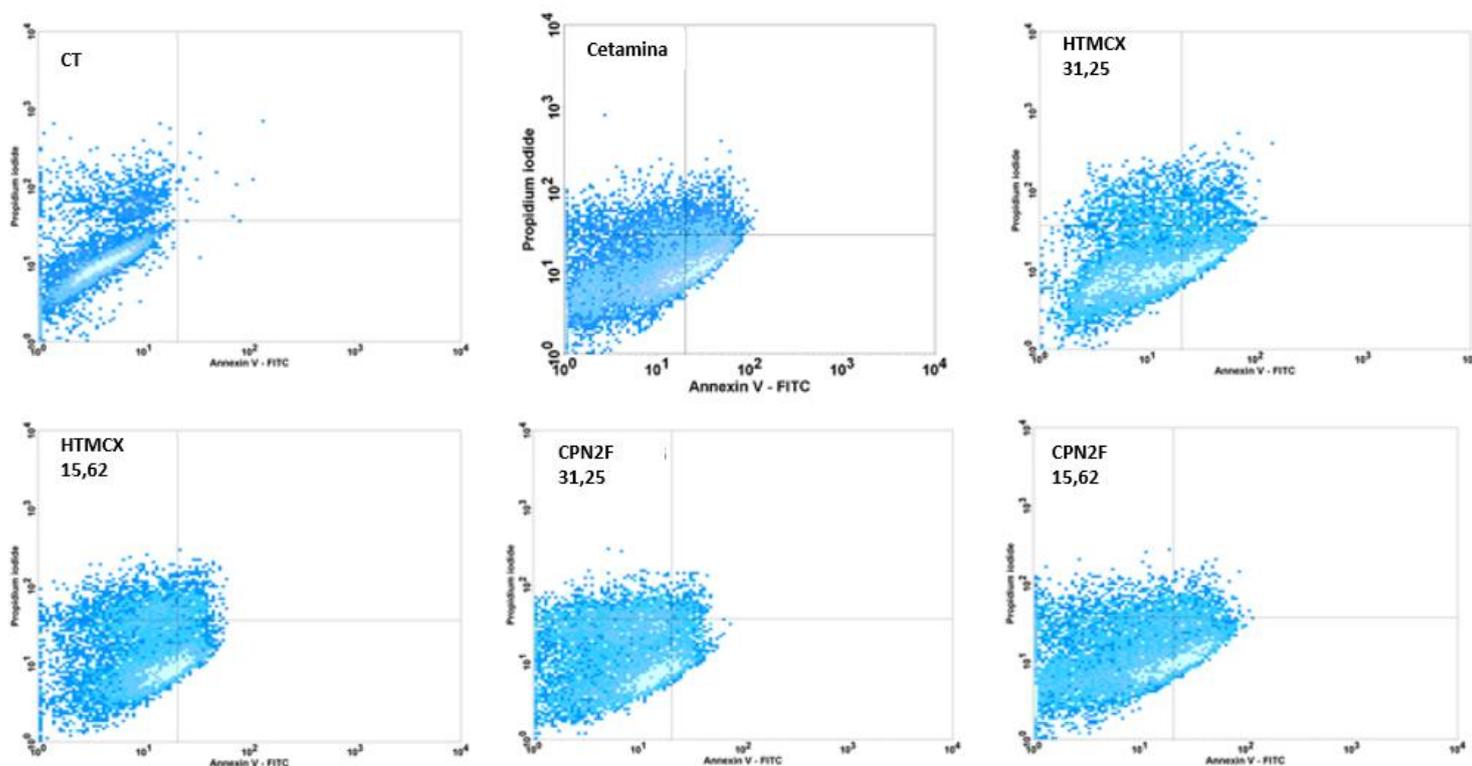
Figura 20: Ensaio de avaliação da via de morte celular em células tubulares renais. As células necróticas foram marcadas por PI e as células apoptóticas foram marcadas por Anexina-V.



Legenda: Os dados foram expressos em média da porcentagem de distribuição de eventos (células) \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Grupo controle (CT)/ # $p < 0,05$ vs. Cetamina (IC_{50}). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 21: Gráficos *Density Plot* representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por PI (Iodeto de Propídio) e as células apoptóticas foram marcadas por Anexina V.



Legenda: Considera-se (CT)= Controle Negativo; (HTMCX) = 2-hidroxi-3,4,6 – trimetoxiacetofenona; (CPN2F) = chalcona semissintética.

Fonte: Dados da pesquisa.

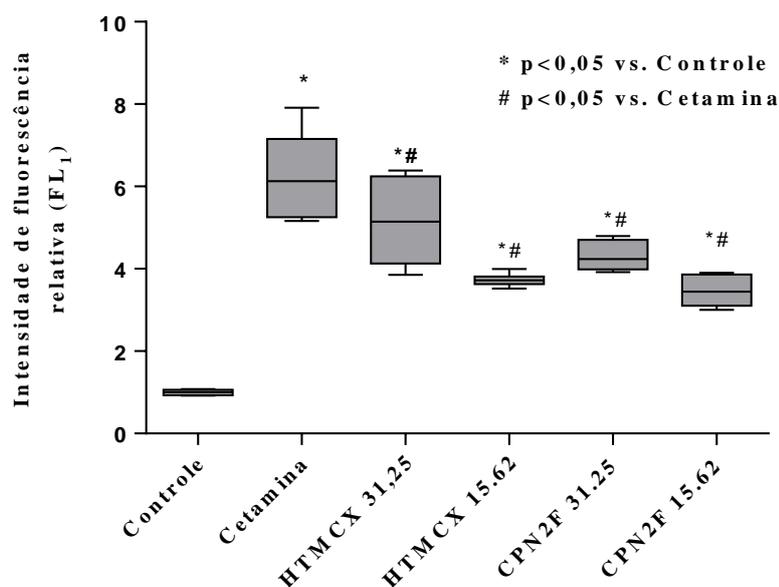
5.7.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) citoplasmáticas.

Conforme observado no experimento de avaliação de morte celular, a utilização de Cetamina em células HK-2 gerou, preferencialmente, morte celular por apoptose. Sabendo que a apoptose tem como uma de suas principais causas o processo de estresse oxidativo produzido pelo acúmulo de ERO citoplasmáticas, se optou pela realização da avaliação da produção dessas espécies através da medição da fluorescência relativa à oxidação do DCFH-DA.

A figura 22 e a tabela 8 demonstram, através da intensidade da fluorescência relativa, que a utilização de Cetamina em células HK-2 foi capaz de aumentar significativamente a produção de ERO em 525% dentro da célula. Por conseguinte, observou-se que o tratamento com as chalconas (HTMCX e CPN2F) nas concentrações de 31,25 e 15,62

μM foram capazes de reduzir significativamente essa produção, quando comparados ao grupo Cetamina. Sendo a redução em 17,60 % e 40,40 %, respectivamente, no grupo HTMCX nas concentrações 31,25 e 15,62 μM e, no grupo CPN2F 31,25 e 15,62 μM , respectivamente, em 30,99 % e 44,62 %. Os histogramas (Figura 23) das populações celulares demonstraram que a Cetamina (pico vermelho) aumentou a fluorescência em comparação ao grupo controle (pico cinza). O HTMCX (pico azul) foi capaz de reduzir esse pico, indicando, assim, a redução do acúmulo de ERO nas duas concentrações. Tal comportamento também foi encontrado para as duas concentrações de CPN2F. Além disso, o tratamento com as chalconas promoveu o deslocamento da população celular para a esquerda, indicando a redução na fluorescência.

Figura 22: Análise do estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas em células HK-2 por citometria de fluxo (Ensaio DCFH-DA).



Legenda: Os dados foram expressos como fluorescência relativa ao controle \pm EPM e analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, onde * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. Cetamina.

Fonte: Dados da pesquisa.

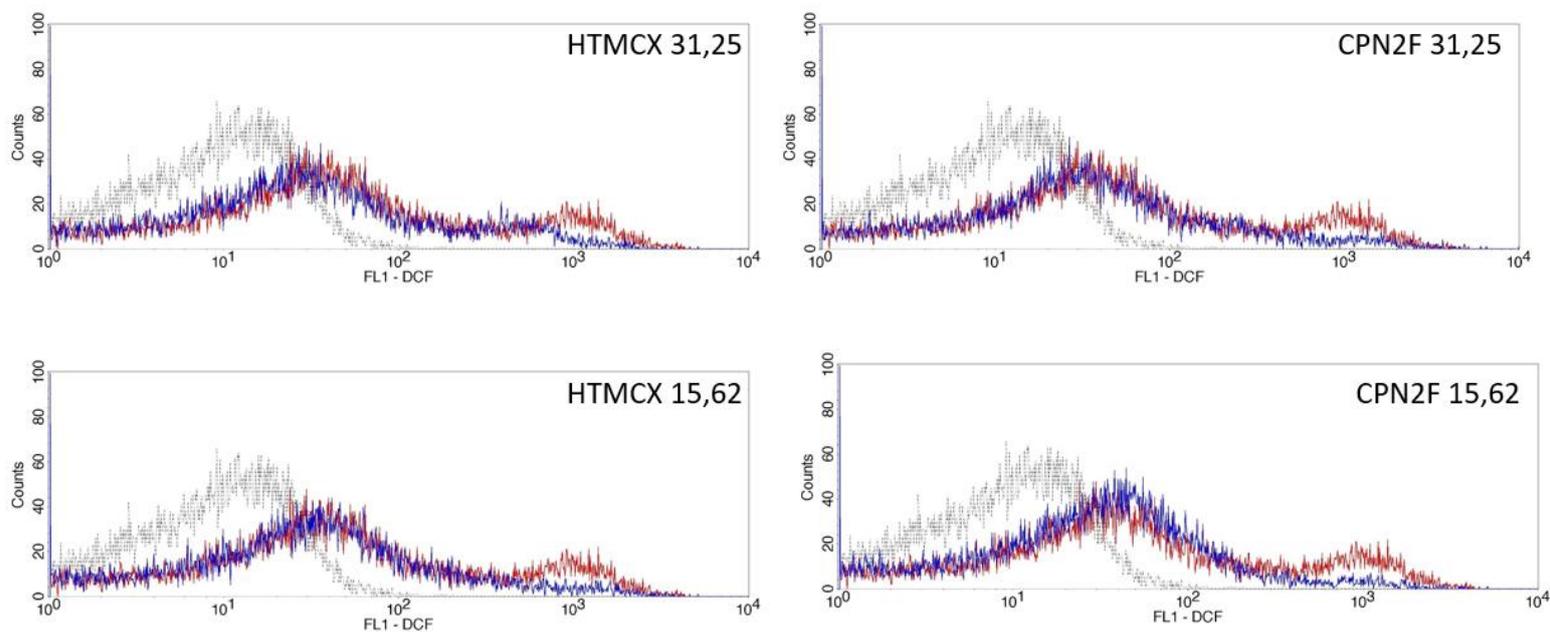
Tabela 8: Avaliação da produção de EROs citoplasmáticas. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células renais HK-2 submetidas ao tratamento com Cetamina e tratadas com diferentes concentrações de chalconas (produto natural e semissintética).

	Controle	Cetamina	HTMCX 31,25	HTMCX 15,62	CPN2F 31,25	CPN2F 15,62
IFR	1,00 ± 0,02	6,25 ± 0,3*	5,15 ± 0,3*#	3,73 ± 0,04*#	4,31 ± 0,11*#	3,46 ± 0,11*#

Legenda: Os dados foram expressos como fluorescência relativa ao controle ± EPM e analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, onde *p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. Cetamina. PN = produto natural (µM); CPN2F = chalcona semissintética (µM).

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 23: Histograma representativo do ensaio (DCFH-DA), mostrando o grupo tratado com HTMCX e CPN2F 31,25 e 15,62 μM



Legenda: A figura representa o grupo controle (cinza), o grupo tratado com Cetamina (vermelho) e o grupo tratado com substância (HTMCX ou CPN2F) 31,25 e 15,62 μM (azul), onde os picos demonstram a contagem de eventos (células) que apresentam a sua devia fluorescência.

Fonte: Dados da pesquisa

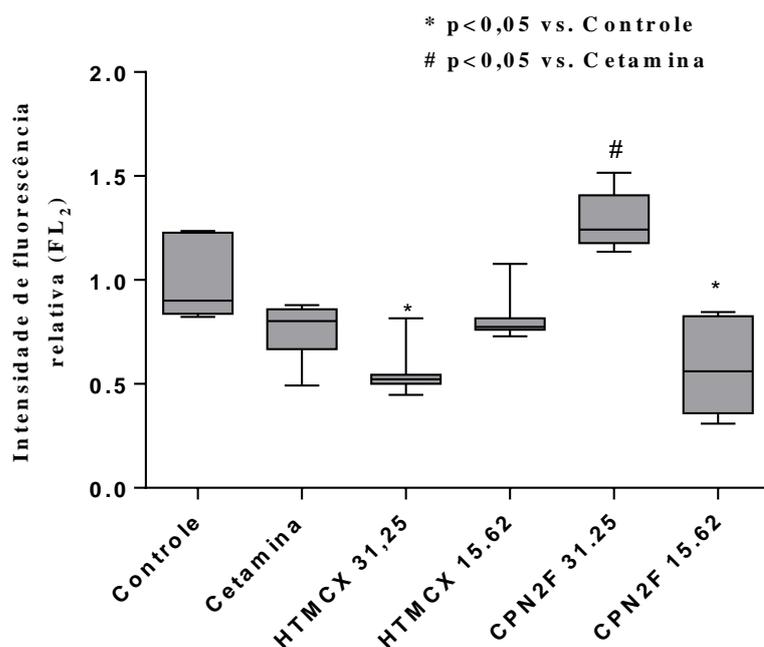
5.7.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Sabendo que o tratamento com Cetamina foi responsável por grande acúmulo de ERO dentro da célula e que esse acúmulo pode levar à disfunção mitocondrial, principalmente, no âmbito do potencial elétrico transmembrana, que é responsável pela respiração celular, se avaliou, então, o $\Delta\Psi_m$ através de uma sonda fluorescente denominada Rhodamine-123.

A figura 24 e tabela 9 demonstram os resultados através da intensidade de fluorescência relativa. Os resultados mostraram que o grupo tratado com Cetamina teve o seu potencial mitocondrial reduzido em 25%, quando comparado com o grupo controle negativo (CT). Adicionalmente, temos que o grupo CPN2F 31,25 μM apresentou um aumento significativo do $\Delta\Psi_m$, atingindo um pico à esquerda em relação ao grupo

controle negativo (CT), demonstrando, assim, o melhor comportamento entre os grupos. Além disso, observam-se os histogramas representativos das populações celulares, onde os picos à esquerda indicam redução potencial transmembrânico e picos à direita o aumento desse potencial (Figura 25).

Figura 24: Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células HK2 por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.



Legenda: Os dados foram expressos como fluorescência relativa ao controle \pm EPM e analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, onde *p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. Cetamina.

Fonte: Dados da pesquisa.

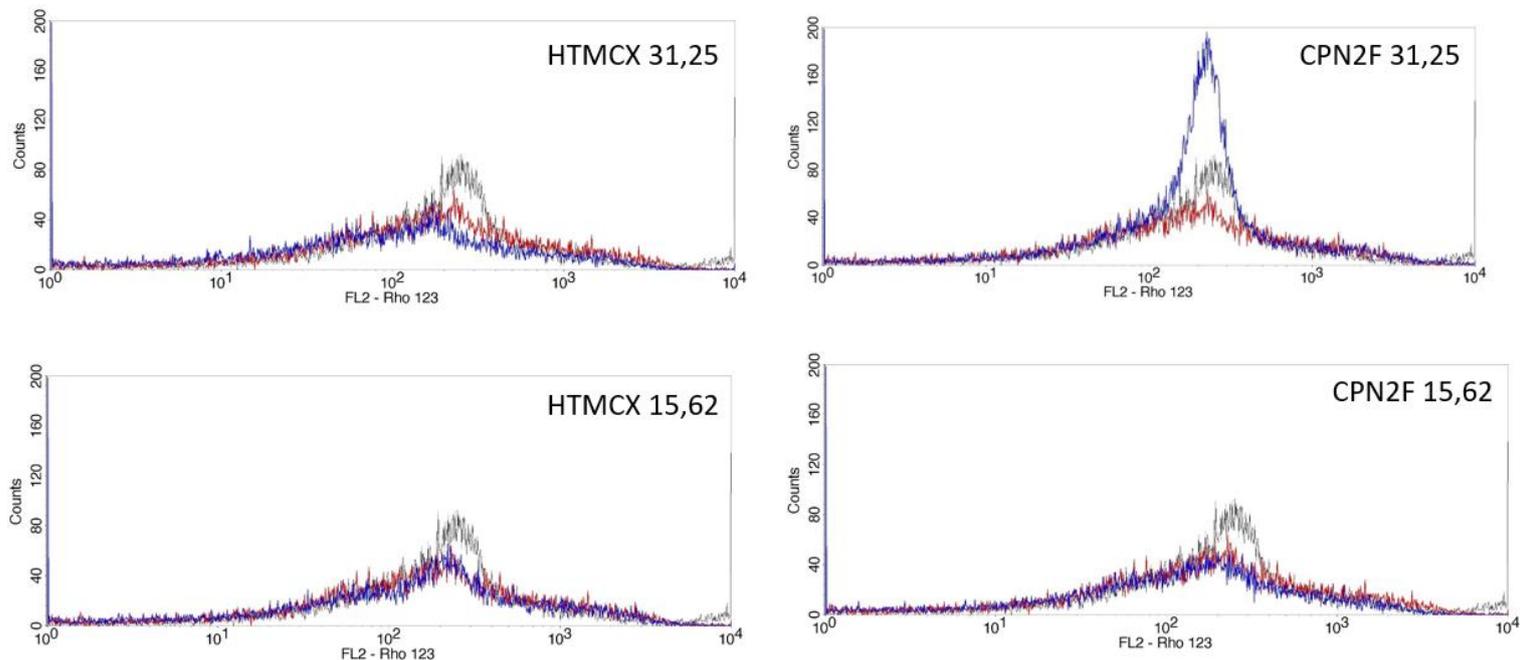
Tabela 9: Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial. Intensidade de fluorescência relativa (IFR) das células HK2 submetidas ao tratamento com Cetamina e tratadas com diferentes concentrações de chalconas (produto natural e semissintética).

	Controle	Cetamina	HTMCX 31,25	HTMCX 15,62	CPN2F 31.25	CPN2F 15.62
IFR	1,00 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,54 ± 0,03	0,8 ± 0,03	1,29 ± 0,04	0,58 ± 0,07

Legenda: Os dados foram expressos como fluorescência relativa ao controle ± EPM e analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, onde *p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. Cetamina. HTMCX = 2-hidroxi-3,4,6- trimetoxiacetofenona (µM); CPN2F = chalcona semissintética (µM).

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 25: Histograma representativo do ensaio (Rodamina 123), demonstrando o grupo tratado com HTMCX e CPN2F nas concentrações de 31,25 e 15,62 μM

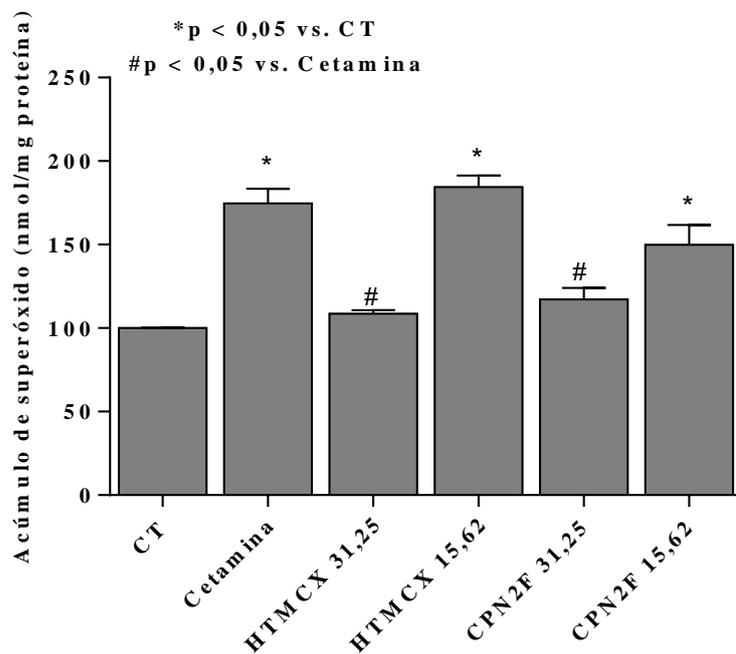


Legenda: A figura representa o grupo controle (cinza), o grupo tratado com Cetamina (vermelho) e o grupo tratado com substância (HTMCX ou CPN2F) 31,25 e 15,62 μM (azul), onde os picos demonstram a contagem de eventos (células) que apresentam a sua devida fluorescência.

Fonte: Dados da pesquisa

5.8 Avaliação do acúmulo de superóxido em células HK-2

Como forma de complementar os estudos previamente realizados, decidiu-se por avaliar o acúmulo de superóxido (O_2^-), em células renais HK-2. A figura 26 e tabela 10 demonstram que no grupo tratado com Cetamina houve um aumento significativo de 74,6% no acúmulo de superóxido, quando comparado ao grupo controle negativo (CT). Além disso, o tratamento com as chalconas (PN e CPN2F) nas concentrações de 31,25 μM foram capazes de reduzir significativamente esse acúmulo, sugerindo, assim, um efeito antioxidante nas células HK-2.

Figura 27: Avaliação do acúmulo superóxido (O_2^-) em células renais HK-2.

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM, *p<0,05 vs. CT; #p<0,05 vs. Cetamina. Para análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 10: Avaliação do acúmulo de superóxido (O_2^-) em células renais HK-2.

	Controle	Cetamina	HTMCX 31,25	HTMCX 15,62	CPN2F 31.25	CPN2F 15.62
Acúmulo de O_2^- (nmol/mg de proteína)	100 ± 0,29	174,6 ± 8,73	108,7 ± 2,16	184,36 ± 6,84	117,2 ± 6,8	149,9 ± 8,3

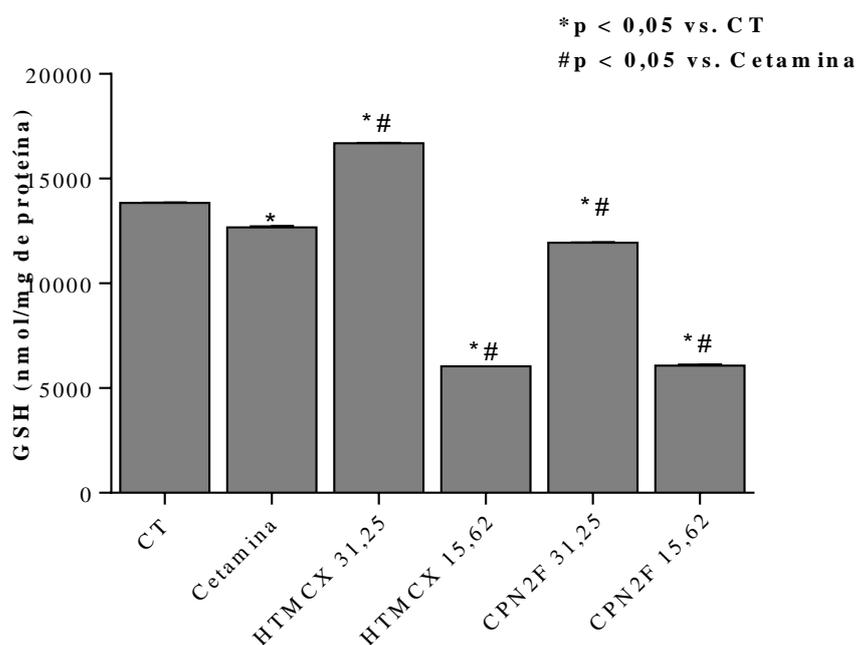
Legenda: Os dados foram expressos em média ± EPM, * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. Cetamina. Para análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni. CT=controle negativo; HTMCX= 2-hidroxi-3,4,6 - trimetoxiacetofenona; CPN2F= chalcona semissintética.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.9 Determinação dos níveis de GSH

A fim de avaliar possíveis danos causados pelo mecanismo de estresse oxidativo em células tubulares renais, foi mensurado o GSH. O gráfico abaixo (Figura 27), ilustra o estresse oxidativo causado pelo tratamento com a Cetamina, que reduziu os valores de GSH em aproximadamente 10,0 % em relação ao controle negativo (CT). Quando observada a concentração de GSH, após o tratamento com o HTMCX 31,25 μ M, o gráfico indica aumento de 24,07 %, quando comparado ao grupo cetamina, o que indica proteção dessa substância. Os grupos restantes não apresentaram proteção em relação ao grupo cetamina, o que sugere a necessidade da investigação de outros mecanismos de proteção, além da defesa antioxidante direta e inespecífica mediada pela glutathiona.

Figura 27: Avaliação do estresse oxidativo por meio da medida dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em células HK-2.



Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM. CT= Controle negativo. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. CT; #p<0,05 vs. Cetamina.

Fonte: Dados da pesquisa

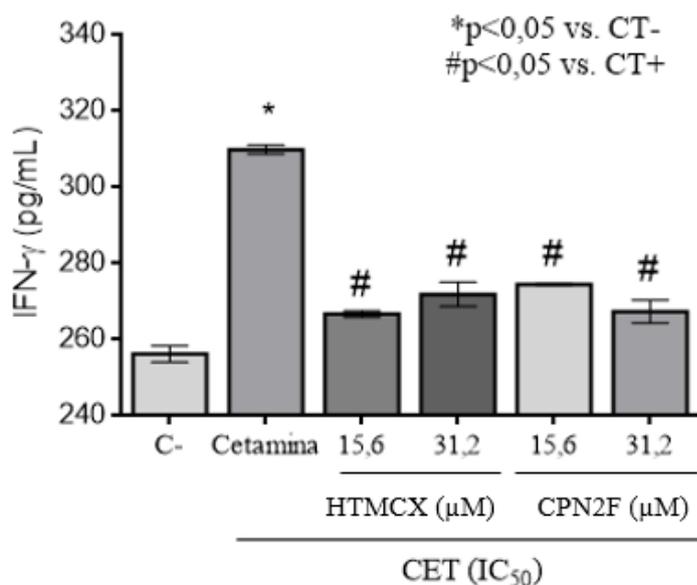
5.10 Quantificação de biomarcadores inflamatórios no sobrenadante de células HK-2 tratadas com cetamina.

A fim de determinar o envolvimento de um processo inflamatório no tratamento das células com a Cetamina e a capacidade anti-inflamatória da HTMCX e da chalcona semissintética CPN2F, foi realizado o ensaio imunoenzimático para quantificação de IFN- γ e IL-6.

Demonstrou-se que o tratamento com a Cetamina (IC_{50}) foi capaz de aumentar os níveis da citocina pró-inflamatória IFN- γ em 17,33 % quando comparado ao grupo controle negativo (C-) (Figura 28 e Tabela 11).

Dando continuidade ao experimento, as células foram tratadas com duas concentrações de HTMCX (31,2 e 15,6 μ M) e de CPN2F (31,2 e 15,6 μ M). Conforme observado (31,2 e 15,6 μ M). Conforme observado, o tratamento com as chalconas foi capaz de reduzir significativamente a liberação de interferon-gamma pelas células tubulares renais em todos os grupos.

Figura 28: Níveis de interferon-gamma (IFN- γ) no sobrenadante de células HK-2



Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM, * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. Cetamina. Para análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

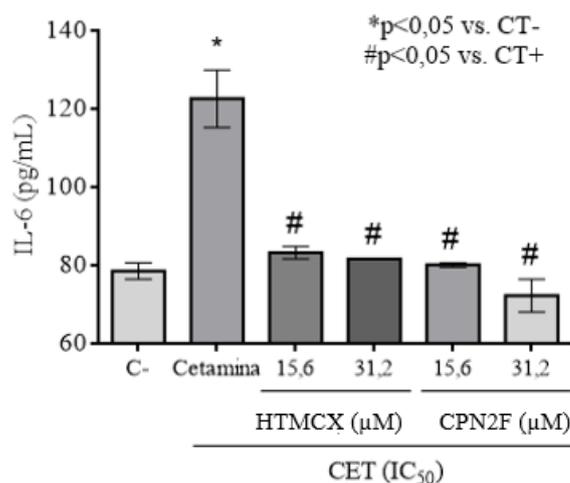
Tabela 11: Níveis de IFN- γ (pg/mL) no sobrenadante de células HK-2

Grupos	IFN- γ (pg/mL)
Controle	256,0 \pm 2,095
Cetamina (IC ₅₀)	309,7 \pm 1,143*
HTMCX 15,62 μ M	266,6 \pm 0,857#
HTMCX 31,25 μ M	271,7 \pm 3,143#
CPN2F 15,62 μ M	274,3 \pm 0,190#
CPN2F 31,25 μ M	267,1 \pm 2,952#

Legenda: Os dados foram expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni *p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. Cetamina.

Fonte: Dados da pesquisa

Para confirmação de atividade anti-inflamatória das chalconas estudadas, a IL-6 foi dosada e o experimento demonstrou que o tratamento com a Cetamina (IC₅₀) foi capaz de aumentar 35,96 % a concentração de IL-6, quando comparado ao grupo controle negativo (C-) (Figura 29 e Tabela 12). Além disso, o tratamento com as chalconas HTMCX e CPN2F, nas concentrações de 31,2 e 15,6 μ M, reduziu significativamente as concentrações de IL-6 nas células HK-2.

Figura 29: Níveis de interleucina-6 (IL-6) no sobrenadante de células HK-2

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM, *p<0,05 vs. CT; #p<0,05 vs. Cetamina. Para análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 12: Níveis de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante de células HK-2

Grupos	IL-6 (pg/mL)
Controle	78,51 \pm 2,100
Cetamina (IC ₅₀)	122,6 \pm 7,349*
HTMCX 15,62 μ M	83,24 \pm 1,575#
HTMCX 31,25 μ M	81,66 \pm 0,000#
CPN2F 15,62 μ M	80,09 \pm 0,524#
CPN2F 31,25 μ M	72,21 \pm 4,199#

Legenda: Os dados foram expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. Cetamina.

Fonte: Dados da pesquisa

5.11 Estudo *in silico*

5.11.1 Docking molecular

Nas simulações *in silico* de previsão teórica por *docking* molecular, foram comparadas as interações entre as moléculas das substâncias estudadas (cetamina, HTMCX e CPN2F) e moléculas inibidoras das proteínas JNK e MAPK (46A e CJA). A chalcona semissintética CPN2F exibiu energia de interação mais forte (-7,5 kcal/mol) que a cetamina (-6,3 kcal/mol). O mesmo ocorreu na simulação com a MAPK, onde a CPN2F mostrou maior energia de interação (-7,5 kcal/mol) que a cetamina (-7,0 kcal/mol), o que demonstra, então, melhor afinidade de CPN2F, quando comparado a cetamina e ao HTMCX (- 5,4 kcal/mol e - 6,0 kcal/mol). É importante salientar, que HTMCX apresentou RMSD (11,330 Å), o que demonstra que não há afinidade entre a molécula e JNK. Os dados referentes a energia de interação e ao RMSD (*Root Mean Square Deviation*) estão descritos na tabela 13.

Tabela 13: Energia de interação e RMDS das chalconas, cetamina e inibidores dos ligantes - alvo em ensaio de *docking* molecular.

Alvos	Ligantes	Energia livre (ΔG kcal/mol)	RMSD (Å)
JNK	Redocking (46A)	-8,8	0,072
	Cetamina	-6,3	2,160
	HTMCX	-5,4	11,330
	CPN2F	-7,5	1,351
MAPK	Redocking (CJA)	-7,5	2,347
	Cetamina	-7,0	2,195
	HTMCX	-6,0	1,248
	CPN2F	-7,5	2,661

Legenda: JNK - *N-terminal kinase Jun*; MAPK - *map kinase*; HTMCX - 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona; CPN2F - (E)-3-(2-fluorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-

trimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one. Os escores de docking utilizados foram $\Delta G^\circ \leq 6,0$ kcal/mol e RMSD $< 2,0$ Å.

Fonte: Dados da pesquisa.

Ainda se tratando do processo de simulações de *docking* molecular foram observadas as interações entre as moléculas e suas respectivas distâncias (Tabela 14), onde se destacam, na tabela 14, a similaridade no local de interação do inibidor de JNK e cetamina (VAL 40), bem como a ocorrência de ligação de hidrogênio entre CPN2F e JNK no aminoácido SER 155 com distância de 3,26. A figura 30 mostra as imagens 3D e 2D dessas interações.

Tabela 14: Interações teóricas entre HTMCX, CPN2F, cetamina e o inibidor 46A com JNK

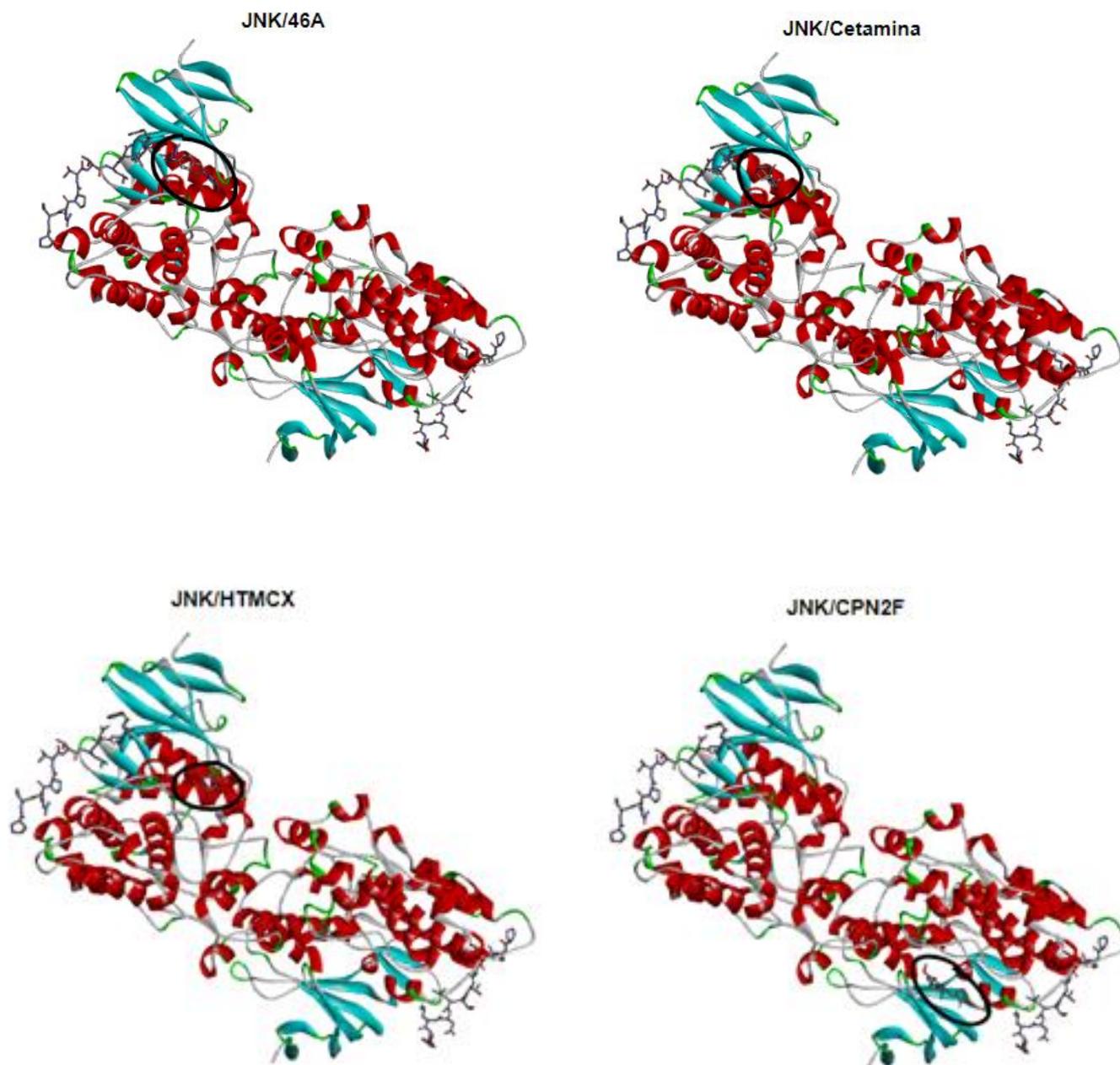
REDOCKING (46A) + JNK			CETAMINA + JNK		
RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)	RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)
VAL 40	Alquil	4,96	VAL 40	π -alquil	4,76
	π -alquil	4,73	LEU 168	π -sigma	3,56
VAL 158	π -Sigma	3,51	ASN 114	Carbono hidrogênio	3,72
LEU 168	π -alquil	5,34			
LYS 55	Alquil	5,49			
ILE 32	π -alquil	5,26			
ALA 36	Alquil	3,92			
HTMCX + JNK			CPN2F + JNK		
RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)	RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)
VAL 186	Alquil	4,95	VAL 158	π -sigma	3,52
LEU 172	Alquil	3,9	LEU 168	π -alquil	5,18
HIS 66	Carbono hidrogênio	3,13	SER 155	Ligação de hidrogênio	3,26
	π - π T sheped	5,92		Carbono hidrogênio	3,27
ARG 69	Carbono hidrogênio	3,21	ASP 151	Carbono hidrogênio	3,51

	Carbono	3,32	GLN 37	Carbono	3,76
	hidrogênio			hidrogênio	
	π -alquil	4,08	PRO 60	Alquil	4,22
ALA 70	Carbono	3,51			
	hidrogênio				
	Alquil	3,55			
LEU 57	Alquil	4,31			
	Alquil	4,07			
GLN 37	Carbono	3,78			
	hidrogênio				
ARG 59	Carbono	3,57			
	hidrogênio				
PRO 60	Alquil	4,22			

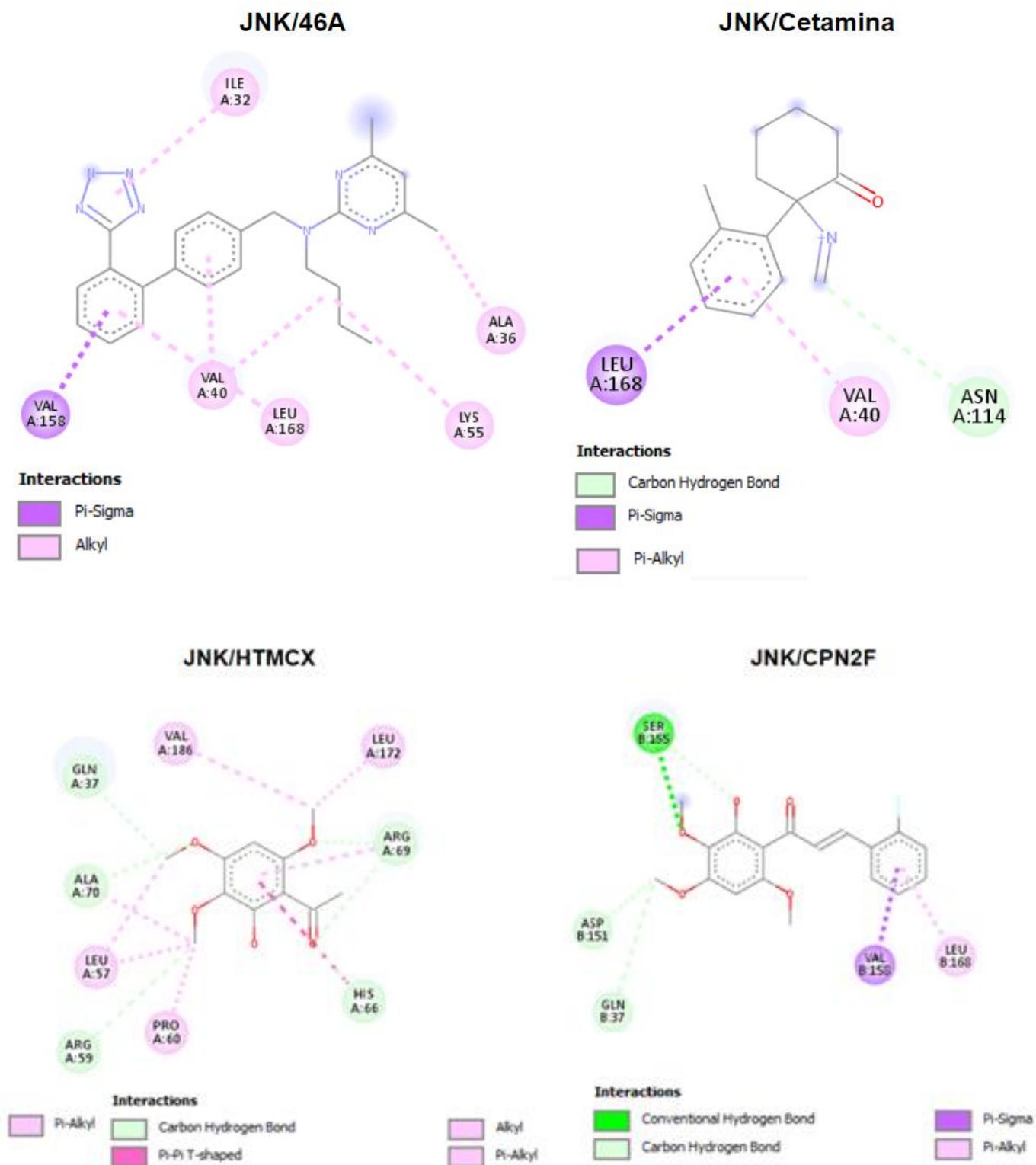
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 31: Interações entre HTMCX, CPN2F, cetamina e o inibidor 46A com JNK.

(A)



(B)



Legenda: (A) Estruturas tridimensionais das interações; (B) Mapas em 2D das interações

Fonte: Dados da pesquisa

As interações com MAPK e suas respectivas distâncias também foram evidenciadas nas simulações de *docking* molecular (Tabela 15), onde se destacam as ligações em TYR 435 e MET 452 ocorrendo de maneira similar entre todas as moléculas estudadas. A Tabela 15 mostra a ligação entre o resíduo MET 452 da proteína MAPK e o átomo de flúor presente na estrutura da chalcona semissintética CPN2F, com distância de 3,1 Å, caracterizando uma interação forte entre as moléculas. Além disso, a figura 31 mostra em 3D e 2D, os locais de ligação entre MAPK e as moléculas, onde em CJA, Cetamina e PN foram observadas similaridades de localização e distâncias.

Tabela 15: Interações teóricas entre HTMCX, CPN2F e cetamina e o inibidor CJA com MAPK

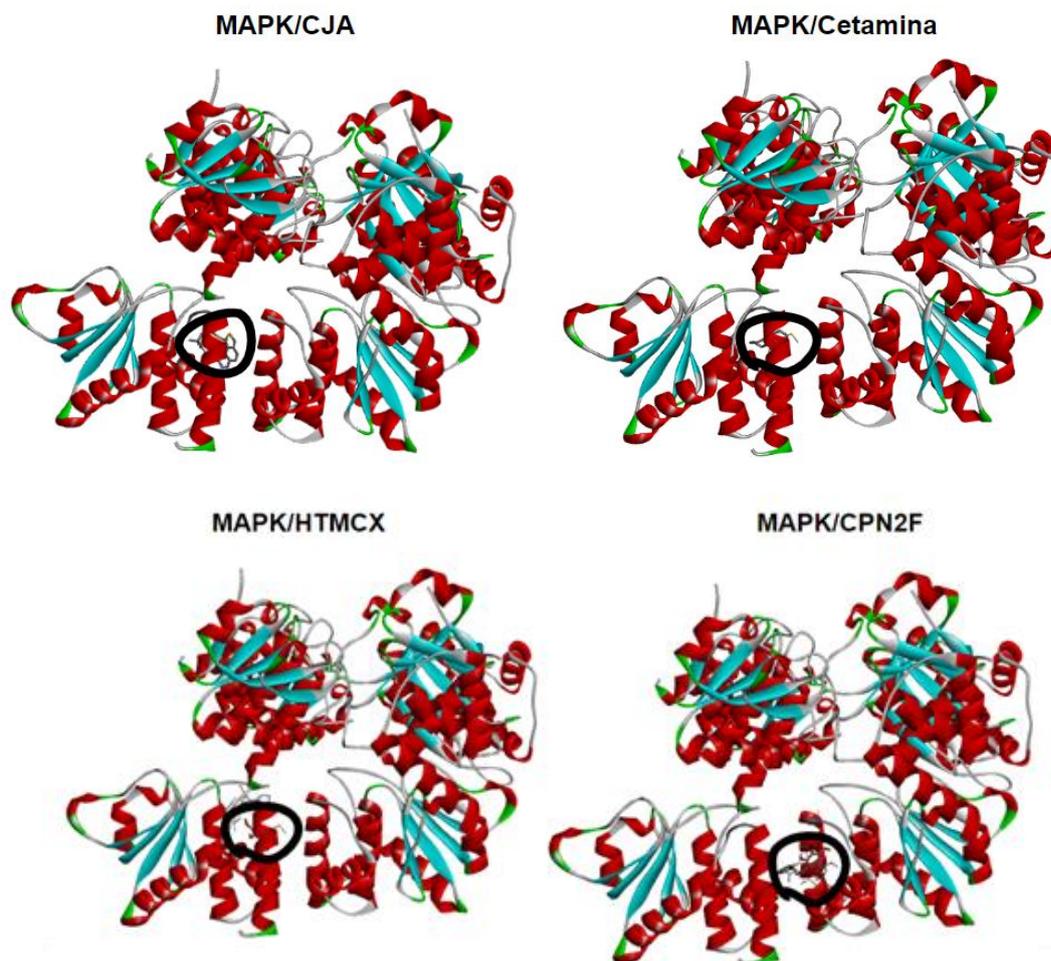
REDOCKING (CJA) + MAPK			CETAMINA + MAPK		
RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)	RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)
TYR 435					
	π - π stacked	3,99	MET 452	π -enxofre	3,95
LEU 456	π -alquil	5,15	TYR 435	π - π stacked	4,04
MET 452	π -alquil	4,72			
MET 431	π -enxofre	5,34			
HTMCX + MAPK			CPN2F + MAPK		
RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)	RESÍDUOS	INTERAÇÕES	DISTÂNCIA (Å)
TYR 435	π - π stacked	4,83	LEU 456	π -alquil	4,82
SER 413	Carbono hidrogênio	3,68	MET 431	π -sigma	3,83
ILE 445	Alquil	5,05		Alquil	4,08
	Carbono hidrogênio	3,4	LEU 455	Alquil	4,6
PRO 447	Alquil	4,19	ILE 420	Alquil	4,13
	Carbono hidrogênio	3,3	TYR 435	π --alquil	5,35

MET 452	Carbono	3,41	π - π stacked	3,82
	hidrogênio			
	π -alquil			
SER 446	Alquil	4,65	Carbono	3,6
	hidrogênio			
	Carbono			
MET 452	Halogênio (flúor)	3,44	Halogênio (flúor)	3,1
	hidrogênio			
	Carbono			
PRO 447	Alquil	4,37	Alquil	4,37
	hidrogênio			
	Carbono			

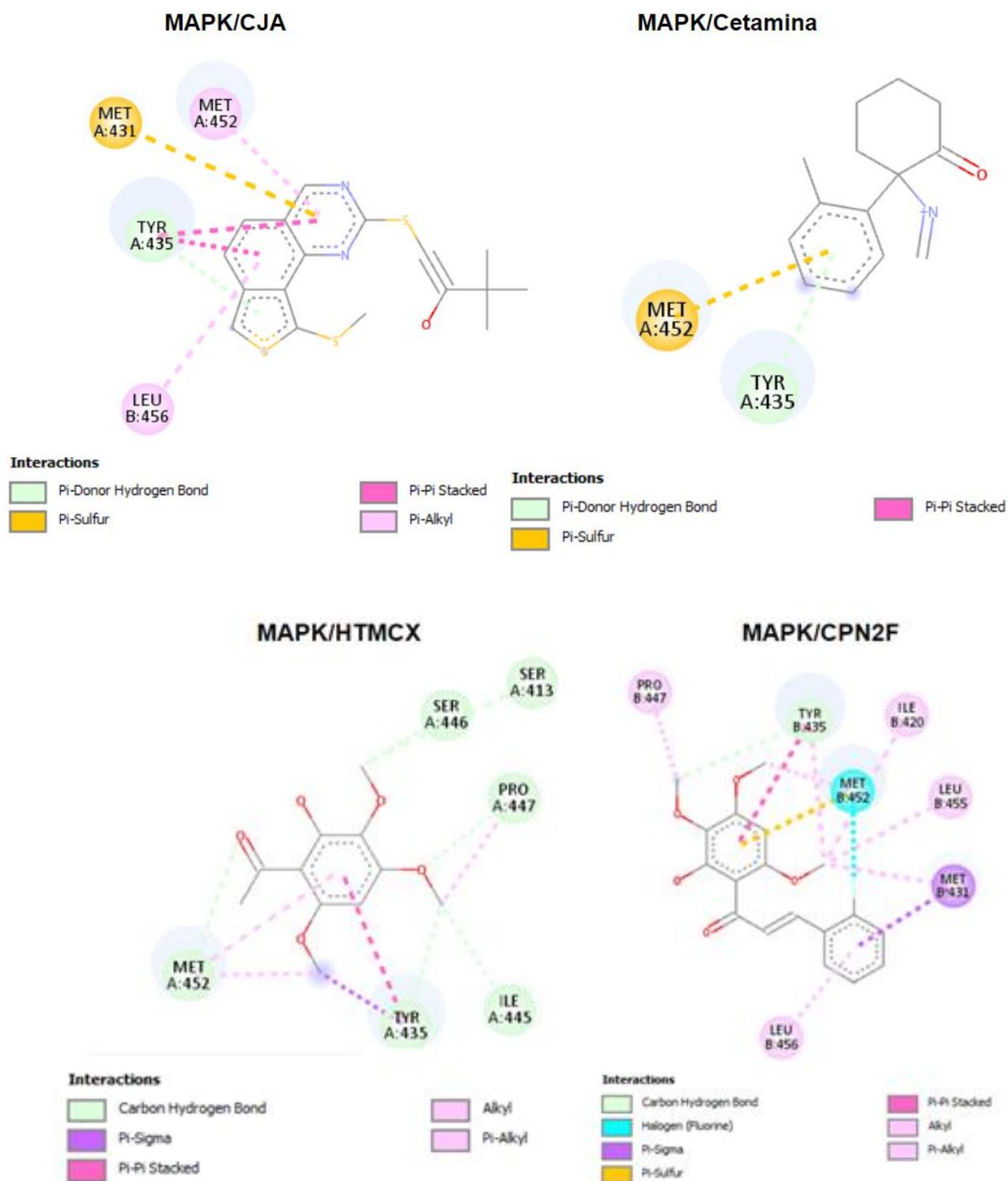
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 32: Interações entre HTMCX, CPN2F, cetamina e o inibidor CJA com MAPK.

(A)



(B)



Legenda: (A) Estruturas tridimensionais das interações; (B) Mapas em 2D das interações

Fonte: Dados da pesquisa

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o tratamento com HTMCX e CPN2F melhorou a viabilidade celular após a indução do dano induzido pela cetamina, refletindo na redução da apoptose e na liberação de KIM-1 pelas células. Esses achados foram associados a atenuação das alterações morfológicas, principalmente na formação de corpos apoptóticos e a fragmentação do citoplasma, estando relacionados a um efeito antioxidante e protetor das mitocôndrias. O tratamento com chalconas reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células. Podemos destacar que esses efeitos parecem estar relacionados à ligação das chalconas às proteínas da via JNK/p38 MAPK. Na maioria dos ensaios, a chalcona semissintética CPN2F apresentou melhores efeitos do que a HTMCX.

A lesão renal induzida por fármacos é responsável por até 25% dos casos de LRA, sendo essa nefrotoxicidade causada por uma combinação de fatores que envolvem características do paciente e da própria molécula do fármaco (PERAZELLA, 2018). A instalação de hipóxia tecidual e o dano pela formação de espécies reativas de oxigênio nos túbulos renais são os principais fatores responsáveis pela morte celular e inflamação na LRA induzida por fármacos (PETEJOVA *et al.* 2020).

A cetamina é utilizada em procedimentos veterinários, medicina de campo e desempenha um papel importante em cirurgias pediátricas e procedimentos de emergência (GAO *et al.* 2016, ORHURHU *et al.* 2022). Apesar disso, a literatura relatada toxicidade cardiovascular, neuronal, urogenital, renal e outras. A toxicidade renal da cetamina é relatada como decisiva para a saúde do paciente, pois seu mecanismo de dano nos rins ainda não está totalmente elucidado e inclui a expressão de genes ligados ao processo apoptótico, ativação do sistema inflamatório e causas idiossincráticas (GOLDEN *et al.* 2016, LOPES *et al.* 2016).

As chalconas são os precursores dos flavonoides e possuem uma ampla gama de efeitos biofarmacológicos, incluindo efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Estudos como o de Fang *et al.* 2015 demonstraram que chalconas semissintéticas, análogas aos curcuminoides, foram capazes de inativar vias de apoptose importantes para o processo inflamatório em doenças crônicas. Além disso, as chalconas mostraram atividade nefroprotetora na apoptose induzida por fármacos em células tubulares renais humanas (THONGNUANJAN *et al.* 2021). Ademais, chalconas semissintéticas foram capazes de reduzir os danos renais por meio da inibição de fatores pró-inflamatórios, além de serem

responsáveis por reduzir os danos oxidativos renais causados pelo diabetes e pela hiperlipidemia (CHEN *et al.* 2018)

Dessa forma, devido à relevância dessa condição patológica e à importância do uso da cetamina em procedimentos clínicos, se torna necessária a descoberta de moléculas capazes de proteger a estrutura do tecido renal deste tipo de lesão. Assim, decidiu-se por investigar o mecanismo de citoproteção mediado pela chalcona HTMCX e suas derivadas semissintéticas em um modelo *in vitro* de LRA induzida por cetamina.

A metodologia experimental utilizada neste estudo foi baseada em um modelo bem descrito e estabelecido, que utilizou anestésicos, como cetamina e xilazina, em células cardíacas, hepáticas e renais (KOVACOVA *et al.* 2016). No presente estudo, foi analisada a capacidade de recuperação de células tubulares renais humanas após a lesão *in vitro* induzida por cetamina e posterior tratamento com a chalcona HTMCX e suas derivadas semissintéticas. Sendo, então, evidenciada a avaliação isolada das células renais sem a possível interferência de mecanismos e processos biológicos que pudessem compensar de alguma forma os danos causados pelo uso do fármaco.

Quando realizado o ensaio do MTT, as células tratadas com a chalcona denominada de HTMCX, a própria molécula de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona, e suas derivadas semissintéticas (CPNB, CPNC, CPN4Cl, CPN4F, CPNDICl, CPN2F e CPN3NO₂) apresentaram graus de viabilidade variáveis, sendo as moléculas CPNB, CPNC, CPN4Cl, CPN4F citotóxicas em todas as concentrações utilizadas. O que se apresentou diferente em relação ao HTMCX, que demonstrou promover redução de viabilidade celular apenas nas três maiores concentrações, sendo, então, as outras mantidas em estudo. Por fim, as moléculas semissintéticas CPNDICl, CPN3NO₂ e CPN2F tiveram ausência de toxicidade nas duas menores concentrações estudadas. Assim, as substâncias semissintéticas, que apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade significativa e o produto natural foram escolhidos para os experimentos que se seguiram. A reduzida citotoxicidade renal do produto natural e de algumas de suas moléculas derivadas foi descrita por Magalhães *et al.* 2022. Ademais, outros autores também demonstraram a baixa toxicidade dessas substâncias em variadas linhagens celulares, bem como em estudos *in vivo*, sendo isso, portanto, determinante para o estudo de suas atividades biológicas (SILVA *et al.* 2020; DA SILVA *et al.* 2021).

O ensaio de MTT também foi realizado para avaliar a citotoxicidade da cetamina em células renais e demonstrou que o fármaco apresentou toxicidade expressiva nas maiores concentrações testadas no estudo. Situação semelhante foi observada por

Kovacova *et al.* 2016, que demonstraram redução da viabilidade celular em células renais de gamo tratadas com cetamina em altas concentrações. Assim, definiu-se a IC₅₀ desse fármaco, que foi utilizada para o experimento de citoproteção, onde a cetamina foi capaz de inviabilizar 50% das células HK-2 utilizadas. As células tratadas com o produto natural e as chalconas semissintéticas, previamente selecionadas, apresentaram recuperação parcial da viabilidade, demonstrando que essas substâncias exerceram efeito protetor sobre a linhagem celular HK-2.

Após a realização dos ensaios de citoproteção, decidiu-se por analisar o dano específico em células renais tubulares através da mensuração de KIM-1, uma glicoproteína multifuncional (90 kDa) que é conhecida por apresentar clivagem em sua região extracelular, durante o processo de lesão renal, levando à detecção desse domínio na urina e sangue de pacientes de maneira precoce e sensível, visto que, quando há morte celular renal o KIM-1 solúvel também pode ser detectado no plasma. Dessa forma, aumento nas concentrações de KIM-1 urinário e plasmático podem refletir na lesão tubular renal (SABBISSETTI *et al.* 2014; KARMAKOVA *et al.* 2021)

O presente trabalho, analisou a concentração de KIM-1 no sobrenadante de células HK-2 submetidas ao contato com a cetamina, de acordo com o modelo citado anteriormente, e tratadas com as chalconas. Sendo observado o aumento significativo dos níveis de KIM-1 nas células tratadas apenas com a cetamina. Esse resultado corrobora com o que foi visto por Li *et al.* 2015, onde o tratamento com a cetamina foi capaz de aumentar significativamente os níveis de KIM-1, ocasionando danos irreversíveis em animais. No presente estudo, a concentração de KIM-1, nas células tubulares, apresentou redução significativa após o tratamento com as chalconas HTMCX, CPN2F, CPNDIC1 e CPN3NO2. Resultados semelhantes foram vistos por outros estudos, que analisaram a capacidade de citoproteção das chalconas naturais e sintéticas em células renais tratadas com moléculas nefrotóxicas (TANG *et al.* 2021; LEE *et al.* 2015).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a capacidade da cetamina em provocar alterações morfológicas em tecido renal, bem como em células e mitocôndrias do sistema nervoso, onde as estruturas observadas por microscopia eletrônica de varredura apresentaram retração de volume, aparecimento de corpos apoptóticos e degeneração nuclear (ZOU *et al.* 2009; WAI *et al.* 2012; EUSTAQUIO *et al.* 2018). No presente trabalho, foi realizada a avaliação das estruturas morfológicas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a fim de se analisar as alterações ultraestruturais provocadas pela cetamina e o efeito do tratamento com as chalconas. Assim, pôde-se

notar que o uso da cetamina nas células foi capaz de provocar alterações ligadas ao processo apoptótico, enquanto o tratamento com as chalconas foi capaz de promover melhora parcial nas estruturas celulares submetidas a esse processo. Se observou, ainda, que os tratamentos, com a HTMCX e, principalmente, com a chalcona semissintética, denominada CPN2F, foram os melhores para a reversão parcial da apoptose causada pela cetamina.

Observando os resultados obtidos previamente, decidiu-se por utilizar a HTMCX e CPN2F para os estudos de avaliação das alterações celulares características de apoptose e/ou necrose. Para isso, foram utilizados ensaios de citometria de fluxo, que se apresentam como tecnologias de análise multiparamétrica rápida de células únicas em solução e que garantem fácil execução e reprodutibilidade (GIVAN, 2011). A detecção da apoptose foi realizada através da utilização da Anexina V, que, quando combinada com Iodeto de Propídio (IP), permite uma distinção entre células necróticas (Anexina V+/IP+) e células apoptóticas precoces (Anexina V+/IP-). Essa molécula é uma proteína de ligação de fosfolipídios que se liga à fosfatidilserina e se desloca para a região externa da membrana celular, indicando o processo apoptótico (McKINNON, 2018).

No presente estudo, a população de células renais submetidas a lesão pelo uso da cetamina apresentou um aumento significativo dos eventos de morte celular por apoptose, quando comparados ao controle negativo. Esses achados corroboram com estudos anteriores realizados *in vitro* e *in vivo*, que demonstraram a capacidade pronunciada da cetamina em provocar apoptose celular (LI *et al.* 2015; BUSTAMANTE *et al.* 2019). Ademais, nesse trabalho, se observou que as chalconas HTMCX e CPN2F foram capazes de reduzir significativamente o percentual de morte celular por apoptose causada pela cetamina. Resultados semelhantes foram demonstrados por Lee *et al.* (2015), que estudaram chalconas semissintéticas capazes de reduzir o processo apoptótico em células renais submetidas à citotoxicidade induzida por fármaco. Somado a isso, outros autores observaram a capacidade de substâncias contendo chalconas e flavonoides, que tem as chalconas como precursoras, em reduzir a apoptose em diversas linhagens celulares, reforçando, assim, o efeito antiapoptóticos das chalconas em processo de lesão (JONES & SHOSKES, 2000; KHULMANN, 1998; LIAO *et al.* 2020; ADELUSI *et al.* 2021).

O estresse oxidativo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da utilização de DCFH-DA e Rodamina 123, que são, respectivamente, marcadores de estresse oxidativo citoplasmático e mitocondrial. O tratamento com HTMCX e CPN2F gerou redução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio induzido pelo uso da

cetamina, bem como, no caso da chalcona semissintética, foi capaz de aumentar o acúmulo mitocondrial de Rodamina 123, levando a melhora do potencial transmembrânico mitocondrial na população celular estudada. Dessa forma, os achados indicam o envolvimento da respiração celular e equilíbrio óxido redutor nos mecanismos de morte e reparo celular, demonstrando, ainda, formas de atuação das substâncias em estudo. Esses resultados corroboram com trabalhos anteriores, que observaram o potente efeito antioxidante da classe das chalconas, bem como de suas derivadas sintéticas, em diversos modelos de estudos (QIAN *et al.* 2011; SIVAKUMAR & PRABHAKAR, 2011; ALY, FODAH & SALEH, 2014; CAO *et al.* 2020).

Ainda para confirmação do envolvimento do mecanismo de estresse oxidativo instalado pelo uso da cetamina e abrandado pelo tratamento com as chalconas, foram avaliados o acúmulo do radical superóxido e os níveis de GSH em células renais HK-2 submetidas ao modelo previamente descrito. No presente estudo, foi demonstrada a capacidade da cetamina em promover aumento do acúmulo de superóxido mostrando, então, o aumento na produção de ERO causada pelo fármaco. Já o tratamento com as chalconas HTMCX e CPN2F foi capaz de reduzir significativamente esse acúmulo, sugerindo, assim, um efeito antioxidante em células renais HK-2.

A glutatona (GSH) também foi avaliada, conforme descrito anteriormente, pois é um tripeptídeo importante, que atua como um antioxidante endógeno não enzimático e está envolvida na regulação metabólica, apesar de ter seus estoques esgotados rapidamente durante o processo de desintoxicação de ERO (URSINI & MAIORINO, 2020; ROSA *et al.* 2021). Nesse trabalho, foi observada a redução significativa dos níveis de GSH nas células renais tratadas com a cetamina. Além disso, o tratamento com o HTMCX promoveu o aumento do GSH, o que corrobora com os resultados achados anteriormente no presente estudo ligados à atividade antioxidante das chalconas.

A dosagem de biomarcadores inflamatórios é parte importante de estudos que avaliam o potencial pró e anti-inflamatório de diversas substâncias. No tecido renal, as citocinas produzidas são capazes de induzir a proliferação local de células tubulares e intersticiais, bem como sintetizar matriz extracelular e gerar a formação de ERO. Citocinas inflamatórias produzidas em células tubulares, principalmente, em situações de estresse oxidativo causado por nefrotoxicidade são responsáveis pela instalação de lesões renais (VIANNA *et al.* 2011; XU *et al.* 2015). Dessa forma, decidiu-se por investigar a produção de mediadores pró-inflamatórios, como IFN- γ e IL-6 em células expostas a cetamina e tratadas com chalconas.

O interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina pró-inflamatória moduladora das respostas imunes centrais e periféricas, e está, intimamente, ligado à resposta inflamatória, sendo produzida por células T e natural killer (NK). Essa citocina coordena uma série de mecanismos celulares através da regulação da transcrição de genes imunologicamente relevantes e é utilizada como biomarcador da lesão renal em modelos *in vitro* e *in vivo* (SCHRODER *et al.* 2004; SONEKATSU *et al.* 2016; LU & CROWLEY, 2018; PEDROSO *et al.* 2020).

No presente trabalho, foi observado que os níveis de IFN- γ , em células HK-2 tratadas com cetamina, se apresentaram aumentados significativamente, o que demonstra a capacidade inflamatória da cetamina nessa linhagem celular. Já o tratamento com as chalconas HTMCX e CPN2F foi capaz de reduzir a concentração desse mediador inflamatório. Esses resultados corroboram com o que foi visto por autores, como Ahmad *et al.* 2006, que observou a capacidade de hidroxichalconas em inibir a produção de IFN- γ em linhagem celular envolvida no processo inflamatório. Além disso, outros estudos demonstraram que as 2-hidroxichalconas apresentam mecanismo de ação ligado à cascata da inflamação (KONTOGIORGIS, MANTZANIDOU & LITINA, 2008).

Conforme dito anteriormente, é inegável a importância da dosagem de biomarcadores inflamatórios e, sendo assim, decidiu-se por avaliar os níveis de Interleucina-6 (IL-6) no modelo estudado. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e exerce sua ação através dos transdutores de sinal, que levam à ativação das cascatas JAK/STAT (Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (HEINRICH *et al.* 2003; JOHN, 2018). Ademais, são relatadas na literatura evidências de que a LRA é um processo inflamatório mediado por uma série de citocinas, dentre as quais a IL-6, que em alta concentração circulante no organismo pode levar a disfunção orgânica nos rins (RATLIFF *et al.* 2013; GREENBERG *et al.* 2015).

No presente trabalho, os níveis de IL-6 se apresentaram elevados significativamente nas células renais tubulares tratadas com cetamina confirmando, então, o estímulo inflamatório gerado pelo fármaco. O tratamento com HTMCX e CPN2F diminuiu a concentração de IL-6 nas células, demonstrando efeito anti-inflamatório dessas moléculas. Esses resultados corroboram com o que foi visto em outros estudos, onde a administração de cetamina foi capaz de aumentar os níveis de IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias (FAN *et al.* 2015; LI *et al.* 2017). A capacidade dessa classe

de moléculas em atenuar a liberação de IL-6 foi descrita anteriormente na literatura (NOWAKOWSKA, 2007; KIM *et al.* 2008; PINHO-RIBEIRO *et al.* 2015).

No processo de instalação da LRA, ocorre a associação de estresse oxidativo, inflamação e apoptose de células renais, evidenciando o papel essencial desses processos para a instalação da lesão. Conforme observado por estudos anteriores, a via apoptótica induzida pelo estresse do retículo endoplasmático está envolvida com o estímulo da lesão renal aguda induzida por fármacos nefrotóxicos, onde o estresse causado pelo uso desses fármacos estimula o complexo JNK e a cascata de sinalização MAPK (LEE *et al.* 2015; DING *et al.* 2019; MENG *et al.* 2022).

JNK é uma das três vias de MAPK, que controla processos como proliferação celular, diferenciação, migração, inflamação e apoptose, podendo ser ativada como resposta a estímulos que ocorrem nas lesões renais aguda e crônica, tais como produção de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo. No mecanismo dessa via, JNK após ativada pode fosforilar resíduos de serina e treonina de diversos substratos (BODE & DONG, 2007; WAGNER & NEBREDÁ, 2009; GRYNBERG, MA & NIKOLIC-PATERSON, 2017). O presente trabalho evidenciou, através de simulações de *docking* molecular, a interação entre a JNK e as moléculas de cetamina, HTMCX e CPN2F e foi observada a existência de ligação de hidrogênio de força moderada entre resíduo de serina (SER 155) da JNK e a molécula de chalcona semissintética, o que denota um possível sítio de ação da substância nessa molécula. Além disso, através da análise da energia de interação e RMDS dessas estruturas, se pôde notar, que a afinidade existente entre JNK e CPN2F era significativamente importante.

A fim de complementar a avaliação, optou-se por analisar a interação entre a via apoptótica anteriormente citada e as substâncias estudadas, assim, foi realizado o *docking* molecular, com MAPKs, que são proteínas funcionalmente conectadas à regulação de mecanismos celulares envolvidos diretamente com a doença renal (CUARENTAL *et al.* 2019). Estudos anteriores mostraram que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, promovem a ativação das MAPKs, levando ao aumento das reações inflamatórias e apoptose celular em células tubulares renais (ZHANG *et al.* 2018; MENG *et al.* 2022).

No presente estudo, foi observada a afinidade entre MAPK e a chalcona CPN2F, medida através da energia de interação e RMSD, o que mostra a possível capacidade de ligação entre as moléculas. No *docking* molecular, se pôde evidenciar, ainda, a ligação, caracterizada como forte, do flúor da CPN2F com o resíduo de metionina (MET 452) da

MAPK, demonstrando possível sítio de ligação da chalcona semissintética na estrutura da proteína, visto que as ligações de halogênios apresentam analogia à ligação de hidrogênio, sendo interações direcionais entre um átomo de halogênio e elétrons livres de outra estrutura, que promovem maior estabilidade aos ciclos aromáticos (VALADARES, 2009). Anteriormente, Chen *et al.* 2018, mostraram que chalconas semissintéticas foram capazes de inibir a produção de citocinas inflamatórias através da inibição da via de sinalização MAPK em tecidos renais e cardíacos, sendo esse achado complacente com o estudo aqui realizado.

É importante ressaltar que a chalcona semissintética CPN2F apresentou melhores resultados, em todas as análises, que a HTMCX extraída diretamente do marmeleiro-cravo. É possível se observar a tendência da indústria farmacêutica em realizar alterações de uma variedade de grupos funcionais em candidatos a novos fármacos, substituindo ou adicionando átomos variados, que agreguem positivamente o mecanismo de ação, a farmacocinética, bem como promovam a redução de efeitos adversos dessas substâncias (LAURENCE *et al.* 2009; PITALUGA, 2015). Estudos anteriores demonstram um aumento do desenvolvimento de novos fármacos que contém um ou mais átomos de flúor em sua estrutura química. Além disso, estima-se que 20 a 25% dos medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica já possuem pelo menos um átomo desse halogênio em sua constituição. Esse interesse extenso se deve, principalmente, ao fato de que o átomo de flúor promove mudanças significativas nas características estruturais e de reatividade dos compostos (BORKIN *et al.* 2012; PITTALUGA, 2015).

Dessa forma, nossos resultados contribuem para o entendimento da lesão renal causada por fármacos utilizados na prática clínica. E destacam as chalconas naturais e semissintéticas, como fontes importantes de abordagem de estratégias e ferramentas farmacológicas na pesquisa, inovação e desenvolvimento de novas terapias.

7 CONCLUSÃO

O tratamento com chalconas naturais (HTMCX) e semissintéticas protegem as células epiteliais tubulares renais humanas (HK-2) contra danos oxidativos causados pela citotoxicidade renal induzida pela cetamina. A chalcona semissintética CPN2F apresentou melhores efeitos em todo o estudo. Efeitos possivelmente associados à inibição do processo apoptótico, com envolvimento de espécies reativas de oxigênio, alteração do potencial mitocondrial, do processo inflamatório e da liberação de KIM-1 em células tubulares renais. Os ensaios de docking molecular sugerem, ainda, que as vias de sinalização MAPK e JNK podem ser alvo das chalconas estudadas, assim como da cetamina.

8. REFERÊNCIAS

- ADELUSI, T. I.; AKINBOLAJI, G.R.; YIN, X. et al. Neurotrophic, anti-neuroinflammatory, and redox balance mechanisms of chalcones. **Eur Journ Pharm.** Vol 891: 173695, 2021.
- ALKADI, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. **Infect Disord Drug Targets.** Vol 20(1): 16-26, 2020.
- ALY, M.R.; FODAH, H.H.; SALEH, S.Y. Antiobesity, antioxidant and cytotoxicity activities of newly synthesized chalcone derivatives and their metal complexes. **Eur Jour Med Chem.** Vol 76: 517-530, 2014.
- AHMAD, S.; ISRAF, D.; SHAARI, N.; MOHAMED, H.; et al. Cardamonin, inhibits pro-inflammatory mediators in activated RAW 264.7 cells and whole blood. **Eur. J Pharmacol.** Vol 538 (1-3): 188-194, 2006.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, P.J. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quim. Nova.** Vol 29(1), 2006.
- BODE, A. M.; DOND, Z. The functional contrariety of JNK. **Mol Carcinog.** Vol. 46, 591–598, 2007.
- BORKIN, D.; PUSCAU, M.; CARLSON, A.; SOLAN, A. et al. Synthesis of diversely 1,3,5-trisubstituted pyrazoles via 5-exo-dig cyclization. **Org Biomol Chem.** Vol 10 (23): 4505-8, 2012.
- BUSTAMANTE, J.; ACOSTA, L.; KARADYAIN, A.G.; LORES-ARNAIZ, S.; Ketamine induced cell death can be mediated by voltage dependent calcium channels in PC12 cells. **Exp Mol Pathol.** Vol 111: 104318, 2019.
- BROOKS, C. R.; YEUNG, M. Y.; BROOKS, Y. S.; CHEN, H.; ICHIMURA, T.; HENDERSON, J. M.; BONVENTRE, J. V; BROOKS, C. R. KIM-1-/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. **EMBO J**, v. 34, n. 19, p. 2441–2464, 2015.
- CAO, Y.; XU, W.; HUANG, Y.; ZENG, X. Licochalcone B, a chalcone derivative from *Glycyrrhiza inflata*, as a multifunctional agent for the treatment of Alzheimer's Disease. **Nat Prod Res.** Vol. 34(5): 736-739, 2020.
- CHAWLA, L.S.; AMDUR, R.L.; SHAW, A.D.; FASELIS, C.; PALANT, C.E.; KIMMEL, P.L. Association between AKI and long-term renal and cardiovascular outcomes in United States veterans. **Clin J Am Soc Nephrol.** VOL. 9: 448-56, 2014.
- CHEN, X.; YU, W.; LI, W.; ZHANG, H.; HUANG, W.; WANG, J. et al. Na anti-inflammatory chalcone derivative prevents heart and Kidney from hiperlipidemia-

induced injuries by attenuating inflammation. **Toxicol Appl Pharmacol.** vol 338: 43-53, 2018.

CHEALLAIGH, CN, SHEEDY, FJ, HARRIS, J. et al. A common variant in the adaptor Mal regulates interferon gamma signaling. **Immunity** vol. 44:368-79, 2016.

CHU, J.; GUO, C.L. Design and Discovery of some novel chalcones as antioxidant and anti-inflammatory agents via attenuating NK-kB. **Arch Pharm Chem.** Vol. 349: 63-70, 2016.

COOB, M. H. MAP kinase pathways. **Prog Biophys Mol Bio**, vol. 171:479–500, 1999

CORRIGER, A.; PICKERING, G. Ketamine, and depression: a narrative review. **Drugs Des Devel Ther.**vol.13: 3051-3067, 2019.

CROWLEY, L.C.; MARFELL, B.J.; SCOTT, A.P.; WATERHOUSE, N.J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, V. 11, 2016.

CUANRENAL, L.; SÁENZ, D.; VALIÑO-RIVAS, L. et al. MAP3K kinases and Kidney injury. **Nefrologia (Engl. Ed).** Vol 39 (6): 568-580, 2019.

DA SILVA, T.L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo – Funcionalidade Celular online em bioprocessos. **Bol. Biotecnologia**, 2004.

DA SILVA, A.W.; FERREIRA, M.K.; REBOUÇAS, E.L.; MENDES, F.R.; MOURA, A.L.; DE MENEZES, J.E.; MARINHO, M.M. et al. Anxiolytic-like effect of natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from *Croton anisodontus* in adult zebrafish via serotonergic neuromodulation involvement of the 5-HT system. **Naunyn-Schmiedberg's Arch of Pharmacology**, vol. 394(10): 2023-2032, 2021.

DAENEN, K.; ANDRIES, A.; MEKAHLI, D.; SCHEPDAEL, A.; JOURET, F.; BAMMENS, B. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology.** Vol. 34(6): 975-991, 2019.

DAUDON, M.; FROCHOT, V.; BAZIN, D.; JUNGERS, P. Drug-induced Kidney stones and crystalline nephropathy: pathophysiology, prevention, and treatment. **Drugs.** Vol. 78(2):163-201, 2018.

DE FREITAS, A.A.; FRANCELIN, M.F.; HIRATA, G.F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F.L. Effect of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase enzyme (PPO) on Benitaka and Rubi grape cultivars and on products processed in form of juice and jelly. **Food Sci.** Vol 28(1), 2008.

DE FREITAS, T. S. F.; XAVIER, J. C.; PEREIRA, R. L. S.; ROCHA, J. E.; MUNIZ, D. F.; DA SILVA, P. T.; HORA, J. P.; DOS SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; NOGUEIRA, C. E. S.; TEIXEIRA, A. M. R.; COUTINHO, H. D. M. Direct antibacterial and antibiotic resistance modulatory activity of chalcones synthesized from

the natural product 2 hydroxy-3,4,6 trimethoxyacetophenone. **FEMS Microbiol Lett.** v. 367, n. 15, 2020.

DE OLIVEIRA, V.M; MARINHO, M.M; MAGALHÃES, E.P; et al. Molecular docking identification for the efficacy of natural limonoids against COVID-19 virus main protease. **Journal of the Indian Chemical Society.** Vol. 98: 100157, 2021.

DIAMOND, P.R; FARMERY, A.D; ATKINSON, S.; HALDAR, J.; WILLIAMS, N.; COWEN, P.J. et al. Ketamine infusions for treatment resistant depression: a series of 28 patients treated weekly or twice weekly in an ECT clinic. **J Psychopharmacol.** Vol.28(6):536–44, 2014

DING, Y.; ZHENG, Y.; HUANG, J., et al. UCP2 melhora a disfunção mitocondrial, inflamação e estresse oxidativo na lesão renal aguda induzida por lipopolissacarídeos . **Int Imunofarmacol .** vol. 71:336-349, 2019.

DIKALOV, S.; GRIENDLING, K.K.; HARRISON, D.G. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. **Hypertension.** Vol 49(4): 717-727, 2007.

DONG, C.; ANAND, K.J. Developmental neurotoxicity of ketamine in pediatric clinical use. **Toxicol Lett.** vol. 220(1):53-60, 2013

DURAL, O., KANBAK, M., CILIV, G., AYPAR, U.; ERDEM, K. Comparison of halothane, enflurane and isoflurane kidney effects through alanine aminopeptidase/urine creatinine values. **Anaesthesia and Intensive Care,** vol. 23(2), 162–164, 1995

EDLIGH, F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns. **Biochem Biophys Res Commun.** Vol 500(1):26– 34, 2018.

EHRMANN, S.; HELMS, J.; JORET, A. et al. Nephrotoxic drug burden among 1001 critically ill patients: impact on acute Kidney injury. **Ann Intensive Care.** Vol 9(1):106, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.** Vol 35 (4): 495-516, 2007.

ERSTAD, B.L; PATANWALA, A.E. Ketamine for analgosedation in critically ill patients. **J Crit Care.** Vol. 35: 145-149, 2016.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods Mol Biol.** vol 594: 57-72, 2010.

EUSTAQUIO, T.; WANG, C.; DUGARD, C.K. et al. Electron microscopy techniques employed to explore mitochondrial defects in the developing rat brain following ketamine treatment. **Exp Cell Res.** Vol. 373 (1-2): 164-170, 2018.

FAN, N., LUO, Y.Y, XU, K., ZHANG, M.L, KE, X.Y, HUANG, X,N, et al. Relationship of serum levels of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 and schizophrenia-like symptoms in chronic ketamine abusers. **Schizophr.** Vol. 169: 10-15, 2015.

- FANG, Q.; WANG, J.; WANG, L.; ZHANG, Y.; YIN, H.; et al. Attenuation of inflammatory response by a novel chalcone protects Kidney and heart from hyperglycemia-induced injuries in type 1 diabetic mice. **Toxicol Appl Pharmacol.** vol 288(2): 179-91, 2015.
- FERREIRA, M.K.; FONTENELLE, R.O.S.; MAGALHÃES, F.E.A.; BANDEIRA, P.N.; MENEZES, J.E.S.; DOS SANTOS, H. Chalcones Pharmacological Potential: A Brief Review. **Rev. Virtual Quim.** Vol 10(5): 1455-1473, 2018.
- FRANKS, J.; WALLACE, C. T.; SHIBATA, M.; SUGA, M.; ERDMAN, N.; STOLZ, D. B.; WATKINS, S. C. Correlative Fluorescence and Electron Microscopy in 3D—Scanning Electron Microscope Perspective. **Curr Protoc Cytom.** v. 45, 2017.
- FREITAS, T.S.; XAVIER, J.C.; PEREIRA, R.; ROCHA, J.E. et al. In vitro and in silico studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, vol 161, 2021.
- FONTENELLE, R.O.S; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S; BRILHANTE, R.S.N; et al. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of App. Microb.** Vol 104: 1383-1390, 2008.
- GACCHE, R.N.; DHOLE, N.A.; KAMBLE, S.G.; BANDGAR, B.P. In vitro evaluation of selected chalcones for antioxidant activity. **Journ of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.** Vol 23 (1), 2008.
- GALLUZZI, L, VITALE, I, AARONSON, S.A; ABRAMS, J.M; ADAM, D., AGOSTINIS, P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ.** vol. 25(3):486–541, 2018.
- GAO, M.; REJAEI, D.; LIU, H. Ketamine use in current clinical practice. *Acta Pharmacol Sin.* vol 37(7):865-872, 2016.
- GIVAN, A.L.; Flow cytometry: an introduction. **Methods Mol. Biol.** Vol 699: 1-29, 2011.
- GOLDEN, D.; CORBETT, J.; FORNI, L.G. Peri-operative renal dysfunction prevention and management. **Anaesthesia.** Vol 71 (1): 51-7, 2016.
- GOODMAN and GILMAN. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 13th edition, **McGraw Hill Medical**, 2017.
- GREENBERG, J.; WHITLOCK, R.; ZHANG, W. et al. Interleukin-6 and Interleukin-10 as Acute Kidney Injury Biomarkers after Pediatric Cardiac Surgery. **Pediatr Nephrol.** Vol 30(9): 1519-1527, 2015.
- GRYNBERG, K.; MA, F.Y; NIKOLIC-PATERSON, D.J. The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis. **Front Physiol.** Vol 8: 829, 2017.

GUO, Y.L., BAYSAL, K, KANG, B, YANG, LJ, WILLIAMSON, JR. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor- α in rat mesangial cells. **J Biol Chem**, vol. 273: 4027–4034, 1998

HARTY, L.; JOHNSON, K.; POWER, A. Race and ethnicity in the era of emerging pharmacogenomics. **J Clin Pharmacol**. vol. 46: 405–407, 2006

HELMUT, S. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**. vol 4: 180-3, 2015.

HEIDARI, M.R.; FOROUMADI, A.; AMIRABADI, A. et al. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of a novel rigid 3,4- dihydroxy chalcone in mice. **Annals of the New York academy of Sciences**, 2009.

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HANN, S. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J**. vol 374 (pt.1): 1-20, 2003.

HU, J.; LIU, J. Licochalcone A attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B activation. **Inflammation**. Vol. 39(2): 569-74, 2016.

IMBERTY, A.; HARDMAN, K.; CARVER, J.; PEREZ, S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, Vol. 1 (6): 631–642, 1991.

JASHCKE, P. R. Simulated Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for a Cost-Effective Investigation of Natural and Engineered Cellular Signaling Pathways. **Biochem Mol Biol Educ**. v. 48, n. 1, p. 67-73, 2020.

JACOB, J.; DANNENHOFFER, J.; RUTTER, A. Acute Kidney Injury. **Prim Care**. Vol 47 (4), 571-584, 2020.

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

JOHN, S.R. Interleukin-6 Family Cytokines. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. Vol 10(2): a028415, 2018.

JONES, E.A; SHOSKES, D.A. The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. **J Urol**. Vol 163 (3): 999-1004, 2000.

KALOPITA, K.; ARMAKOLAS, A.; PHILIPPOU, A.; ZARROS, A.; ANGELOGIANNI, P. Ketamine-induced neurotoxicity in neurodevelopment: A synopsis of main pathways based on recent *in vivo* experimental findings. [J Anaesthesiol Clin Pharmacol](#). VOL. 37(1): 37–42, 2021.

KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, BK. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. **BioMol Concepts** vol. 9: 64–79, 2018.

KAMP, J.; JONKMAN, K.; VAN VELZEN, M.; AARTS, L. et al. Pharmacokinetics of ketamine and its major metabolites norketamine, hydroxynorketamine, and dehydronorketamine: a model-based analysis. *Br J. Anaesth.* Vol 125 (5): 750-761, 2020.

KARMACOVA, T.A; SERGEEVA, N.S.; KANUKOEV, K.Y.; ALEKSEEV, B.Y; KAPRIN, A.D. Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1): a multifunctional glycoprotein and biological marker (review). **Sovrem Tekhnologii Med.** Vol 13(3): 64-78, 2021.

KELLUM, J. A.; ROMAGNANI, P.; ASHUNTANTANG, G.; RONCO, C.; ZARBOCK, A.; ANDERS, H. Acute Kidney Injury. **Nature Rev. Dis Primers.** 7 (1): 52, 2021.

KIELKOPF, C. L.; BAUER, W.; URBATSCH, I. L. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. **Cold Spring Harb Protoc.** v. 4, 2020.

KIKUCHI, R.; PETERKIN, V. C.; CHIOU, W. J.; MORAIS, S. M.; BOW, D. A. J. Validation of a Total IC50 Method Which Enables In Vitro Assessment of Transporter Inhibition Under Semi-Physiological Conditions. **Xenobiotica.** v. 9, p. 825-832, 2016.

KIM, J.; PARK, S.J.; YUN, K.J. et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. **Eur. J. Pharmacol.** Vol. 584: 175-184, 2008.

KIM, E.; CHOI, E. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1802: 396–405, 2010.

KIM, K.S.; KWAK, H.J.; MIN, S.K.; LEE, S.Y.; KIM, K.M.; KIM, J.Y. The effect of ketamine on tracheal intubating conditions without neuromuscular blockade during sevoflurane induction in children. **J Anesth.** VOL. 25: 195–9, 2011.

KONTOGIORGIS, C.; MANTZANIDOU, M.; LITINA, D.H. Chalcones and their potential role in inflammation. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** Vol 8: 1224-1242, 2008.

KOZA, Y. Acute kidney injury: current concepts and new insights. **J. Inj. Violence Res.** Vol. 8(1): 58-62, 2016.

KOVACOVA, V.; ABDELSALAM, E. E. E.; BANDOUCHOVA, H.; BRICHTA, J.; HAVELKOVA, B.; PIACEK, V.; VITULA, F.; PIKULA, J. Cytotoxicity of ketamine, xylazine and Hellabrunn mixture in liver-, heart- and kidney-derived cells from fallow deer. **Neuro Endocrinol Lett.** v. 37, p. 78-83, 2016.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAECHRECKE, E.H. et al. Classification of cell death: recommendations of nomenclature committee on cell death. **Cell Death Differ.** Vol 16 (1): 3-11, 2009.

KOHLI, H.S.; BHASKARAN, M.C.; MUTHUKUMAR, T.; THENNARASU, K. et al. Treatment-related acute renal failure in the elderly: A hospital-based prospective study. **Nephrol. Dial. Transplant.** Vol. 15: 212-217, 2000.

KUHLMANN, M.K.; HORSCH, E.; BURKHARDT, G.; KOHLER, M.W. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by bioflavonoids quercetin. **Arch Toxicol.** Vol 72 (8): 536-40, 1998.

LAURENCE, C.; BRAMELD, K. GRATON, J. LE QUESTEL, J.; RENAULT, E. The pK_{BH^+} Database: Toward a Better Understanding of Hydrogen-Bond Basicity for Medicinal Chemists. **J Med Chem.** Vol 52 (14): 4073-4086, 2009.

LECRERQ, M.P.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. **Antimicrob Agents Chemother.** VOL. 43:1003–1012, 1999.

LEE, D.; KIM, K.H; MOON, S.W.; LEE, H.; KANG, K.S.; LEE, J.W. Synthesis, and biological evaluation of chalcone analogues as protective agents against cisplatin-induced cytotoxicity in kidney cells. **Bioorg Med Chem Lett.** vol. 25(9): 1929-1932, 2015.

LI, X.; LIU, C.; MAO, Z.; LI, Q.; ZHOU, F. Timing of renal replacement therapy initiation for acute kidney injury in critically ill patients: a systematic review of randomized clinical trials with meta-analysis and trial sequential analysis. **Crit Care.** Vol 25(1): 15, 2021.

LI, X.; LI, S.; ZHENG, W.; PAN, J. et al. Environmental enrichment and abstinence attenuate ketamine-induced cardiac and renal toxicity. **Sci Rep.** Vol. 5: 11611, 2015.

LI, Y.; SHEN, R.; WEN, G.; DING, R. et al. Effects of Ketamine on Levels of Inflammatory Cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the Hippocampus of Mice Following Acute or Chronic Administration. **Front Pharmacol.** Vol 8:139, 2017.

LIAO, Y.; TAN, R.; LI, J.; LIU, T.; ZHONG, X. et al. Isoliquiritigenin Attenuates UUO-Induced Renal Inflammation and Fibrosis by Inhibiting Mincle/Syk/NF-Kappa B Signaling Pathway. **Drug Des Devel Ther.** Vol 14: 1455-1468, 2020.

LIN, Y.; CHOKSI, S.; SHEN, H.M.; YANG, Q.F.; HUR, G.M.; KIM, Y.S. et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. **J Biol Chem.** Vol 279(11):10822–8, 2004.

LOPES, LAYANNE. AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE CHALCONAS OBTIDAS A PARTIR DE 2- HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIACETOFENONA ISOLADA DE *Croton anisodontus* Mull. Arg. (EUPHORBIACEAE). 2018 (Dissertação).

PITTALUGA, EVERTON. ESTUDO DE REAÇÕES DE FLUOR-INSERÇÃO EM 1H-PIRÁZÓIS UTILIZANDO OS REAGENTES FLUORANTES SELECTFLUOR, DAST E MFSDA. 2015. (Tese)

LOPES, I.F.; JANUARIO, H.; DE AMORIM, C.G; RUZI, R.A.; MANDIM, B.L. Renal Injury after anesthesia: what is in evidence. **RMMG**. Vol 27(2), s74-s82, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951

LU, X.; CROWLEY, S.D. Inflammation in Salt-sensitive Hypertension and Renal Damage. **Curr Hypertens Rep**. Vol 20(12): 103, 2018.

MAGALHÃES, E.P.M; GOMES, N.D.B.G; DE FREITAS, T.A; SILVA, B.P.; RIBEIRO, L.R. et al. Chloride substitution on 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenylchalcones improves in vitro selectivity on *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Chemico-Biological Interactions**. Vol. 361: 109920, 2022

MAGALHÃES, E.P.M; SILV, B.P.; AIRES, N.L.; RIBEIRO, L.R.; ALI, A.; CAVALCANTI, M.M.; NUNES, J.V; SAMPAIO, T.L.; BEZERRA, R.R.; MARTINS, A.M.C. (–)- α -Bisabolol as a protective agent against epithelial renal cytotoxicity induced by amphotericin B. **Life Sciences**. vol. 291: 120271, 2022

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a conveniente assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochem**. Vol. 47 (3): 469-474, 1974.

MCCOY, I.E.; CHERTOW, G.M. AKI- A Relevant Safety End Point? **Am J Kidney Dis**. Vol. 75(4):508-512, 2020.

MCKINNON, K.M. Flow Cytometry: An Overview. **Curr Protoc Immunol**. Vol 120: 5.1.1-5.1.11, 2018.

MENG, F.; CHEN, Q.; GU, S.; CUI, R. et al. Inhibition of Circ-Snrk ameliorates apoptosis and inflammation in acute kidney injury by regulating the MAPK pathway. **Ren Fail**. Vol. 44(1): 672-681, 2022.

MERCATELLO, A. [Changes in renal function induced by anesthesia]. **Ann Fr Anesth Reanim**. Vol. 9(6):507-524, 1990.

MONTANTE, S.; BRINKMAN, R. Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. **Int. J. Lab. Hematol**. Suppl 1: 56-62, 2019

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MORGAN. C.J; CURRAN, H.V.; Ketamine use: a review. **Addiction**. vol.107(1): 27-38, 2012.

NEGI, S.; KOREEDA, D.; KOBAYASHI, S.; YANO, T.; TATSUTA, K.; MIMA, T.; SHIGEMATSU, T.; OHYA, M. Acute Kidney Injury: Epidemiology, Outcomes, complications and therapeutic strategies. **Seminars in Dialysis**. 1-9, 2018.

NISHITAI, G, SHIMIZU, N, NEGISHI, T, et al. Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in embryonic stem cells. **J Biol Chem.** V.16;279(3): 1621-1626.2004.

NIRMALA, J.G.; LOPUS, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell Biol Toxicol.** Vol 36(2): 145-164, 2020.

NOWACKA, A.; BORCZYK, M. Ketamine applications beyond anesthesia – A literature review. **European Journal of Pharmacology.** VOL 860:172547, 2019.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **Eur Jour Med Chem.** Vol 42: 125-137, 2007.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals – a review. **Braz J Biol.** vol. 81 (4): 1133-1143, 2021.

ORHURHU, V.; VASHISHT, R.; CLAUS, E.L.; COHEN, S.P. Ketamine Toxicity. **Stat Pearls [Internet]**, 2022.

OWEN, J. B.; BUTTERFIELD, D.A; Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. **Concepts and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 648, 269-277, 2010.

PANNU, N.; NADIM, M. K. Na overview of drug-induced acute Kidney injury. **Crit Care Med.** Vol. 36 (4 suppl): 216-223, 2008.

PARZYCH, K.R.; KLIONSKY, D.J. An overreview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. **Antioxid Redox Signal.** Vol 20(3):460-473, 2014.

PEDROSO, L.A.; NOBRE, V.; DE ALMEIDA, C.D. et al. Acute Kidney injury biomarkers in the critically ill. **Clin Chim Acta.** Vol 508: 170-178, 2020.

PEERAPORN RATANA, S.; CABALLERO, C.L.; GÓMEZ, H.; KELLUM, J.A. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. **Kidney Int.** vol. 96(5), 1083-1099, 2019.

PERAZELLA, M. A. Drug use and nephrotoxicity in the intensive care unit. **Kidney Int.** vol. 81: 1172–1178, 2012

PERAZELLA, M.A. Pharmacology behind common drug nephrotoxicities. **Clin J Am Soc Nephrol.** Vol 13(12): 1897-1908, 2018.

PETEJOVA, N.; MARTINEK, A.; ZADRAZIL, J.; KANOVA, M.; KLEMENTA, V.; SIGUTOVA, R.; KACIROVA, I.; HRABOVSKY, V.; SVAGERA, Z.; STEJSKAL, D. Acute Kidney Injury in Septic Patients Treated by Selected Nephrotoxic Antibiotic Agents—Pathophysiology and Biomarkers—A Review. **Int. Journal of Mol. Sciences.** vol 19, 7115, 2020.

PINHO-RIBEIRO, F.; HOHMANN, M.; BORGHI, S.M. et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**. vol 288: 88-99, 2015.

POLO, E.; IBARRA-ARELLANO, N.; PENALOZA, L.P.; BAYUELO, A.M.; HENAO, J.; GALDÁMEZ, A.; GUTIÉRREZ, M. Ultrasound-assisted synthesis of novel chalcone, heterochalcone and bis-chalcone derivatives and the evaluation of their antioxidant properties and as acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic Chem.** Vol 90, 2019.

PORTER, J.; PICKUP, R.; EDWARDS, C. Membrane hyperpolarisation by valinomycin and its limitations for bacterial viability assessment using rhodamine 123 and flow cytometry. **FEMS Microbiology letters**. V.132(3), 1995.

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.

QIAN, Y.; SHANG, Y.; TENG, Q. et al. Hydroxychalcones as potent antioxidants: Structure–activity relationship analysis and mechanism considerations. **Food Chem.** Vol. 126: 241-248, 2011.

RATLIFF, B.; RABADI, M.; VASKO, R.; YASUDA, K. et al. Messengers without borders: mediators of systemic inflammatory response in AKI. **J Am Soc Nephrol**. Vol. 24:529–536, 2013.

RYAN, M.J.; JOHNSON, G.; KIRK, J.; FUERSTENBERG, SM, et al. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. **Kidney Int.**, v. 45, p. 48–57, 1994.

ROSA, A.C.; CORSI, D.; CAVI, N.; BRUNI, N.; DOSIO, F. Superoxide Dismutase Administration: A review of proposed human uses. **Molecules**. Vol.26 (7): 1844, 2021.

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

SABBISSETTI, V.S., WAIKAR, S.S., ANTOINE, D.J., et al. 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 Soc Nephrol**. Vol. 25(10):2177–2186, 2014.

SACK, M.N.; FYHRQUIST, F.Y; SAIJONMAA, O.J.; FUSTER, V.; KOVACIC, J.C. Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-part series. **J. Amer Col. Of Cardio**. Vol 70(2): 196-211, 2017.

SAMPAIO, T. L.; MENEZES, R. R. P. P. B.; DA COSTA, M. F. B.; MENESES, G. C.; ARRIETA, M. C. V.; CHAVES FILHO, A. J. M.; DE MORAIS, G. B.; LIBÓRIO, A. B.; ALVES, R. S.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; MARTINS, A. Nephroprotective

effects of (-)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury.

Phytomedicine, n. 14, p. 1843-1852, 2016.

SAMPAIO, T. L.; MENEZES, R. R. P. P. B.; LIMA, D. B.; SILVA, R. A. C.; AZEVEDO, I. E. P.; MAGALHAES, E. P.; MARINHO, M. M.; DOS SANTOS, R. P.; MARTINS, A. M. C. Involvement of NADPH-oxidase enzyme in the nephroprotective effect of (-)- α -bisabolol on HK2 cells exposed to ischemia – Reoxygenation. **Eur J Pharmacol.** v. 855, p. 1-9, 2019.

SANTANA, D.P.; RIBEIRO, T.F.; RIBEIRO, E.L. Action of chalcones Against biofilm formation of *Candida albicans*. **Rev. Ciencia Farm. Básica Apl.** Vol 36(1): 83-90, 2015.

SANTIAGO, R. N. S.; FREIRE, P. T. C.; AYALA, A. P.; TEIXEIRA, A. M. R.; SANTOS, H. S. et al. Crystal structure, vibrational spectra and quantum chemical parameters of 2- hydroxy-3,4,6-trimethoxyaceophenone isolated from the *Croton anisodontus* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Molecular Structure**, vol. 1171: 815-826, 2018

SARAIVA, R.A. Inhalation Anesthetics. **Rev Bras Anesthesiol.** Vol. 44 (1): 43 – 52, 1994.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T.; HUME, D.A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Jour of Leucocyte Biology.** Vol. 75: 163-189, 2004.

SELBY, N.; ANDERSON, J.; BUNGAY, P.; CHESTERTON, L.; KOLHE, N. Obstructive nephropathy and Kidney injury associated with ketamine abuse. **NDT Plus.** Vol 1(5): 310-2, 2008.

SCHETZ, M.; DASTA, J.; GOLDSTEIN, S.; GOLPER, T. Drug-induced acute kidney injury. *Curr. Opin. Crit. Care.* vol. 11: 555-565, 2005.

SCHUTTLER, J. SCHWILDEN, H. [Handbook of Experimental Pharmacology]. **Modern Anesthetics. Volume 182 || Ketamine**, 2008.

SHIMORA, P.D; THURAS, P.; WELS, J. et al. Neurocognitive performance of repeated versus single intravenous subanesthetic ketamine in treatment resistant depression. **J Affect Disord.** Vol. 277:470–7, 2020.

SHITYAKOV, S.; FORSTER, C. Silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Adv. Appl. Bioinforma. Chem.** 2014.

SIVAKUMAR, P.M.; PRABHAKAR, P.K. Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure–activity relationship studies of chalcones. **Med Chem Res.** Vol 20: 482-492, 2011.

SLATER, M.B; GRUNEIR, A.; ROCHON, P.A; HOWARD, A. W.; KOREN, G.; PARSHURAM, C.S. Identifying High-Risk Medications Associated with Acute Kidney

Injury in Critically Ill Patients: A Pharmacoepidemiologic Evaluation. **Pediatr Drugs**. Vol. 19(1): 59-67, 2017.

SLIVKA, A., SPINA, M.B., COHEN G. Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. **Neurosci Lett**, vol. 74:112–118, 1987.

SILVA, J.N.; DE SALES, M.F.; GOMES, A.P.; CARNEIRO-TORRES, D.S. Sinopse das espécies de *Croton* L. [Euphorbiaceae] no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta. Bot. Bras.** Vol 24(2): 441-453, 2010.

SILVA, P.T.; LOPES, L. M.; XAVIER, J. C.; CARVALHO, M. C. S.; MORAIS, M. O.; PESSOA, C.; BARROS-NEPOMUCENO, F. W. A.; BANDEIRA, P. N.; TARGINO, C. S. P. C.; TEIXEIRA, A. M. R.; FONTENELLE, R. O. S.; SANTOS, H. S. Cytotoxic and Antifungal Activity of Chalcones Synthesized from Natural Acetophenone Isolated from *Croton anisodontus*. **Rev. Virtual Quim.**, v. 12, n. 3, 2020.

SMITH, D.; STARBORG, T. Serial block face scanning electron microscopy in cell biology: Applications and technology. *Tissue Cell*. v. 57, p. 111-222, 2019.

SONEKATSU, M.; TANIGUCHI, W.; YAMANAKA, M. Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia–neuron interaction. **Molecular Pain**. Vol. 12: 1-10, 2016.

SOUZA, J.; CRUZ, D.P.; NUNES, G.A. et al. Acute Kidney failure in Northeast Brazil: Morbimortality and public costs. **Rev enferm UFPE on line**. Vol. 13:e240825, 2019.

TANG, Y.; LUO, H.; XIAO, Q.; LI, L.; ZHONG, X. et al. Isoliquiritigenin attenuates septic acute kidney injury by regulating ferritinophagy-mediated ferroptosis. **Ren Fail**. Vol. 43(1): 1551-1560, 2021.

TEIXEIRA, A. M. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P.N.; JULIÃO, M. S. S.; et al. Structural, spectroscopic and microbiological characterization of the chalcone 2E-1-(2--hydroxy3-,4-,6--trimethoxyphenyl)-3-(phenyl)-prop-2-en1-one derived from the natural product 2-hydroxy3,4,6-trimethoxyacetophenone. **J. Of Mol. Structure**, v. 1179, 2019.

THONGNUANJAN, P.; SOODVILAI, S.; FONGSUPA, S.; et al. Protective Effect of Panduratin A on Cisplatin-Induced Apoptosis of Human Renal Proximal Tubular Cells and Acute Kidney Injury in Mice. **Biol Pharm Bull**. V. 44 (6): 830-837, 2021.

TIAN, W.; ZHANG, Z.; COHEN, D.M. MAPK signaling and the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, vol. 1279: F593–F604, 2000.

TROTT, O.; OLSON, A.J, Vina AutoDock. Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J. Comput. Chem**. Vol 31: 455–61, 2010.

- UCHINO, S.; KELLUM, J.A.; BELLOMO, R.; DOIG, G.S.; MORIMATSU, H.; MORGERA, S. et al. Acute Renal Failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. **JAMA**. Vol. 294(7): 813-818, 2005.
- URSINI, F.; MAIORINO, M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4. **Free Radical Biol and Med**. Vol 152: 175-185, 2020.
- VALADARES, N. F. et al **J. Chem. Inf. Model**. Vol. 49, 2606–2616, 2009.
- VANDEN BERGHE, T.; GROOTJANS, S.; GOOSENS, V.; DONDELINGER, Y.; KRYSKO, D. V.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117–129, 2013.
- VELDHOEN, M. Guidelines for the use of flow cytometry. **Immun Inflamm Dis**. 5 (4): 384-385, 2017
- VERMA, S.; KELLUM, J.A. Defining Acute Kidney Injury. **Crit Care Clin**. Vol. 37(2): 251-266, 2021.
- VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.A.M; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from Myracrodruon urundeuva Allemão. **Phytomedicine**. Vol 10, 189, 2003.
- VIANNA, H.; SOARES, C.M.; TAVARES, M.; TEIXEIRA, M.; SIMÕES E SILVA, A.C. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. **J. Bras. Nefrol**. Vol 33 (3), 2011.
- VIJAYAN, A. Tackling AKI: prevention, timing of dialysis and follow-up. *Nat Ver Nephrol*. Vol 17(2):87-88, 2021
- XU, Y.; MA, H.; SHAO, J.; WU, J.; ZHOU, L. et al. A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. **J Am Soc Nephrol**. Vol 26 (11): 2647-58, 2015.
- WAI, M.S; CHAN, W.M.; ZHANG, A.Q; WU, Y.; YEW, D.T. Long-term ketamine and ketamine plus alcohol treatments produced damages in liver and Kidney. **Hum Exp Toxicol**. Vol 31(9): 877-86, 2012
- WAGNER, E.F.; NEBREDA, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nat. Rev. Cancer**. Vol. 9, 537–549, 2009.
- WANG, C.; ZHANG, X.; LIU, F.; PAULE, M.G; SLIKKER, W. Anesthetic-induced oxidative stress and potential protection. **Scientific World Journal**. Vol. 10: 1473-1482, 2010.
- WANG, J.; QI, H.L.; LIU, F.; YAN, H.D. Ketamine abuse-induced obstructive nephropathy and Kidney injury. **Chin Med Sci J**. vol 29 (2): 122-4, 2014.

- WILLIAM, S.J.; ANTOINE, D.J.; SMYTH, R.L.; PIRMOHAMED, M.
Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children. **Pediatr Nephrol**. Vol 32(11): 2015-2025, 2017.
- WILSON, F.P; MARTIN, M.; YAMATOMO, Y. *et al*. Electronic health record alerts for acute kidney injury: multicenter, randomized clinical trial. **BMJ**. Vol. 372: 4786, 2021.
- WU, H.; HUANG, J. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies. **Current Drug Metabolism**. Vol. 19: 559-567, 2018.
- YANG, Z.; KLIONSKY, D.J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Curr Opin Cell Biol**, vol 22: 124-131, 2010.
- ZANOS, P.; MOADDEL, R.; MORRIS, P.; RIGGS, L.M.; HIGHLAND, J. *et al*. Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: insights into therapeutic mechanisms. **Pharmacol Rev**. Vol. 70(3): 621-660, 2018.
- ZHANG, J., ZHAO, D., NA, N., et al. Renoprotective effect of erythropoietin via modulation of the STAT6/MAPK/NF-kappaB pathway in ischemia/reperfusion injury after renal transplantation. **Int J Mol Med**. Vol. 41(1):25–32, 2018.
- ZOU, X.; PATTERSON, T.; SADOVOVA, N. et al. Potential Neurotoxicity of Ketamine in the Developing Rat Brain. **Toxicological Sciences**. Vol 108 (1), 2009