



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

PAULA LETÍCIA BRAGA E SILVA

**EFEITOS RENAIIS DOS METALOFÁRMACOS FOR011B E FOR811B EM
MODELOS DE RIM ISOLADO DE RATO E ISQUEMIA/REPERFUSÃO (I/R)
CELULAR**

**FORTALEZA –CE
2018**

PAULA LETÍCIA BRAGA E SILVA

**EFEITOS RENAIIS DOS METALOFÁRMACOS FOR011B E FOR811B EM
MODELOS DE RIM ISOLADO DE RATO E ISQUEMIA/REPERFUSÃO (I/R)
CELULAR**

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

Orientadora: Dra. Helena Serra Azul
Monteiro

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

B795e Braga e Silva, Paula Leticia.

Efeitos renais dos metalofármacos FOR011B e FOR811B em modelos de rim isolado de rato e isquemia/reperfusão (I/R) celular / Paula Leticia Braga e Silva. – 2018.
97 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. Óxido nítrico . 2. Isquemia/Reperfusão (I/R). 3. Metalofármacos. I. Título.

CDD 615.1

PAULA LETÍCIA BRAGA E SILVA

**EFEITOS RENAIIS DOS METALOFÁRMACOS FOR011B E FOR811B EM
MODELOS DE RIM ISOLADO DE RATO E ISQUEMIA/REPERFUSÃO (I/R)
CELULAR**

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

Aprovada em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Jamile Magalhães Ferreira

Universidade da Integração Internacional
da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

À Deus, por seu infinito amor e cuidado.

À minha mãe, Julieta, por toda sua dedicação e amor.

Ao Fernando, meu amor, por sua companhia e apoio
em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a Deus, por todo seu amor e cuidado que são demonstrados durante todos esses anos em minha vida, e por permitir a concretização de mais um etapa.

À minha mãe, por se fazer presente em mais uma etapa e me apoiar, incondicionalmente, em todos os momentos. Espero que eu consiga um dia retribuir toda sua dedicação e amor oferecidos a mim e, que possamos continuar compartilhando dessas alegrias e da concretização dessas etapas que são tão importantes pra mim. A senhora é a melhor mãe que alguém pode ter.

Ao Fernando, meu amor, meu companheiro e parceiro de vida, por todo seu apoio durante minha jornada acadêmica e por se fazer presente em todos os momentos. Agradeço também por sua paciência nos momentos difíceis e por se alegrar por minhas conquistas.

A minha irmã, Juliana, por sempre se fazer presente em etapas importantes e pelas demonstrações de felicidade e orgulho ao me ver concretizando sonhos.

Aos meus sogros, por incentivo, apoio e por me proporcionarem uma segunda casa, e é claro, por todo carinho e amor demonstrados durante todos esses anos. Agradeço muito por Deus ter me dado uma família tão maravilhosa e por sogros que são como pais pra mim.

À minha querida orientadora, Dra. Prof. Helena Serra Azul Monteiro, por confiar em mim desde a época da Iniciação Científica e por ter permitido a realização desse trabalho. Agradeço também, por sua generosidade, paciência, apoio e pelo exemplo de pessoa tão incrível que a senhora é, és um exemplo de vida para todos nós.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga França de Lopes, por ter colaborado e disponibilizado os complexos de rutênio (FOR011B e FOR811B) para realização desse trabalho.

À Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins, por disponibilizar seu laboratório para a execução dos experimentos com cultura de células e, também, agradeço especialmente ao Tiago Lima, pela sua imensa ajuda na execução dos experimentos e pela paciência nos momentos de apertado. Deixo expresso minha gratidão.

Ao Dr. Antônio Rafael Jorge, pela imensa ajuda durante os experimentos de perfusão e por todo seu apoio e ensinamentos ao longo dos dois anos de mestrado. Sou muito grata pela sua ajuda para realização desse trabalho.

À doutoranda Natacha, por toda sua ajuda durante a realização desse trabalho, não só na efetuação dos experimentos e dosagens, mas também por termos compartilhado juntas todas as emoções que ele nos proporcionou. Sem falar no seu apoio durante todos esses anos e sempre ser tão solícita quando mais preciso de você. Expresso aqui, minha eterna gratidão por tudo que vocês fez por mim e por seus ensinamentos.

Aos doutorandos Pedro e Júnior, pelos auxílios prestados sempre que eu precisei. Não só nas ajudas com os experimentos, mas também, pela amizade e apoio ao longo desses

anos. Sou muita grata pelo companheirismo de vocês, e quero manter esse vínculo além da vida acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Toxinologia, pela ajuda na realização desse trabalho, especialmente, as ICs, Paloma, Amanda, Thays, Mikaella, pela realização das dosagens durante os experimentos.

À professora Janaína Serra Azul que contribuiu com a parte de histologia. Como também aos alunos do Laboratório MEC.

À técnica Sílvia, por se mostrar tão solícita quando precisamos de sua ajuda nos experimentos.

À professora Renata, pela sua disposição sempre quando eu preciso da sua ajuda, deixo aqui minha gratidão.

Ao Pedro Everson, por ter se mostrado tão solícito na realização e ajuda nos experimentos.

Às minhas amigas, Liana, Reniza, Helaine, Ingrid e Camila por todo incentivo durante toda minha jornada acadêmica e por se mostrarem sempre tão presentes em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada a todas vocês por nossa amizade e cumplicidade.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para realização desse trabalho, deixo meu muito obrigada!
A todos os professores do Programa de Pós- Graduação em Farmacologia da UFC, pelos ensinamentos transmitidos.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

RESUMO

EFEITOS RENAIIS DOS METALOFÁRMACOS FOR011B E FOR811B EM MODELOS DE RIM ISOLADO DE RATO E ISQUEMIA/REPERFUSÃO (I/R) CELULAR

O sistema renal através de múltiplas ações exerce homeostasia do corpo. Diversas complicações causam danos e danificam a estrutura e, também, diminuem a atividade funcional dos rins, desencadeando um estado clínico denominado Lesão Renal Aguda (LRA). Compostos contendo íons metálicos são utilizados com grande relevância no tratamentos de diferentes doenças. Nos últimos anos, a química dos complexos de metal nitrosilos, tornou-se significativo devido ao papel importante envolvendo metal de transição nos processos biológicos de NO. O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos renais dos metalofármacos FOR011B e FOR811B em modelos de rim isolado de rato e Isquemia/Reperusão (I/R) celular. Os experimentos para avaliação dos efeitos hemodinâmicos renais foram realizados com rim isolado de ratos Wistar e, realizou-se dosagens bioquímicas das amostras coletadas e quantificação de GMPc por ELISA. Realizou-se também modelo *in vitro* de I/R em linhagens de células tubulares renais LLC-MK2 e ensaio de respiração celular por citometria de fluxo através da análise do potencial transmembrânico mitocondrial com corante Rodamina 123. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animais CEUA/UFC sob o número de protocolo 102/2016. Em perfusão de rim isolado o composto FOR011B causou aumento da pressão de perfusão e resistência vascular renal. O FOR011B e FOR811B aumentaram o fluxo urinário, clearance osmolar e reduziram TFG. Também ocasionaram diminuição dos transportes totais e proximais de sódio, potássio e cloreto. Somente o FOR011B aumentou os níveis de GMPc urinário dos rins perfundidos. Em linhagem de células LLC-MK2, apenas o FOR811B demonstrou potencial efeito protetor da disfunção respiratória causada pela lesão por I/R e, também, causou aumento da concentração nitrito/nitrato (NO_x) em tecido renal. Em suma, faz-se necessário futuros experimentos para investigar o mecanismo pelo qual o FOR811B tem a capacidade de doar óxido nítrico de maneira controlada e em níveis subtóxicos.

PALAVRAS-CHAVE: Óxido nítrico (NO). Isquemia/Reperusão (I/R). Metalofármacos.

ABSTRACT

THE RENAL EFFECTS OF FOR011B AND FOR811B METALLOPHARMACEUTICALS IN ISOLATED RAT KIDNEY AND CELLULAR ISCHEMIA / REPERFUSION (I / R) MODELS

The renal system through multiple actions exerts homeostasis of the body. Several complications cause damage and damage the structure and also decrease the functional activity of the kidneys, triggering a clinical condition called Acute Renal Injury (AKI). Compounds containing metal ions are used with great relevance in the treatment of different diseases. In the last years, the chemistry of nitrosyl metal complexes has become significant due to the important role involving transition metal in the biological processes of NO. This paper aims to study the renal effects of FOR011B and FOR811B metallopharmaceuticals in isolated rat kidney and cellular Ischemia / Reperfusion (I / R) models. The experiments to evaluate renal hemodynamic effects were performed with kidney isolated from Wistar rats and biochemical measurements of the collected samples were performed and quantification of cGMP by ELISA. I/R model *in vitro* were performed in LLC-MK2 renal tubule cells line and cell respiration assay by flow cytometry through the analysis of mitochondrial transmembrane potential with Rhodamine 123 dye. The project was approved by the Ethics Committee on Use of Animals (CEUA)/UFC under protocol number 102/2016. In compound kidney infusion compound FOR011B caused increased perfusion pressure and renal vascular resistance. The FOR011B and FOR811B increased urinary flow and decreased osmolar clearance and TFG. They also caused a decrease in the total and proximal transport of sodium, potassium and chloride. Only FOR011B increased levels of urinary GMPc of perfused kidneys. In LLC-MK2 cells line, only FOR 811 A demonstrated potential protective effect of respiratory dysfunction caused by I/R injury and, also caused increased nitrite / nitrate (NOx) concentration in renal tissue. In short, future experiments are needed to investigate the mechanism by which the FOR811B has the capacity of donate nitric oxide in a controlled manner and at subtoxic levels.

KEY WORDS: nitric oxide (NO). ischemia reperfusion. metallopharmaceuticals.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

% TCl ⁻	Percentual de cloreto transportado
% TK ⁺	Percentual de potássio transportado
% TNa ⁺	Percentual de sódio transportado
μmol	Micromolar
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
ANOVA	Análise de Variância
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
Cosm	Clearence osmolar
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DRC	Doenças Renal Crônica
ECl ⁻	Cloreto excretado
EK ⁺	Potássio excretado
ENa ⁺	Sódio excretado
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FU	Fluxo urinário
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IGF	Insulin – Like Growth Factor
I/R	Isquemia/Reperfusão
IL- 1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
i.p	Intraperitoneal
Kg	Quilograma
LRA	Lesão Renal aguda
Mg	Miligrama
ml	Microlitro

Nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
p	Significância estatística
PBS	Salina fosfatada
PDGF	Platelet – Derived Growth Factor
pH	Potencial hidrogeniônico
PP	Pressão de perfusão
Rpm	Rotação por minuto
RVR	Resistência vascular renal
SBF	Soro bovino fetal
TGF α e β	Transforming Growth Factor- α e β
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF α	Tumoral Necrosis Factor - α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura plana do complexo de rutênio (<i>cis</i> - [Ru(bpy) ₂ (ETU)Cl] ⁺ (FOR011B)	35
Figura 2 – Estrutura plana do nitrosil complexo de rutênio (<i>cis</i> - [Ru(bpy) ₂ (ETU)(NO)] ³⁺ (FOR811B)	36
Figura 3 - Valores de Pressão de Perfusão (mmHg), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6)	38
Figura 4 - Valores de Volume de NaCl 0,9% (mL/min), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6)	38
Figura 5 - Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h), relacionados à velocidade da bomba, durante a calibração do sistema (n=6)	38
Figura 6 - Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos	40
Figura 7 - Rim acoplado ao sistema de perfusão	41
Figura 8 – Desenho esquemático do ensaio de toxicidade pelo MTT	48
Figura 9 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B na pressão de perfusão	52
Figura 10 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B na resistência vascular renal	53
Figura 11 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B no fluxo urinário	55
Figura 12 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B no ritmo de filtração glomerular	56
Figura 13 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B no clearance osmolar	57
Figura 14 -Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa ⁺)	59
Figura 15 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa ⁺)	60
Figura 16 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Potássio (%TK ⁺)	62
Figura 17 - Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Proximal de Potássio (%TpK ⁺)	63

Figura 18- Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl ⁻)	65
Figura 19- Efeitos promovidos pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Proximal Cloreto (%TpCl ⁻)	66
Figura 20 Níveis de nitrito/nitrato em tecido renal	67
Figura 21 – Níveis de GSH em tecido renal	68
Figura 22- Níveis de GMPc urinário	69
Figura 23- Fotomicrografias representativas de rins de ratos, demonstrando o córtex, junção córtex-medular e medula interna	70
Figura 24- Fotomicrografias representativas de rins de ratos, demonstrando o córtex, junção córtex-medular e medula interna	71
Figura 25- Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011B	73
Figura 26- Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR811B.....	73
Figura 27- Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de FOR011B.....	75
Figura 28- Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de FOR811B.....	76
Figura 29- Análise da respiração celular pelo uso do corante rodamina	77
Figura 30- Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial pela utilização do corante rodamina	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de RIFLE para classificação da LRA	20
Tabela 2 - Critérios de AKIN para classificação da LRA	21
Tabela 3 - Critérios segundo KDIGO para classificação da LRA	21
Tabela 4 – Pressão de perfusão (PP) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	51
Tabela 5 – Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	53
Tabela 6 – Fluxo urinário (FU) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	54
Tabela 7 – Ritmo de filtração glomerular (RFG) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	55
Tabela 8 – <i>Clearence</i> osmolar (C_{OSM}) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	57
Tabela 9 - Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (% TNa^{+}) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	58
Tabela 10 - Percentual de Transporte Proximal de Sódio (% $TpNa^{+}$) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	60
Tabela 11 - Percentual de Transporte Tubular Total de Potássio (% TK^{+}) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L ...	61
Tabela 12 - Percentual de Transporte Proximal de Potássio (% TpK^{+}) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L	63
Tabela 13 - Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (% TCl^{-}) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L...	64
Tabela 14 - Percentual de Transporte Proximal Cloreto (% $TpCl^{-}$) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 100µmol/L.....	66
Tabela 15 - Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011B e FOR811B	72
Tabela 16 - Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i>	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Função Renal e Doenças renais	16
1.2 Fisiopatologia da disfunção endotelial	22
1.3 Isquemia e reperfusão	24
1.4 Óxido nítrico	25
1.5 Metalofármacos : aspectos químicos e perspectivas terapêuticas	28
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.3 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Sínteses dos complexos de rutênio	35
4.2 Animais de experimentação	36
4.3 Aspectos éticos	36
4.4 Perfusão Renal em Modelo de Rim Isolado de Rato	37
4.4.1 Sistema utilizado	37
4.4.2 Calibração do sistema	37
4.4.3 Solução perfusora	39
4.4.4 Técnica Cirúrgica	39
4.4.5 Procedimento experimental	41
4.4.6 Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais	42
4.4.7 Grupos experimentais	43
4.4.8 Análises bioquímicas	43
4.5 Determinações do níveis de Glutathiona Reeduzida (GSH)	44

4.6 Dosagem da produção de Nitrito/nitrato (NOx)	44
4.7 Níveis de GMPc urinário	45
4.8 Análise Histologia	45
4.9 Cultura de células tubulares renais	46
4.9.1 Obtenção da linhagem celular	46
4.9.2 Cultivo de células renais	46
4.9.3 Ensaios de Viabilidade Celular por Redução do MTT	47
4.9.4 Indução de I/R <i>in vitro</i>	48
4.9.5 Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial	49
4.10 Análise estatística	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Perfusão de rim isolado	50
5.2 Dosagem de nitrito/nitrato (NOx) no tecido renal	67
5.3 Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido renal	67
5.4 Determinação de GMPc urinário	68
5.5 Análise histológica	69
5.6 Cultura de células renais e viabilidade celular	72
5.7 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial	76
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	87
8 REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Função Renal e Doenças Renais

O sistema renal através de múltiplas ações exerce homeostasia do corpo. O órgão responsável pela formação e eliminação de urina é o rim, através do qual pelo mecanismo de excreção, os compostos indesejados ou metabólitos são eliminados, uma vez que foram resultantes do metabolismo. O controle do volume da composição dos líquidos corporais é outra função de extrema importância do rim. O mesmo é realizado através da filtração plasmática e eliminação de produtos do filtrado em quantidades variáveis, pelo fato de não serem mais necessários ao corpo. Tais produtos incluem creatinina (da creatina muscular), ureia (do metabolismo dos aminoácidos), ácido úrico (dos ácidos nucleicos), produtos finais do metabolismo da hemoglobina (bilirrubina) e metabólitos de vários hormônios sendo que, com a mesma velocidade em que são produzidos devem ser eliminados do organismo. Os rins também são responsáveis pela eliminação da maioria das toxinas e de outras substâncias estranhas. E, através desta função regulatória, os rins conseguem manter o ambiente das células estável o suficiente para realização de suas funções (COVIELLO, 2007; GUYTON, 2006).

Outras funções exercidas pelos rins são, dentre elas, regulação do equilíbrio de água e eletrólitos; regulação da pressão arterial; regulação da osmolalidade dos líquidos corporais e da concentração de eletrólitos; secreção, metabolismo e excreção de hormônios; regulação do equilíbrio ácido-base e gliconeogênese (GUYTON, 2006). Percebe-se, através das diversas funções exercidas pelos rins, que o mesmo é de fundamental importância para controle da homeostasia do organismo. Portanto, a manutenção funcional e estrutural de suas células tem uma relevância significativa e garante seu adequado funcionamento.

Das inúmeras funções renais, a medida da taxa de filtração glomerular (TFG) é aceita como a melhor quantificação do funcionamento renal (HOLLENBERG, 2004). A filtração glomerular é da ordem de 110 a 120 mL/min e corresponde à função de filtração de cerca de 2.000.000 de néfrons (glomérulos e túbulos renais) em indivíduos normais. A filtração se reduz em pacientes com insuficiência renal, podendo chegar, em casos avançados, até 5-10 mL/min quando o tratamento dialítico ou transplante renal se fazem necessários (COSTANZO, 2004). No organismo, a

consequência bioquímica dessa redução de função se traduz pela retenção de uma grande quantidade de solutos tóxicos geralmente provenientes do metabolismo protéico, que se elevam progressivamente, e podem ser avaliados indiretamente através das dosagens da uréia e creatinina plasmáticas (DANTAS, 2010).

As doenças renais, atualmente, assumiram uma importância global devido ao crescimento exacerbado no número de casos notificados. Essas doenças causam um aumento considerado na morbi-mortalidade, assim como, uso de terapias de alta complexidade, aumento nos custos do sistema de saúde, tanto privado como público (RAJAN et al, 2012).

As alterações renais mais significativas são lesão renal aguda (LRA) e lesão renal crônica (LRC). LRA tem uma evolução mais rápida e abrupta, enquanto a LRC possui uma evolução mais lenta, progressiva e irreversível, das funções tubular, endócrina e glomerular dos rins e, tem como principal característica a redução do filtrado glomerular em período de três meses ou mais (JHA; PARAMESWARAN, 2013; KO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2015). No Brasil, a prevalência e incidência da Doença Renal Crônica, aumentou de maneira significativa, o que representa um aumento de 2, 3 vezes em relação ao período de 2000 a 2012 (PEREIRA *et al.*, 2016).

LRA é mais prevalente em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos. Em todo o mundo, o número de casos de LRA está em cima de 13,3 milhões/ano, dos quais 11, 3 milhões estão presentes em países de baixa renda e envolve em mais de 1 milhão de mortes por ano (PONCE; BALBI, 2016).

Embora nos últimos anos tenha havido muitos avanços na clínica médica, ainda não há terapias adequadas e definidas para o tratamento da LRA, onde prevalece alta taxas de morbidade e mortalidade, além do aumento no tempo de hospitalização, causando uma sobrecarga nos custos dos sistemas de saúde (KUMAR, 2018).

Diversas complicações causam danos e danificam a estrutura e, também, diminuem a atividade funcional dos rins, desencadeando um estado clínico denominado, anteriormente, insuficiência renal aguda, que passou a ser chamada recentemente em Lesão Renal Aguda (LRA), que pode ocorrer na ausência de um fator desencadeante e pode ter caráter progressivo. Admite-se que com a redução inicial de um determinado número de néfrons, tornam-se hiperfiltrantes aqueles remanescentes e hipertrofiam, passam por alterações da superfície glomerular e alterações da permeabilidade da membrana glomerular às proteínas (DRAIBE, 2002).

Essas modificações geram produção de fatores de crescimento pelo rim, citocinas e hormônios, como IGF (*Insulin – like Growth Factor – I*), IL – 1 e IL – 6 (interleucinas 1 e 6), PDGF (*Platelet – Derived Growth Factor*), TGF – α e β (*Transforming Growth Factor – α e β*), TNF – α (*Tumoral Necrosis Factor – α*), fator Natriurético Atrial, endotelina, angiotensina II, entre outros. Tais agentes seriam responsáveis pelos processos de proliferação celular renal, recrutamento e proliferação de células imunitárias, coagulação intraglomerular, proliferação colágena e fibrose. A perda progressiva dos néfrons e da filtração glomerular são determinadas pela continuidade da presença de lesões fibróticas glomerulares e intersticiais (DRAIBE, 2002).

Estudos de Zanatta *et al.*, (2008) falam sobre as endotelinas, que são peptídeos vasoconstritores representados pela endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). A produção desses peptídeos ocorre em vários tecidos, onde atuam como moduladores do tônus vascular, produção hormonal e proliferação celular. Um importante órgão responsável pela produção de endotelina-1 é o rim, que por sua vez, também é alvo da ação da mesma. As principais células que produzem e sofrem ação de ET-1 são as células mesangiais, contudo também há produção de endotelina-1 pelas células epiteliais tubulares e glomerulares. A mesma é responsável por efeitos hemodinâmico nos rins, onde aumenta a resistência vascular renal devido a vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes e, também, das artérias arqueadas e interlobulares, conseqüentemente há decréscimo do fluxo sanguíneo, taxa de filtração glomerular e bloqueio da reabsorção de sal e água. A redução da taxa de filtração glomerular, que pode levar a natriurese, está relacionada a administração sistêmica de ET-1 (ZANATTA *et al.*, 2008).

A síndrome clínica LRA é comumente caracterizada por uma deterioração rápida das funções glomerular e tubular, onde relaciona-se com um declínio da taxa de filtração glomerular (TGF), que ocorre geralmente durante horas ou dias, e que resultam na retenção de compostos nitrogenados originados dos processos metabólicos orgânicos, como ureia e creatinina. Outras demonstrações laboratoriais e clínicas que incluem alteração do volume de líquido extracelular e redução ou perda dos essenciais mecanismos reguladores eletrolíticos (SINGH *et al.*, 2012), apresentando como causas frequentes a isquemia e a nefrotoxicidade, além do envelhecimento da população mundial e aumento da co-morbidades que são fatores de risco prevalentes para

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

Nessa conjuntura, LRA é uma doença complexa e frequente em pacientes internados. Maior tempo no leito hospitalar e terapias de alto custo são resultados do impacto dessa doença, que causam retardo no processo de recuperação e exposição a sobrecarga circulatória, hipercalemia, complicações neurológicas, acidose metabólica e aumento do risco de mortalidade (CHAWLA *et al.*, 2011).

LRA é considerada uma das complicações mais importantes em pacientes hospitalizados, sendo sua incidência relacionada às condições clínicas dos pacientes, maior número ocorrendo em pacientes na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) (20-40%), e em menor quantidade em unidades intermediárias (1-7%). A elevada taxa de mortalidade em LRA ocorre devido a algumas condições, particularmente, a não identificação de fatores de risco, o tardio diagnóstico da doença ou o desconhecimento dos aspectos associados à mortalidade. Os pacientes internados em UTI que evoluem para LRA possuem uma incidência variável entre 17% a 35% e desses, 49% a 70% necessitam de tratamento dialítico (SANTOS, 2013).

Apesar da capacidade da recuperação renal em pacientes que sofreram LRA, há comprometimento da sobrevida à longo prazo, na qual eleva-se o risco de desenvolver lesão renal crônica, doença cardiovascular e morte (COCA *et al.*, 2009).

Segundo LAMEIRE *et al.*, (2013) fatores de risco comuns e importantes como redução da TFG, proteinúria e depleção de volume são características a pré-existência de LRA. Outros fatores que podem contribuir para manutenção do quadro de LRA são cirurgia vascular, hipovolemia, aterosclerose, diuréticos, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes mellitus, isquemia/reperfusão, cirurgia biliar, dentre outros (SINGH *et al.*, 2012).

A primeira tentativa de criar uma definição internacional sobre os achados clínicos na LRA, foi em 2002, através da classificação de LRA segundo critérios abreviados como RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage*) (Tabela 1). A classificação é realizada considerando os três estágios de severidade (*Risk, Injury, Failure*), referindo-se a critérios de determinação da gravidade e diagnóstico da LRA, considerando-se aumento da creatinina sérica e produção de urina, bem como nos dois estágios finais (*Loss, End- Stage*), relacionando-se critérios de evolução clínica do paciente e são determinados pelo prolongamento da perda da função renal (KELLUM, 2011).

Três graus de severidade da LRA (*Risk, Injury, Failure*) são abordados pelo critério RIFLE, baseados em alterações de creatinina sérica e produção de urina. Mais estágios da patologia tidos como finais (*Loss, End-stage*) ainda são de grande relevância. O critério RIFLE foi aprimorado pelo critério AKIN o tornando mais sensível e específico levando em consideração, menores mudanças nos valores de creatinina sérica ($\geq 0,3\text{mg/dl}$) e o volume urinário em um período de 48 horas (KIDGO, 2012; LUO *et al.*, 2014). Além disso, o critério KIDGO leva em consideração três etapas separadas da LRA de acordo com as mudanças na produção de urina e nos níveis basais de creatinina sérica (ULGER *et al.*, 2017).

Nas tabelas 1, 2 e 3 seguem os critérios para classificação de LRA de RIFLE, AKIN e KDIGO.

Tabela 1 - Critérios de RIFLE para classificação da LRA

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

*End-stage kidney disease*Estágio final da doença renal >
3 meses

Fonte: adaptado de KIDGO (2012).

Tabela 2 - Critérios de AKIN para classificação da LRA

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

Fonte: adaptado de KIDGO (2012).

Tabela 3 - Critérios segundo KDIGO para classificação da LRA

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

Fonte: adaptado de THOMAS et al., (2014).

Com o objetivo de aumentar sensibilidade e especificidade do diagnóstico, caracterizou-se a LRA como redução abrupta da função renal (dentro de 48 horas) seguido do aumento absoluto de 0,3 mg/dL no nível de creatinina sérica e pela redução da produção de urina (MEHTA *et al.*, 2007). Devido a essas iniciativas, foi proposto substituir o termo Insuficiência Renal Aguda por Lesão Renal Aguda, buscando enfatizar o estado clínico total do paciente, que incluem a presença progressiva de estágios de lesão tecidual até a perda da função renal e implantação da doença (MEHTA *et al.*, 2007; KELLUM *et al.*, 2011).

De acordo com os mecanismos básicos que levam a disfunção renal classifica-se LRA em três grupos: LRA pré-renal, LRA renal, LRA pós-renal. LRA é considerada pré-renal nos casos em que há funcionamento íntegro do rim, mas há redução da perfusão sanguínea que chega até ele. Hipovolemia aguda é responsável pela hipoperfusão renal que ocorre, por exemplo, em casos de desidratação por perdas gastrointestinais ou hemorragia grave (HORKAN *et al.*, 2015).

Necrose tubular aguda (NTA) é a principal característica de uma LRA renal, apesar de haver outras alterações sutis que são vistas apenas com ajuda de microscopia eletrônica. Lesões de cristas mitocondriais, condensação de cromatina nuclear e vacuolização citoplasmática são exemplos de tais alterações que possam existir (MENKE *et al.*, 2014). Fatores intrínsecos (renal) que desencadeiam a LRA classificam-se de acordo com o principal local afetado (túbulos, interstício, vasos ou glomérulos) que é a segunda modalidade comum de LRA depois da pré-renal (COSTA *et al.*, 2003; HUMPHREYS *et al.*, 2005).

A interrupção do fluxo urinário devido a obstrução do trato urinário, como ocorre em condições de cálculo renal e hipertrofia prostática são as principais causas de LRA pós-renal. Nesta patologia, a grande relevância do diagnóstico é a reversibilidade da insuficiência renal devido ao tratamento correto sendo feito mais precocemente possível (HUMPHREYS *et al.*, 2005). Entretanto, se o período do processo obstrutivo for muito longo, pode haver evolução para NTA ou haver uma difícil recuperação (KIDGO, 2015; KELLUM, 2008).

1.2 Fisiopatologia da disfunção endotelial

Através de múltiplas funções, o endotélio vascular que reveste as paredes internas dos vasos, mantém a homeostasia do microambiente, há a troca de nutrientes,

vasodilatação e reações de defesa do hospedeiro. Apresenta-se como uma única camada de células, responsável por alinhar o lúmen e manter a estrutura da parede dos vasos sanguíneos (MEHTA; MALIK, 2006).

O endotélio age como uma barreira entre os compartimentos intravascular e extravascular, permitindo interação com células e componentes do sangue circulante, assim como, com as células nas paredes do vasos e isso, se deve ao fato de estarem em uma posição anatômica. As células endoteliais são longas e planas orientadas ao longo do eixo dos vasos e são constituintes predominantes do endotélio desses vasos. Uma célula endotelial possui 10-15 μ M de largura, 20-40 μ M de comprimento e somente 0.1-0.5 μ M de espessura (CAHIL; REDMOND, 2016; SUN *et al.*, 2016).

Algumas funções são mediadas pelas células endoteliais, como: manutenção da fluidez sanguínea, modulação do tônus vascular, regulação da inflamação e resposta imune e a neovascularização. Um complexo evento fisiopatológico está envolvido no comprometimento do endotélio que insere tanto o aumento da ativação das células endoteliais como o início da disfunção dessas células (INCALZA *et al.*, 2017).

O dano endotelial é complementar a uma variedade de estímulos, que resulta na perda da integridade endotelial, disfunção da barreira e regulações atípicas de vasodilatação e vasoconstricção, conduzindo à alterações do ambiente vascular. Ocorrendo essas alterações, haverá mudanças na hemodinâmica vascular, que afeta perfusão de órgãos, resultando na ocorrência de eventos cardiovasculares e alta incidência de mortalidade (ZHANG *et al.*, 2017).

A perda da função endotelial é determinada por estresse oxidativo, adesão de leucócitos, resposta inflamatória, ativação plaquetária e trombose em doenças cardiovasculares, ocasionando o desenvolvimento de aterosclerose, diabetes e hipertensão (SUN *et al.*, 2016). Tal disfunção está agregada ao envelhecimento, síndrome coronária, à insuficiência renal, microalbuminúria, hiperglicemia, obesidade, trombose, inflamação, vasculite, sepse, artrite, dentre outras patologias (FELETOU; VANHOUTTE, 2006).

A microvasculatura renal tem um importante papel na fisiopatologia da LRA. Para controlar a homeostasia se faz necessário a produção de trifosfato de adenosina (ATP) mitocondrial a partir de O₂, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs). Há o comprometimento da microcirculação quando ocorre uma lesão, ocasionando um desequilíbrio na fonte de NO, O₂ e EROs, desencadeando hipóxia e estresse oxidativo. Um processo inflamatório é gerado pela lesão ao endotélio

microvascular, provocando aumento da permeabilidade vascular, comprometimento do fluxo sanguíneo, edema intersticial, resultando em hipóxia e fibrose renal (ZUK; BONVENTRE, 2016).

A redução da capacidade de dilatação que, muitas vezes, é relacionada a diminuição da produção de óxido nítrico, caracteriza de certa forma, a disfunção endotelial (BASILE; YODER, 2014). Essa diminuição de óxido nítrico pode ocorrer devido à lesões que acometem o endotélio que, muitas vezes, são ocasionadas por isquemia e reperfusão.

1.3 Isquemia e reperfusão

Define-se isquemia como uma redução do fluxo arterial ou ausência do mesmo que acarreta uma redução ou ausência de oxigênio que é essencial para manutenção das funções dos tecidos. Além disso, ocorre diminuição do aporte de nutrientes, proteínas, vitaminas e bem como acúmulo de metabólitos. Dessa forma, eventos isquêmicos constituem um dos mais relevantes problemas enfrentados pela medicina, como oclusão arterial aguda, infarto agudo do miocárdio, insuficiência vascular periférica e no procedimento realizado para transplante de órgãos (MAXWELL, 1997; HARRIS *et al.*, 2015).

Quando o fluxo arterial é insuficiente para manter a vida celular a isquemia pode ser total; e se mantém a viabilidade é considerado parcial. Porém, dependendo da nobreza do tecido pode evoluir para morte celular, além de ser importante considerar o tempo de duração da isquemia, demanda metabólica dos tecidos que foram atingidos e da ausência de circulação colateral compensatória (BLANTZ *et al.*, 2007). Complementarmente, no rim o processo isquêmico caracteriza-se pela diminuição do fluxo sanguíneo renal, redução do coeficiente de ultrafiltração renal, decréscimo da filtração glomerular e dano do epitélio tubular (DITONNO *et al.*, 2013).

Células do túbulo proximal envolvem-se em muitas das lesões isquêmicas, que estão diretamente relacionados a ativação dos principais mecanismos fisiopatológicos que levam à perda da TFG durante a LRA. Os principais alvos de dano isquêmico nas regiões do rim são o segmento proximal e o ramo ascendente espesso medular da alça de Henle (WALKER e ENDRE, 2008).

Oxigênio e NADPH diminuem durante a isquemia o que promove, conseqüentemente, redução da produção de óxido nítrico. Com a reperfusão há um aumento rápido e limitado da produção de NO, devido a entrada de cálcio para as células, estimulando a ação da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial). O aumento da disponibilidade de L-arginina proporciona a produção rápida de NO, porém em pequena quantidade. Mesmo com aumento da dose de L-arginina, não há efeito significativo para produção de NO. Tal fato é explicado devido uma provável saturação da eNOS e, também, pela degradação da L-arginina pela ação da arginase (SHAH *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2001).

O estabelecimento da LRA está intimamente relacionado a reperfusão das áreas isquêmicas, podendo gerar um dano maior do que aquele causado pela isquemia (ABELA *et al.*, 2003). O processo inflamatório iniciado pela isquemia exacerba-se com a reperfusão, gerando um infiltrado no qual predominam leucócitos mononucleados e onde, também, há liberação de várias citocinas que causam o estímulo das moléculas de adesão (ICAM- moléculas de adesão intracelular) e selectinas, principalmente, que são responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular, proporcionando um aumento da inflamação (BONVENTRE *et al.*, 2004).

Desse modo, a lesão por isquemia/reperfusão (I/R) é definida como todas as mudanças que ocorrem após a interrupção e re-estabelecimento do fornecimento de oxigênio aos tecidos e órgãos. Pelo fato da isquemia iniciar uma lesão por mecanismo de supressão de energia necessária para manter o gradiente iônico e homeostase celular, a medida que ocorre a reperfusão tem-se uma piora dessa lesão, intensificando as reações inflamatórias (COSTA, 2013).

Nessa conjuntura, substâncias que possuem ações vasodilatadoras, promovem na fase inicial, uma melhora no fluxo sanguíneo e na oxigenação renal e, conseqüentemente, há preservação da função renal ou a atenuação dos efeitos danosos (HOOSGOOD *et al.*, 2014).

1.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) constitui um mediador ubíquo que apresenta inúmeras funções, além de ser uma molécula sinalizadora chave nos sistemas nervoso e cardiovascular. Essa molécula se forma através de uma reação que é catalisada por uma enzima, reação essa entre o oxigênio molecular e a L-arginina. Furchgott & Zawadzki

descobriram uma função fisiológica do NO no sistema vascular, demonstrando que o óxido nítrico era responsável pelo fator de relaxamento (RANG *et al.*, 2016).

O NO é responsável pela ativação endógena da guanilil ciclase solúvel, onde há formação de GMP cíclico (GMPc) o qual constitui um segundo mensageiro de grande relevância em muitas células. O NO possui uma característica em particular de ter alta afinidade pelo heme e outros grupos ferro-enxofre. Essa propriedade é de grande importância para ativação da guanilil ciclase (RANG *et al.*, 2016).

Para controle da biossíntese do NO existem as enzimas óxido nítrico sintase (NOS). As três isoformas conhecidas são: (iNOS ou NOS-II uma forma induzível) e duas formas constitutivas (eNOS ou NOS-III; nNOS ou NOS I) que estão presentes no endotélio em condições fisiológicas. A eNOS faz-se presente em miócitos cardíacos, células mesangiais, epitélio respiratório e osteoblastos, não restringindo-se somente ao endotélio. Pequenas quantidades de NO são produzidas pelas enzimas constitutivas, enquanto há uma alta produção pela iNOS devido a sua alta atividade, além de ser muito abundante em estados não patológicos associados à liberação de citocina. A atividade da iNOS é independente da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), em contraste com as isoformas constitutivas. Assim a iNOS encontra-se completamente ativada mesmo com baixos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ presentes em repouso (RANG *et al.*, 2016).

A indução da forma induzível pode ser inibida por glicocorticoides e por várias citocinas, onde inclui fator de transformação de crescimento- β . Mesmo em baixas concentrações de ânion superóxido, há reação rápida com NO, produzindo o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), no qual é responsável por alguns dos seus efeitos tóxicos. A afinidade do heme pelo NO é 10.000 vezes maior do que pelo oxigênio. A ligação do NO ao heme possui razoável estabilidade mesmo na ausência de oxigênio. Porém, com oxigênio presente, o NO converte-se em nitrato e o ferro hêmico oxida-se a metemoglobina. NO derivado do endotélio possui ação local sobre a musculatura lisa vascular subjacente ou sobre os monócitos ou plaquetas aderentes (RANG *et al.*, 2016).

Um dos efeitos mais significativos do óxido nítrico baseia-se na ativação da guanilil ciclase solúvel, que por sua vez é responsável pela síntese do segundo mensageiro GMPc. Através da combinação com seu grupo heme, o NO ativa a enzima, e mesmo em baixas concentrações de NO, muitos efeitos fisiológicos são mediados pelo GMPc. Independente de NO, a guanilil ciclase contém um outro sítio regulatório, que é ativado por uma série de fármacos experimentais (RANG *et al.*, 2016).

Através da enzima fosfodiesterase os efeitos do GMPc são finalizados. Sildenafil e tadalafila são fármacos de relevância para tratamento de disfunção erétil, uma vez que são inibidores da fosfodiesterase. Por meio de sua química como radical livre, altas concentrações de NO são responsáveis por seus efeitos citotóxicos e/ou citoprotetores. A via L-arginina/NO, reduz resistência vascular periférica e, por sua vez a pressão arterial sistêmica, devido a sua ação tonicamente ativa nos vasos de resistência (RANG *et al.*, 2016).

O óxido nítrico na função renal exerce uma importante função de modular a TFG, porém não é mediador direto. A produção de NO na mácula densa através da ativação de nNOS é capaz de atenuar a constrição da arteríola eferente. A falta dessa ação, resulta em vasoconstrição, retenção de sódio e água causando hipertensão arterial sistêmica (HAS). Demonstrou-se, através de estudos, que NO está envolvido na adaptação renal, na resposta de dietas em diferentes concentrações de sódio, facilitando a excreção de sódio e proporcionando a manutenção da pressão arterial normal. Esses fatos ocorrem devido a mudanças na expressão de nNOS na mácula densa, entretanto a restrição de sódio na dieta aumenta sua expressão na mácula densa e no córtex e, uma dieta rica em sódio reduz a expressão (LEE, 2008).

O NO possui uma ação inibitória sobre a reabsorção tubular de sódio, repercutindo no aumento da excreção urinária, água e solutos. Podem haver variações em diferentes segmentos do néfron dos efeitos do NO no transporte tubular. A atuação inibitória do NO sobre a reabsorção tubular de sódio no túbulo proximal está relacionado ao decréscimo apical da troca de Na^+/H^+ e diminuição da atividade da Na^+/K^+ ATPase. No ramo ascendente da alça de Henle, o NO reduz absorção de sódio por inibir $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ e impede a reabsorção de bicarbonato pela diminuição da atividade de Na^+/H^+ (LEE, 2008).

Na natriurese pressórica, o óxido nítrico está envolvido como mediador da excreção de sódio que ocorre em consequência ao aumento da pressão da artéria renal. A síntese de NO é estimulada pelo aumento da pressão de perfusão, resultado do acréscimo do "shear stress" nas células endoteliais, e a proporção de excreção urinária de nitrito se correlaciona positivamente com a excreção de sódio, marcando assim um aumento da atividade local do NO (LEE, 2008).

O sistema nervoso simpático possui uma ação fundamental na regulação da hemodinâmica renal e homeostase de sódio. O efeito vasoconstritor simpático pode ser diminuído pela síntese de NO. O óxido nítrico medeia o aumento da reabsorção tubular

proximal de sódio, ocorrendo com a estimulação do sistema simpático, exercendo uma função rara, pois nessa condição o NO realiza a absorção de sódio (LEE, 2008).

Vasodilatadores são fármacos que atuam sobre o músculo liso vascular ou sobre o endotélio vascular adjacente para reduzir o tônus vascular. Eles agem, em sua maioria, diminuindo a contratilidade dos complexos actina-miosina nas células musculares lisas vasculares. Existem diversas categorias de vasodilatadores. Os doadores de NO farmacológicos como: nitratos orgânicos e nitroprussiato de sódio, causam vasodilatação ao ativar a guanilil ciclase, logo, aumentam a desfosforilação das cadeias leve de miosina (GOLAN *et al.*, 2014).

Os nitratos orgânicos são quimicamente reduzidos e liberam óxido nítrico no organismo que é um gás capaz de se dissolver nos líquidos biológicos e membranas celulares. Reage diretamente com diversas biomoléculas, englobando o heme presente na guanilil ciclase. O NO é uma molécula de sinalização endógena responsável pelo relaxamento do músculo liso vascular. Embora tenha capacidade de dilatar tanto artérias como veias, a dilatação venosa predomina em doses terapêuticas. A capacitância venosa é aumentada pela venodilatação causada pelo NO, resultando em uma diminuição do retorno do sangue ao lado direito do coração e, conseqüentemente, redução da pressão e volume diastólicos finais do ventrículo direito e esquerdo. Concentrações mais altas de nitratos orgânicos podem causar vasodilatação arterial (GOLAN *et al.*, 2014).

1.5 Metalofármacos: aspectos químicos e perspectivas terapêuticas

Ao longo dos anos, compostos contendo íons metálicos são utilizados com grande relevância no tratamentos de diferentes doenças e, sabe-se que a utilização dos mesmos é feita há cerca de 5000 anos (ORVIG *et al.*, 1999). Pelo fato de muitos desses compostos apresentarem metal em sua estrutura e, possuírem propriedades farmacológicas, os mesmos são conhecidos como metalofármacos (RANG *et al.*, 2007; SILVA, 2010). Utilizam-se, geralmente, metais de transição, pelo fato de apresentarem características importantes como: várias possibilidades de geometria, diversas estruturas e acessíveis estados de oxidação em meio fisiológico (BERALDO, 2005; REISNER *et al.*, 2008; RIJIT *et al.*, 2009).

Em 1965, com a descoberta da atividade antitumoral da cisdiaminodicloroplatina (II), a cisplatina, pelo físico Barnett Rosemberg, verificou-se

um impulso na medicina no que diz respeito à investigação sistemática de complexos para uso em doenças relevantes (ROSEMBERG *et al.*, 1965). Esse composto também foi usado no tratamento de outros tipos de câncer, tais como pulmão, ovário, esôfago e estômago (SYKES, 1988). Entretanto, mesmo com a atividade anticancerígena relevante da cisplatina, sua utilização é um fator limitante devido a toxicidade renal. Dessa forma, os medicamentos à base de cisplatina tem uso restrito, pela toxicidade, bem como pelos efeitos adversos que podem causar como: náuseas severas, diminuição da produção de células na medula óssea e os danos associados à toxicidade (SYKES, 1988).

A busca por novos metalofármacos, principalmente na terapia do câncer, intensificou-se após a descoberta da cisplatina. Nessa conjuntura, destacam-se alguns compostos metálicos derivados de rutênio que devido a sua atividade antitumoral superior à platina e são bem promissores na interação com DNA, por exemplo (CLARKE *et al.*, 1980; MESTRONI *et al.*, 1987), além da suas propriedades compatíveis com uso medicinal (CLARKE, 2002). Dentre essas características, pode-se citar: possui a capacidade de permitir até seis sítios de coordenação (geometria octaédrica), diferentes estados de oxidação (II,III) com estabilidade sob condições fisiológicas, baixa toxicidade e tem uma semelhança com o elemento ferro no quesito metabolismo em sistemas biológicos (CLARKE, 2002; CRAVER *et al.*, 2010). Nos últimos anos, ocorreu um avanço significativo no desenvolvimento de novos fármacos, sejam eles inorgânicos ou metalo-orgânicos, demonstrado pelo aumento do número de publicações na área (FRICKER, 2007).

Para o desenvolvimento ou modificação de fármacos, há muitas vantagens na utilização de metais, dentre essas podemos citar o variável número de coordenação e geometrias, acessibilidade a diferentes estados redox, características termodinâmicas e cinéticas particulares, bem como as propriedades intrínsecas dos cátions metálicos e seus ligantes que, por vezes, são significativamente alteradas quando formado o complexo metálico (BRUIJNINCX & SADLER, 2008; HAMBLEY, 2007; MEGGERS, 2009).

Um fator que determina a atividade biológica é a troca de ligantes e poucos metalofármacos sem sofrerem modificação conseguem atingir os alvos biológicos. Complexos de Ru(II) e Ru(III) possuem uma cinética de troca de ligantes semelhantes aos compostos de Pt(II), em um intervalo, aproximadamente, de 10^{-2} a 10^{-3}s^{-1} . Para

impulsionar as propriedades terapêuticas propostas dos complexos algumas interações são de grande relevância, como a cinética de troca de ligantes do rutênio que está na escala de tempo da reprodução celular (mitose), levando a concluir que se houver uma interação do rutênio com algum componente celular, possivelmente a ligação continuará durante o tempo de vida celular (ALLARDYCE & DYSON, 2001).

Em 1950, foram reportados os primeiros estudos e atividades biológicas do complexo de rutênio (DWYER *et al.*, 1952; BERGAMO *et al.*, 2007). A química dos complexos de metal nitrosilos, tornou-se significativa devido ao papel importante envolvendo metal de transição nos processos biológicos de NO, bem como o papel de produzir espécies termodinamicamente lábeis e cineticamente estáveis (FORD; WINK; STANBURY, 1993; WINK *et al.*, 1993). O NO e os doadores de NO são conhecidos por bons ativadores de GCs. Exemplos de fármacos que funcionam como doadores de NO incluem: minoxidil, nitroglicerina, nitroprussiato de sódio e os S-nitrosilados (BRIONI *et al.*, 2002). A prospecção de compostos nitrosilados com metais de transição tem surgido como perspectiva para formação de agentes liberadores de NO e, em particular, na liberação redutimétrica de NO em alvos biológicos, concernente ao relaxamento da musculatura lisa vascular, a GCs é um importante alvo. Devido a disfunção endotelial que ocorre em diversas patologias, os doadores de NO foram desenvolvidos para suprir a deficiência existente. Porém, relata-se uma tolerância aos nitratos orgânicos. Portanto, fármacos capazes de ativar GCs de maneira NO-independente foram desenvolvidos para superar o problema da tolerância advindo dos nitratos (PRIVIERO; WEBB, 2010).

Pelo fato dos compostos de rutênio possuírem menor toxicidade, quando comparado com os de platina, atribui-se esse fato devido à capacidade de mimetizar o ferro na ligação a várias moléculas biológicas, espera-se que sejam melhores carregadores de NO. A alta afinidade de rutênio com NO é a característica principal da química desse composto, devido a comprovação de ser um doador de NO por estimulação externa. Esse fato favorece o grande investimento em estudos dos complexos de rutênio em comparação com medicamentos doadores de NO, aliado a vantagem de NO ser lançado em alvo específico (LUNARDI; SILVA; BENDHACK, 2009).

Além de oferecerem maior vantagem em sua síntese quando compara-se com compostos de ferro (BUTLER *et al.*, 2003; TORSONI *et al.*, 2002; WEE; DYSON,

2006). O rutênio é o elemento que mais forma complexos nitrosilo (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005). A habilidade dos complexos de rutênio com ligante nitrosilo tem despertado muito interesse no estudo de suas propriedades visando uma aplicabilidade clínica, uma vez que, atuam como captadores ou liberadores de NO, e por consequência possivelmente atuarem como fármacos no tratamento de várias patologias como, por exemplo na hipertensão arterial (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005). Além do que, os complexos metálicos contendo íon nitrosilo (NO^+) estão sendo estudados *in vitro* em tratamentos de doenças como: doença de Chagas e leishmaniose (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; VALDEZ *et al.*, 2008).

Devido ao conhecimento das propriedades farmacológicas dos complexos de rutênio com ligante nitrosilo, diversos compostos foram desenvolvidos, assim como estudados, dentre eles existe a colaboração que foi feita com o Prof. Dr. Luiz G. de França Lopes, que vem sintetizando, caracterizando e estudando, ao longo dos últimos anos, os complexos de rutênio que possuem íon nitrosilo em sua esfera de coordenação.

Para a confecção de complexos com efeitos biológicos desejáveis, o controle da velocidade de liberação de NO através da modificação na estrutura do composto (ou seja: na esfera de coordenação) pode ser de grande relevância. Dessa forma, a síntese desses complexos nitrosilos de rutênio com esta finalidade e suas devidas propriedades biológicas têm sido alvo de teste como é o caso dos complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$ e do $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Cl})(\text{Cyclam})]^{2+}$ sintetizada por Tfouni e colaboradores (TFOUNI *et al.*, 2003) e dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2-(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)]$ e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})(\text{NO})(\text{PF}_6)]$ sintetizados pelo grupo de Lopes e colaboradores (SILVA *et al.*, 2006).

Os complexos nitrosilos de rutênio doadores de NO, há alguns anos, vem sendo testados em diversos sistemas. Bonaventura e seus colaboradores, em 2007, demonstraram, utilizando aorta de rato, potente efeito relaxante no endotélio vascular por parte deste grupos doadores de NO (BONAVENTURA, *et al.*, 2007). Observou-se um relaxamento significativo no tecido carvenoso animal e humano, por Cerqueira 2008, utilizando o composto Rut-caf (CERQUEIRA, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Diversos distúrbios na via do óxido nítrico (NO) têm sido descritos em patologias renais, incluindo a doença renal crônica (DRC) e nas injúrias renais agudas (IRAs), como na nefropatia induzida por meios de contraste, por antibióticos aminoglicosídeos e, em especial, por isquemia/reperfusão (I/R) (LEE *et al.*, 2016).

No contexto da IR, o déficit de NO se dá pelo desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), principal enzima responsável pela produção basal de NO no organismo (ROBERTS *et al.*, 2012). Isso se deve ao fato de a eNOS está ancorada de maneira estratégica a membrana da célula endotelial, que facilita a presença de grandes quantidades de NO próximo à camada muscular do vaso e às células sanguíneas circulantes (DUSSE *et al.*, 2003). Ao mesmo tempo, a lesão mitocondrial gerada na fase isquêmica leva ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que reduz os efeitos biológicos promovidos pelo NO (ARAÚJO; MAGALI, 2006).

Por conseguinte, a queda na biodisponibilidade e na resposta ao NO, leva a modificações na hemodinâmica renal, promovendo vasoconstricção córtico-medular, que por sua vez exacerba a lesão nos néfrons, acentuando o processo inflamatório e o desequilíbrio do balanço redox nos néfrons. Nesse sentido, agentes terapêuticos que atuam como doadores de NO ou que promovem ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) têm apresentado perfil nefroprotetor em modelos experimentais de LRA animais (INCE, 2014).

No contexto de fármacos que estimulam a produção de NO, existem ainda poucos compostos que, efetivamente, estimulam/ativam a enzima GCs (EVGENOV, 2006). Além disso, alguns efeitos adversos têm sido descritos, sendo o principal deles a instabilidade hemodinâmica, devido à redução considerável da pressão arterial, que encontra-se previamente reduzida em muitos pacientes com LRA causada por IR (ROBERTS *et al.*, 2012). Cefaleia, hipotensão postural e metemoglobinemia são outros efeitos causados por nitratos orgânicos (MICHEL; HOFFMAN, 2011). E também, devido a da anulação dos efeitos desejáveis dos nitratos, através das respostas compensatórias do sistema nervoso simpático e respostas renais compensatórias. Os mecanismos de tolerância fisiológica e farmacológica dos nitratos orgânicos são de

grande relevância clínica, uma vez que limitam a eficácia dessa classe de vasodilatadores (GOLAN *et al.*, 2014).

Nesse sentido, os metalofármacos, substâncias metálicas capazes de atuarem como doadores de NO aparecem como uma potencial alternativa terapêutica no tratamento de doenças por acometimento do endotélio vascular. Entre estes fármacos, nitrosilo complexos de rutênio apresentam vantagens em relação aos que apresentam outros metais, devido à baixa toxicidade do rutênio (ALLARDYCE; DYSON, 2001). Entre os compostos metálicos contendo íon nitrosilo (NO^+), $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})\text{PF}_6$ (FOR0810) demonstrou atividade protetora na IR cerebral, bem como em lesões gástricas induzidas por naproxeno e etanol. Estes efeitos foram atribuídos redução da inflamação e do estresse oxidativo (CAMPELO *et al.*, 2011; SANTANA *et al.*, 2015).

Dessa forma, na perspectiva de fornecer uma nova alternativa terapêutica no contexto das patologias renais, o presente estudo buscou investigar as ações renais e citotóxicas do FOR011B e FOR811B.

Essa pesquisa é a primeira evidência experimental utilizando os complexos de rutênio (*cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ETU}) \text{Cl}]^+$ (FOR011B) e (*cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ETU})(\text{NO})]^{3+}$ (FOR811B).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos renais dos complexos de rutênio FOR011B e FOR811B em modelo de rim isolado de rato e isquemia/reperfusão *in vitro* na busca de um novo agente terapêutico.

3.2 Objetivos específicos

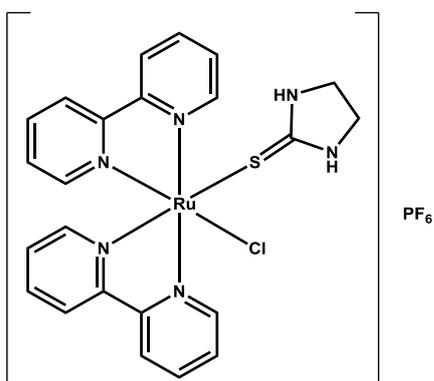
- Avaliar os efeitos dos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre os parâmetros funcionais renal no protocolo experimental de rim isolado;
- Verificar os efeitos dos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre a viabilidade de células LLC-MK2 *in vitro* pelo ensaio do MTT;
- Avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial dos efeitos dos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre isquemia/reperfusão (I/R);
- Determinar os efeitos dos metalofármacos FOR011B e FOR811B através da determinação de nitrito/nitrato e glutatona reduzida em tecido renal;
- Verificar os efeitos dos metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre o GMPc urinário por teste de Elisa nos rins submetidos a perfusão renal;
- Analisar os efeitos dos metalofármacos FOR011B e FOR811B através da histologia dos rins perfundidos no experimento de perfusão do rim isolado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese do complexos de rutênio

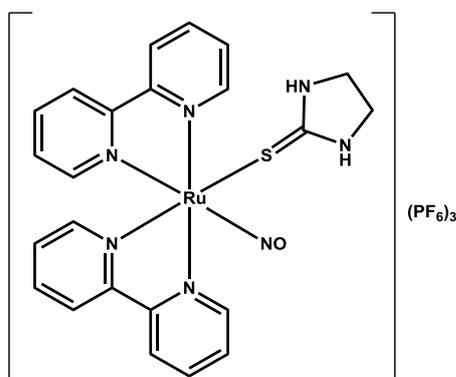
Os compostos de rutênio, (*cis*- [Ru(bpy)₂(ETU) Cl]⁺ representado pela sigla FOR011B e o composto complexo com a molécula de NO, (*cis*- [Ru(bpy)₂(ETU) (NO)]³⁺ representado por FOR811B, foram sintetizados no laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, de acordo com técnica descrita por Gouveia-Júnior (2017). As propostas estruturas planas dos compostos estão representadas nas figuras 1 e 2.

Figura 1 – Estrutura plana do complexo de rutênio (*cis*- [Ru(bpy)₂(ETU) Cl]⁺(FOR011B).



Fonte: Gouveia-Júnior (2017).

Figura 2 – Estrutura plana do nitrosil complexo de rutênio (*cis*- [Ru(bpy)₂(ETU)(NO)]³⁺(FOR811B)).



Fonte: Gouveia-Júnior (2017).

4.2 Animais de Experimentação

Para os ensaios biológicos foram utilizados ratos Wistar machos, em idade adulta, pesando entre 280 e 320 g provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC).

Os animais foram devidamente acondicionados em sala aclimatada à temperatura de 23° C, com estantes apropriadas e circulação de ar. Os animais permanecerão sob o ciclo claro-escuro de 12/12h com água e ração à vontade, em ambiente de microisolamento no biotério supracitado.

4.3 Aspectos éticos

Todos os modelos experimentais envolvendo animais empregados neste projeto foram previamente encaminhados para aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará. Os cuidados com os animais de experimentação estavam de acordo com o Guia para Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH, publicações 85-23, revisado em 1996) e com regulamentação brasileira recentemente aprovada.

O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob o número de protocolo 102/2016.

4.4 Perfusão Renal em Modelo de Rim Isolado de Rato

4.4.1 Sistema utilizado

O sistema utilizado consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de 37 °C. Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina (fração V, 6g%) na solução perfusora. A oxigenação é proveniente de uma mistura carbogênica de O₂/CO₂ (95:5) adaptada ao sistema, e o perfusato recircula no rim com uma quantidade de 100 mL de solução Krebs-Hanseleit modificada. (MONTEIRO, 1980; FONTELES *et al.*, 1983; JORGE, 2013).

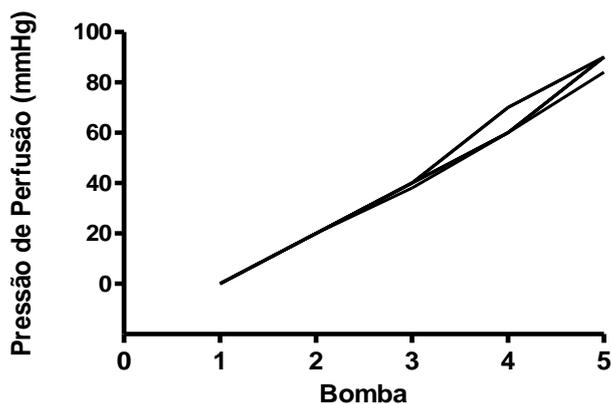
4.4.2 Calibração do sistema

Antes do início de cada experimento, o sistema foi limpo, montado e calibrado. A calibração sempre foi feita com o sistema em funcionamento e com solução de cloreto de sódio à 0,9%, com a temperatura a 37°C, averiguando durante a calibração qualquer vazamento ou obstrução do fluxo.

A calibração ocorre com a solução de cloreto de sódio à 0,9% circulando pelo sistema e sendo coletada por um minuto em uma proveta milimetrada. Esse procedimento foi feito com o objetivo de verificar o fluxo de perfusão frente à resistência do próprio sistema (cânula arterial), avaliou-se em cada uma das bombas (1, 2, 3, 4 e 5) a Pressão de Perfusão (mmHg), o volume de solução (NaCl 0,9%) (mL/min) e o valor registrado pelo Fluxômetro (L/h).

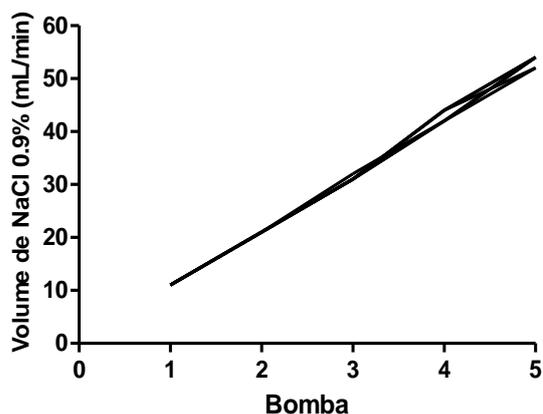
As figuras 3, 4 e 5 mostram as curvas de calibração com suas respectivas plotagens.

Figura 3- Valores de Pressão de Perfusão (mmHg), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6)



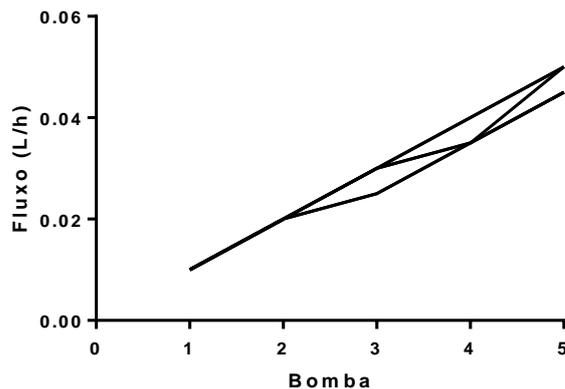
Fonte: LAFAVET- UFC

Figura 4- Valores de Volume de NaCl 0,9% (mL/min), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6)



Fonte: LAFAVET- UFC

Figura 5- Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h), relacionados à velocidade da bomba, durante a calibração do sistema (n=6)



Fonte: LAFAVET- UFC

4.4.3 Solução Perfusora

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

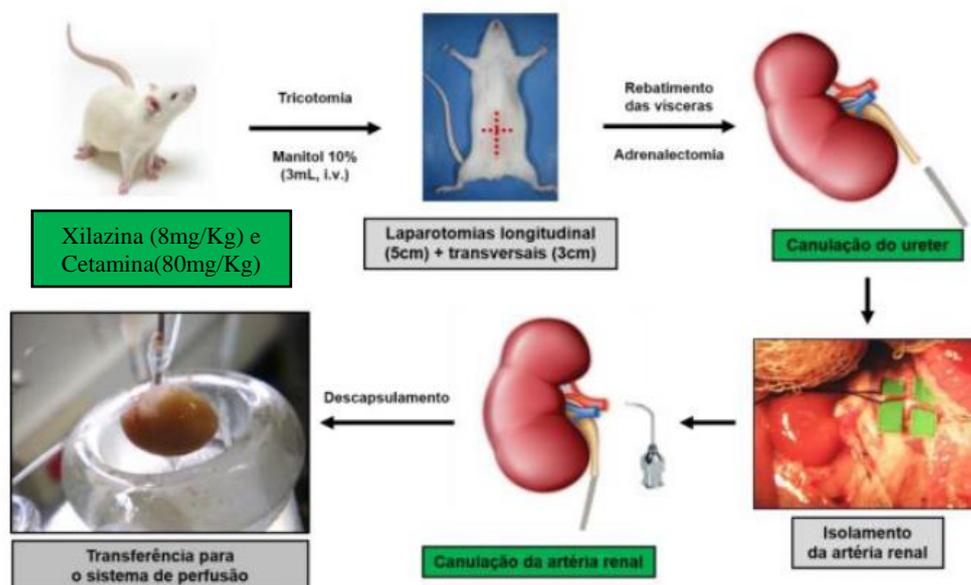
A solução de Krebs-Henseleit modificada para diálise foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, acrescentou-se 0,15g de inulina à solução perfusora. O pH da solução perfusora foi ajustado entre os valores de 7,3 a 7,4.

4.4.4 Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com Xilazina (8 mg/Kg i.p.) e Cetamina (80mg/Kg i.p.). As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhmann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Inicialmente, a veia femoral foi isolada e administrou-se manitol (100mg/mL – 3 mL) a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter. Após assepsia da parede

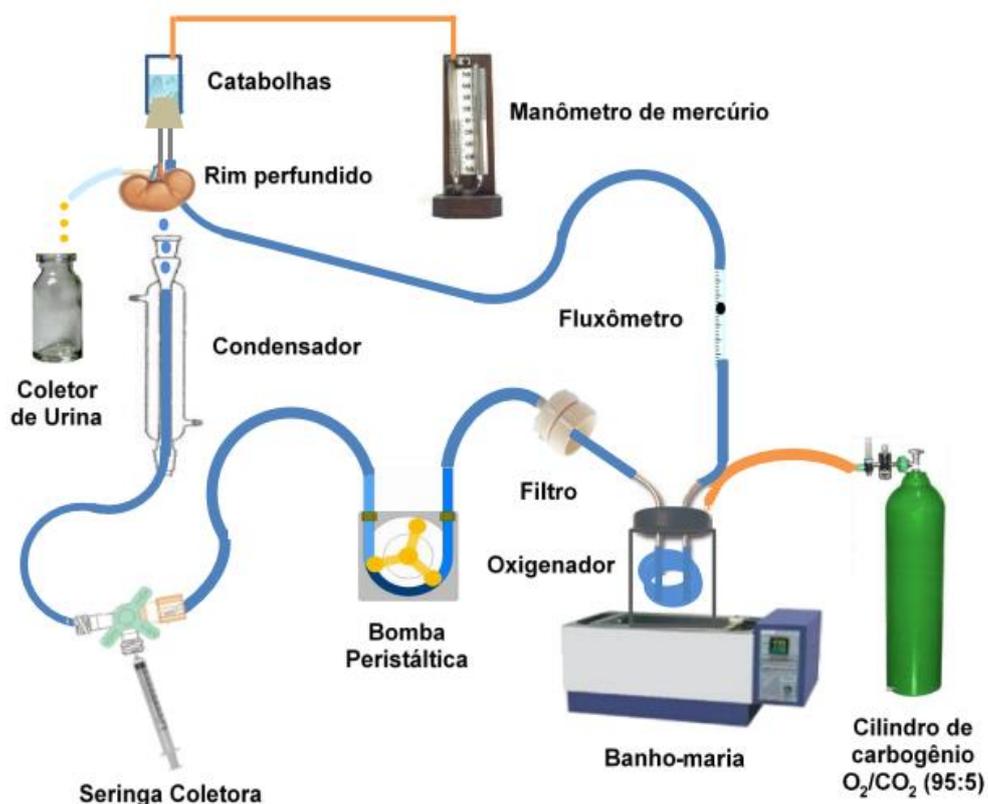
abdominal, procedeu-se uma incisão mediana de, aproximadamente 5 cm, e duas incisões perpendiculares à linha alba em torno de 3 cm para uma melhor observação das estruturas anatômicas. As vísceras foram rebatidas para a esquerda para facilitar a visualização do rim direito, sendo o mesmo isolado, seguido da retirada da glândula suprarrenal a fim de que nenhum dos hormônios influenciasse nos experimentos. Com uma lupa o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30. A artéria renal foi isolada e canulada através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi acoplado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo.

Figura 6 - Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos.



Fonte: Silveira (2015)

Figura 7 – Esquema do sistema de perfusão de rim isolado



Fonte: LAFAVET - UFC

4.4.5 Procedimento experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. A pressão de perfusão e o fluxo foram mantidos constantes durante os 30 min iniciais que foram utilizados como controle interno, após decorrido esse tempo adicionou-se o metalofármaco (FOR811B e o 011B) na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. Amostras do perfusado e da urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos seguintes parâmetros de função renal, tais como, resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo

urinário (FU) e transporte tubular de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e cloreto (%TCI⁻).

4.4.6 Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais

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

Parâmetros renais	Fórmula
PP (mmHg) – Pressão de Perfusão	Leitura em manômetro
FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) – Fluxo Urinário	FU = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) – Ritmo de Filtração Glomerular	RFG = (DOU _{in} / DOP _{in} x FU) sendo DOU _{in} = densidade ótica da inulina na urina e DOP _{in} = densidade ótica da inulina no perfusato.
FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo
RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) – Resistência vascular renal.	RVR = PP (mmHg) / FPR
FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Sódio filtrado	FNa ⁺ = RFG x PNa ⁺
ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Sódio excretado	ENa ⁺ = FU x UNa ⁺
TNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Sódio transportado	TNa ⁺ = FNa ⁺ - ENa ⁺
%TNa⁺ – Percentual de sódio transportado	%TNa ⁺ = TNa ⁺ x 100/ FNa ⁺
FKa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Potássio filtrado	FKa ⁺ = RFG x PKa ⁺
EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Potássio excretado	EK ⁺ = FU x UKa ⁺
TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Potássio transportado	TK ⁺ = FK ⁺ - EK ⁺
%TK⁺ – Percentual de potássio transportado	%TK ⁺ = TK ⁺ x 100/ FK ⁺
FCI⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Cloreto filtrado	FCI ⁻ = RFG x PCI ⁻
ECI⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Cloreto excretado	ECI ⁻ = FU x UCI ⁻
TCI⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) – Cloreto transportado	TCI ⁻ = FCI ⁻ - ECI ⁻
%TCI⁻ – Percentual de cloreto transportado	%TCI ⁻ = TCI ⁻ x 100/ FCI ⁻
Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹)= Clearance osmótico	Cosm = [U _{osm} /P _{osm}] x FU (onde U _{osm} = Osmolaridade urinária e P _{osm} = osmolaridade do perfusato)

4.4.7 Grupos experimentais

O estudo dos efeitos dos metalofármacos (FOR811B e FOR011B) sobre a função renal foram iniciados após decorrido os 30 min iniciais (controle interno) e as observações foram feitas durante os 90 min seguintes. Os quatro grupos analisados foram os seguintes:

- Grupo Controle (n=5): rins perfundidos somente com solução de Krebs – Henseleit;
- Grupo Controle Positivo (n=3): rins perfundidos com solução de Krebs – Henseleit e Nitropussiato na concentração de 1 μ mol/L, após os 30 min iniciais;
- Grupo FOR811B (n=5): rins perfundidos com solução de Krebs – Henseleit e metalofármaco na concentração de 1 μ mol/L, após os 30 min iniciais;
- Grupo FOR011B (n=5): rins perfundidos com solução de Krebs – Henseleit e metalofármaco na concentração de 1 μ mol/L, após os 30 min iniciais.

4.4.8 Análises Bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando aparelho de íons eletrodos seletivos (RapidChem 744 – Bayer[®] diagnostica). A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles *et al.* (1983) com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – Vapro 5520, WESCOR[®]).

4.5 Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

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

Sob condições oxidantes, duas moléculas de GSH doam um elétron para cada GSSG, que pode ser reduzido novamente para GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR). Um decréscimo das concentrações de GSH e/ou alta concentração de GSSG e uma baixa relação das concentrações dessas duas moléculas (razão GSH/GSSG) são interpretadas como prova de desequilíbrio redox (GIUSTARINI *et al.*, 2011).

4.6 Dosagem da produção de Nitrito/nitrato (NOx)

O tecido do rim perfundido foi macerado em uma proporção de 50 mg em 500 μ L de cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. O homogenato foi centrifugado em tubos a uma rotação de 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido para análise de NOx. A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador para a produção de óxido nítrico, por meio da determinação total de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) em tecido renal. A dosagem de NO_2^- foi feita pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Em condições ácidas, o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida, esse sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorbância em 540nm.

4.7 Níveis de GMPc urinário

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

4.8 Análise histológica

As amostras de tecidos foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas. O material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser então desidratado em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento, foi realizada a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina foi cortado com 5 µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração.

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

4.9 Cultura de Células Tubulares Renais

4.9.1 Obtenção da Linhagem Celular

A linhagem de células tubulares epiteliais renais LLC-MK2 (Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Kidney Epithelial Cells) foi obtida do Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará.

Foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, EUA composto de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis, e mantida em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ até atingir confluência (BUTLER e DAWSON, 1992).

A linhagem de célula foi escolhida para este estudo, uma vez que representa um tipo celular muito bem caracterizado em termos de propriedades funcionais e composição molecular, com características morfológicas e funcionais semelhantes à célula do túbulo proximal (LLC-MK2) de mamíferos (COLLARES-BUZATO; SUEUR; CRUZ-HÖFLING, 2002).

4.9.2 Cultivo de Células Renais

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

Para produção de estoques celulares, as células foram periodicamente deslocadas, quantificadas, conforme descrito a seguir e ressuspensas em meio DMEM completo acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Essas suspensões

foram armazenadas em *vials* de criopreservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantidas por até 4 meses.

Antes de cada experimento, as células foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 h em atmosfera de 5% de CO_2 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para sincronização na fase G_0 do ciclo celular. Após esse período, lavou-se as células, tripsinizadas e centrifugadas a 4000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensão em 1mL de meio DMEM completo. Para plaqueamento inicial dos experimentos, as células foram quantificadas e ajustada a concentração para 1×10^5 .

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

Para quantificação, removeu-se alíquotas para contagem em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1×10^5 células/mL em placas de 24 e 96 poços.

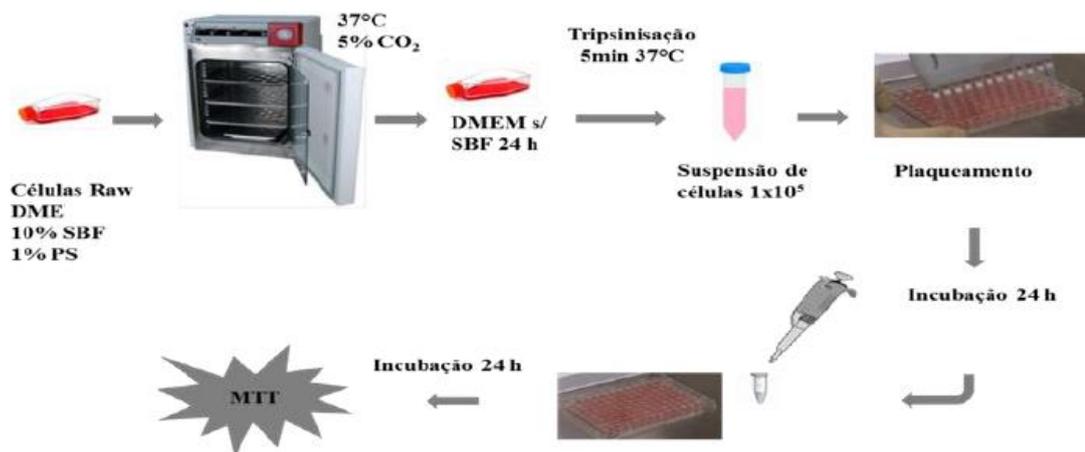
4.9.3 Ensaios de Viabilidade Celular por Redução do MTT

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

As placas submetidas ao processo de I/R e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de Rutênio foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Como controle negativo, utilizou-se PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 μL de sobrenadante removidos. 10 μL de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida,

90 μL de dodecil-sulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 h de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm.

Figura 8– Desenho esquemático do ensaio de toxicidade pelo MTT.



Fonte: Lima (2014)

4.9.4 Indução de I/R *in vitro*

A lesão *in vitro* por isquemia/reperfusão foi induzida por um método anteriormente descrito denominado método da câmara anaeróbica (GINO *et al.*, 2014). As células foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços e mantidas *overnight*, para permitir adesão e proliferação celular. Para a indução da isquemia, o meio de cultura normal foi substituído por DMEM privado de glicose, piruvato e SBF e, em seguida, as placas foram incubadas numa câmara anaeróbica por 24 h. A reperfusão foi realizada, após o período na câmara, através da adição de um meio de cultura completo e retorno das células à atmosfera de 5% de CO_2 .

Após 3h, as placas foram tratadas com FOR811B e FOR011B em várias concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μM). Todos os ensaios foram realizados em paralelo nas células em condições normais de aerobiose a fim de detectar eventuais concentrações tóxicas da FOR 811A nas linhagens celulares. A recuperação da viabilidade celular foi medida pelo ensaio de redução do MTT.

4.9.5 Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) que é um corante específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas, emitindo fluorescência vermelha.

Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectados em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde citosólica em detrimento da vermelha mitocondrial, indicando uma difusão da Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas (JOHNSON *et al.*, 1980). Sendo assim, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada através do filtro de fluorescência vermelha (FL2) (YANG *et al.*, 2012).

As células em cultura que foram submetidas à lesão por Isquemia/Reperusão pelo método da câmara anaeróbica foram tratadas com FOR811B e FOR011B, como descrito anteriormente neste trabalho. Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas, e o pellet de células marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 µg/mL) por 30 min para, em seguida, ser processado em citômetro de fluxo.

4.10 Análise estatística

Para análise de dados, foi utilizado o software estatístico GraphPad® Prism v. 7.0. Nos ensaios de perfusão renal, utilizou-se teste t de Student seguido por análise de variância fator duplo (Two-way ANOVA) que, por sua vez, foi seguida pelo pós-teste de Tukey. Para análise das demais metodologias, utilizou-se análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os resultados foram apresentados como

Média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.), valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes para a análise.

5 RESULTADOS

5.1 Perfusão de rim isolado

Os metalofármacos FOR811B e FOR011B foram adicionados ao sistema de perfusão após os 30 minutos iniciais dos experimentos. Os respectivos grupos tratados foram comparados a um grupo controle, onde os rins foram perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada. Após a adição dos metalofármacos observou-se alterações na fisiologia renal em todos os parâmetros renais estudados com as concentrações dos metalofármacos utilizadas.

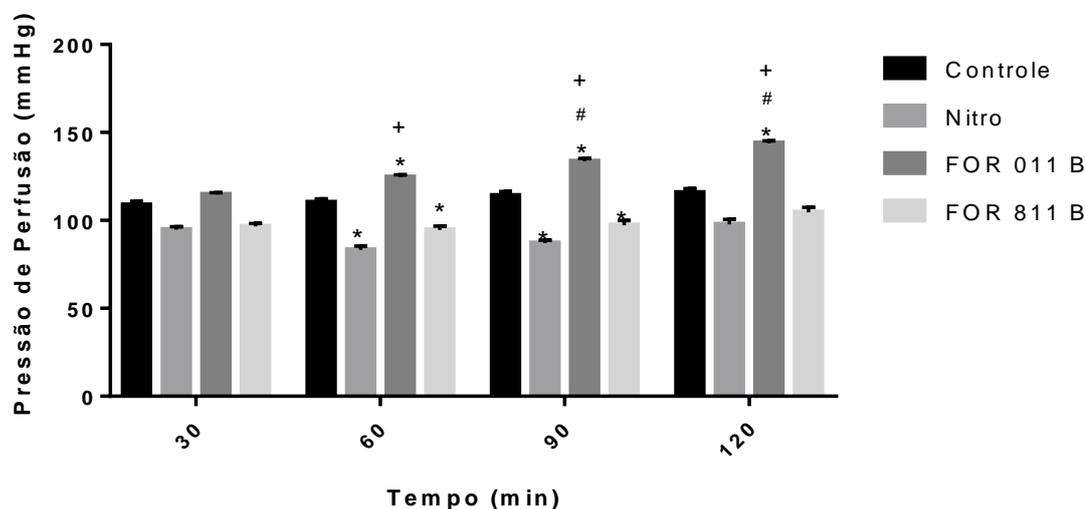
Foi verificado que houve uma redução da pressão de perfusão dos grupos Nitro e FOR811B nos tempos 60 e 90 min em comparação ao grupo controle no tempo 30. E aumento da pressão de perfusão nos tempos 60, 90 e 120 min do grupo FOR011B em relação ao tempo 30 min do grupo controle negativo (Tabela 4; Figura 9). Ao comparar o controle interno (tempo 30) de cada grupo com os tempos 60, 90 e 120 min do respectivo grupo, só houve significância no grupo do FOR011B nos tempos 90 e 120 min, onde aumentou a pressão de perfusão. Relacionando o grupo nitro com os grupos dos metalofármacos, nos mesmos tempos, houve diferença significativa apenas no grupo FOR011B nos tempos 60, 90 e 120 min, onde aumentou a pressão de perfusato em relação ao grupo nitro (Tabela 1; Figura 5).

Tabela 4 – Pressão de perfusão (PP) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1µmol/L.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	108,8 ± 4,653	94,81 ± 2,882	114,7 ± 2,256	96,55 ± 3,79
60 min	110,2 ± 4,746	83,32 ± 3,6 *	124,6 ± 3,123 *+	94,57 ± 4,782 *
90 min	114,1 ± 5,101	87,04 ± 3,05 *	133,6 ± 3,531 *#+	97,3 ± 5,809 *
120 min	115,8 ± 5,064	97,7 ± 4,978	143,9 ± 3,135 *#+	104,6 ± 6,4

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 9- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B na pressão de perfusão.



Pressão de perfusão em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 $\mu\text{mol/L}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). * $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle negativo. # $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle interno (tempo 30). + $p < 0,05$ relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

A resistência vascular renal (RVR) diminuiu significativamente nos tempos 60, 90 e 120 min dos grupos Nitro e FOR811B, e aumentou no tempo 120 min do grupo FOR011B, quando comparou-se com o controle negativo no tempo 30 min (Tabela 2; Figura 6). Ao comparar cada um dos grupos em estudo com o respectivo controle interno, nos tempos 60, 90 e 120 min, houve aumento significativo apenas no tempo 120 min do grupo FOR011B e, ao analisar o grupo nitro em comparação com os metalofármacos em estudo, a diferença significativa foi apenas no grupo FOR011B nos tempos 60, 90 e 120 min, onde aumentou de maneira significativa (Tabela 5; Figura 10).

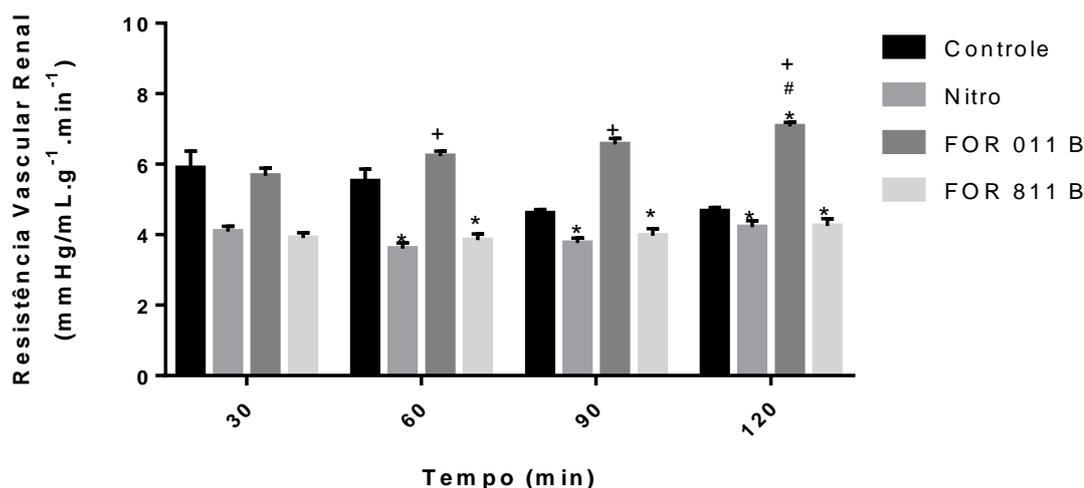
Tabela 5 – Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1 $\mu\text{mol/L}$.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
-------	----------	-------	---------	---------

30 min	5,887 ± 1,086	4,089 ± 0,256	5,673 ± 0,482	3,9 ± 0,3423
60 min	5,509 ± 0,789	3,608 ± 0,272 *	6,225 ± 0,326+	3,849 ± 0,383 *
90 min	4,601 ± 0,245	3,759 ± 0,256 *	6,566 ± 0,368 +	3,974 ± 0,433 *
120 min	4,663 ± 0,235	4,212 ± 0,312 *	7,067 ± 0,264 *#+	4,249 ± 0,464 *

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 10- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B na resistência vascular renal.



Resistência vascular renal em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 µmol/L. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). * p<0,05 relacionado a concentração 1 µmol/L com o controle negativo. # p<0,05 relacionado a concentração 1 µmol/L com o controle interno (tempo 30). + p<0,05 relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

Em relação ao fluxo urinário (FU) não houve diferença significativa entre os grupos nitro e FOR811B em relação ao controle negativo. Em contrapartida, houve aumento do fluxo urinário no tempo 120 min do grupo FOR011B quando comparou

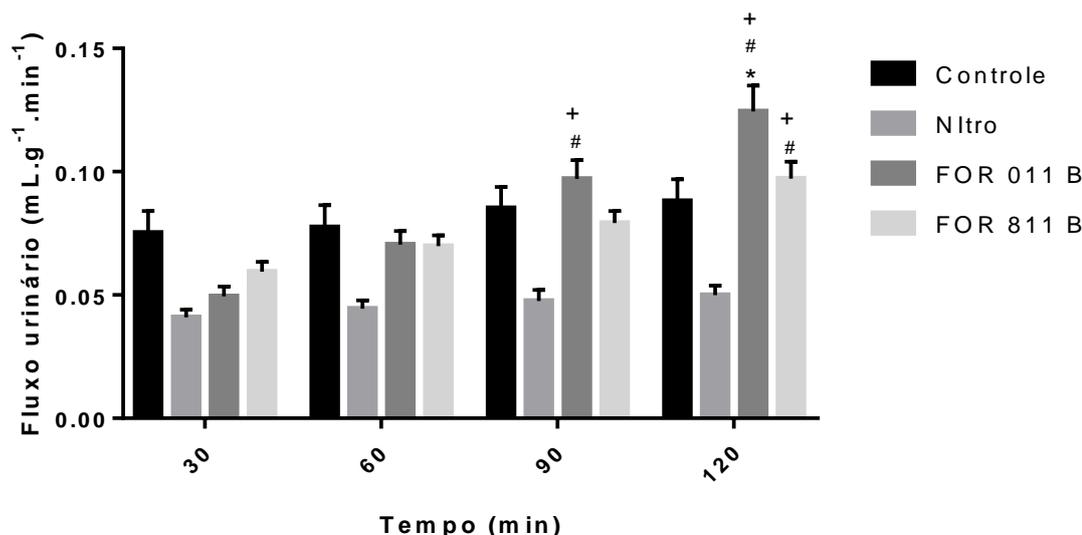
com o controle negativo (Tabela 6; Figura 11). Ao realizar a análise dos grupos em estudos nos tempos 60, 90 e 120 min com o seu próprio controle interno (tempo 30 min), houve significância no grupo FOR011B nos tempos 90 e 120 min, onde houve aumento do fluxo urinário e, no grupo FOR811B no tempo 120. Em relação a comparação do grupo nitro com os metalofármacos, houve diferença significativa nos tempo 90 e 120 min no grupo FOR011B e no tempo 120 min no FOR811B (Tabela 3; Figura 7).

Tabela 6 – Fluxo urinário (FU) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1 μ mol/L.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	0,07513 \pm 0,02	0,04089 \pm 0,005	0,0494 \pm 0,008	0,0594 \pm 0,008
60 min	0,0774 \pm 0,02	0,04444 \pm 0,005	0,0704 \pm 0,012	0,0698 \pm 0,0097
90 min	0,08513 \pm 0,019	0,04756 \pm 0,007	0,0970 \pm 0,016##+	0,0791 \pm 0,011
120 min	0,08807 \pm 0,019	0,04989 \pm 0,006	0,124 \pm 0,023*##+	0,097 \pm 0,015##+

Os dados são expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 11- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B no fluxo urinário.



Fluxo urinário em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 $\mu\text{mol/L}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). * $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle negativo. # $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle interno (tempo 30). + $p < 0,05$ relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

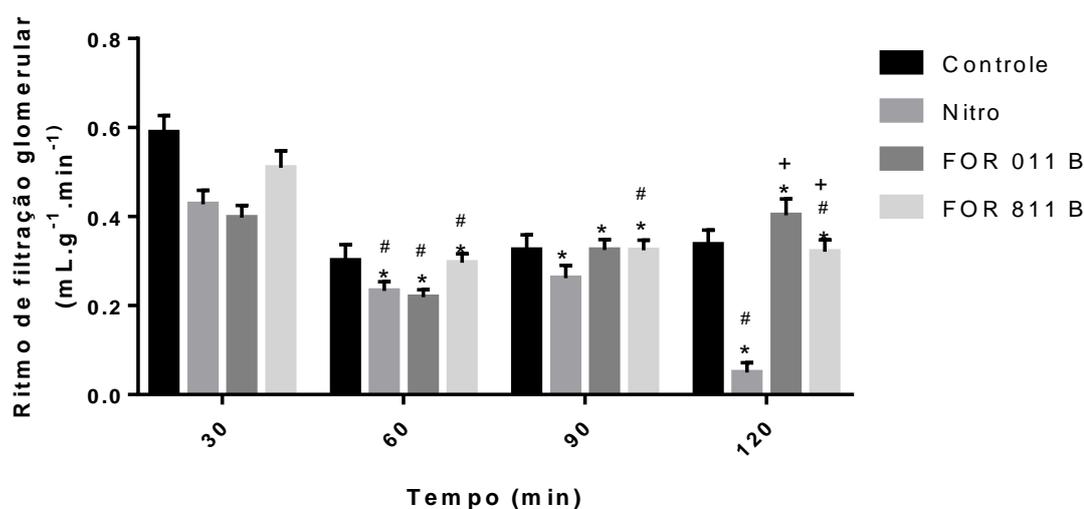
Adicionalmente, houve diminuição significativa no ritmo de filtração glomerular no tempo 60 min até o final do experimento em todos os grupos em estudo quando compara-se com o controle negativo no tempo 30 min (Tabela 7; Figura 12). Em relação a comparação do controle interno com os demais tempos de cada grupo, houve diferença significativa nos tempo 60 e 120 min do grupo nitro, onde reduziu em comparação ao tempo 30 min, diminuiu significativamente a RFG do FOR011B no tempo 60 min e, também houve redução em todos os tempos do FOR811B em comparação ao seu controle interno. Ao analisar os dados do grupo nitro em comparação aos dos metalofármacos, houveram diferenças significativas no tempo 120 min de ambos os grupos.

Tabela 7 – Ritmo de filtração glomerular (RFG) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1 $\mu\text{mol/L}$.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	0,887 \pm 0,086	0,427 \pm 0,053	0,397 \pm 0,061	0,509 \pm 0,08
60 min	0,300 \pm 0,081*	0,233 \pm 0,035*#	0,218 \pm 0,037*#	0,296 \pm 0,04*#
90 min	0,325 \pm 0,076*	0,261 \pm 0,049*	0,325 \pm 0,052*	0,324 \pm 0,05*#
120 min	0,337 \pm 0,072*	0,241 \pm 0,038*#	0,403 \pm 0,081*+	0,320 \pm 0,06*#+

Os dados são expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. * $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). + $P < 0,05$ comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 12- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR 811B no ritmo de filtração glomerular.



Ritmo de filtração glomerular em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 $\mu\text{mol/L}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). * $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle negativo. # $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle interno (tempo 30). + $p < 0,05$ relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

A verificação da capacidade de depuração do rim isolado em nível de moléculas osmoticamente ativas baseou-se através do cálculo do *clearance* osmolar (C_{OSM}). Ao realizar a comparação dos grupos em estudo com o controle negativo só houveram diferenças significativas no tempo 60 min do grupo nitro, onde houve uma redução do *clearance* e, no grupo FOR011B no tempo 120 min em que houve um acréscimo do C_{OSM} .

Ao comparar o controle interno (tempo 30) de cada grupo com os demais tempo do seu próprio grupo, as diferenças significativas foram presentes nos grupos dos metalofármacos, onde aumentou nos tempos 90 e 120 min do FOR011B e, no tempo

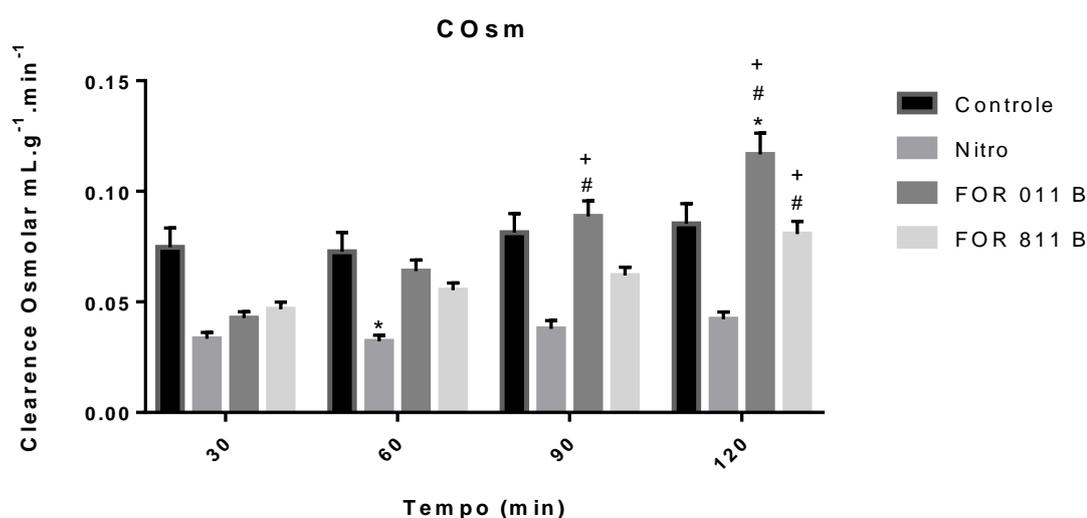
120 min do FOR811B. Em relação a análise do grupo nitro com os grupos dos metalofármacos, houve aumento significativo do *clearance* nos tempos 90 e 120 min do FOR011B e, no tempo 120 min do FOR811B.

Tabela 8 – *Clearance* osmolar (C_{OSM}) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1 $\mu\text{mol/L}$.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	0,074 \pm 0,019	0,033 \pm 0,005	0,042 \pm 0,006	0,046 \pm 0,007
60 min	0,072 \pm 0,019	0,032 \pm 0,004*	0,064 \pm 0,011	0,055 \pm 0,007
90 min	0,081 \pm 0,019	0,037 \pm 0,006	0,088 \pm 0,015#+	0,062 \pm 0,008
120 min	0,085 \pm 0,020	0,042 \pm 0,005	0,116 \pm 0,021*#+	0,080 \pm 0,01#+

Os dados são expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. * $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). + $P < 0,05$ comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 13- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B no *clearance* osmolar.



Clearance osmolar em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 $\mu\text{mol/L}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). * $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle negativo. # $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle interno

(tempo 30). + $p < 0,05$ relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

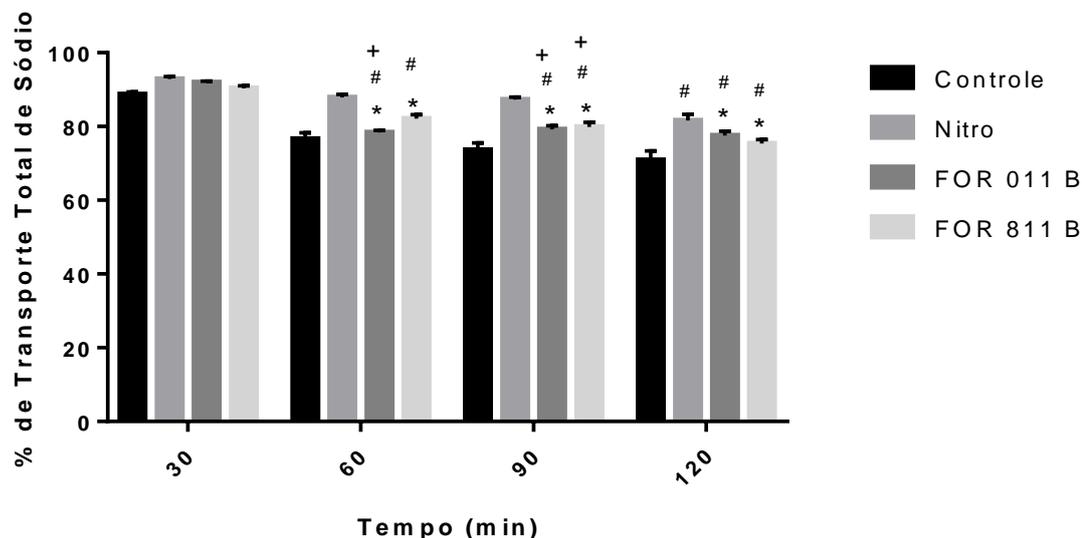
Ao analisar o transporte de eletrólitos, observou-se que o Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) diminuiu significativamente nos tempos 60, 90 e 120 min dos grupos FOR011B e FOR811B, porém não houve alteração no grupo nitro ao comparar com o controle negativo no tempo 30. Ao realizar a comparação dos grupos nos tempos 60, 90 e 120 min com seu controle interno, houve diferença significativa nos tempo 60 e 90 min para os metalofármacos e no tempo 120 min para os três grupos em estudo, onde houve redução do transporte tubular de sódio ao comparar com os 30 minutos iniciais. Quando se comparou o grupo nitro com FOR011B e FOR811B nas mesmas faixas de tempo, houve diferença significativa no tempo 60 min do FOR011B e no tempo 90 min para os dois metalofármacos.

Tabela 9- Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa⁺) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1 $\mu\text{mol/L}$.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	88,74 \pm 1,362	92,85 \pm 1,126	91,98 \pm 0,712	90,38 \pm 1,402
60 min	76,62 \pm 3,685	87,88 \pm 1,487	78,36 \pm 1,40*#+	82,14 \pm 2,47*#
90 min	73,6 \pm 4,394	87,31 \pm 1,153	79,24 \pm 2,08*#+	79,84 \pm 2,85*#+
120 min	70,85 \pm 5,729	81,6 \pm 2,859#	77,52 \pm 2,71*#	75,37 \pm 2,39*#

Os dados são expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. * $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). + $P < 0,05$ comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 14- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa⁺).



Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa⁺) em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 $\mu\text{mol/L}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). * $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle negativo. # $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle interno (tempo 30). + $p < 0,05$ relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

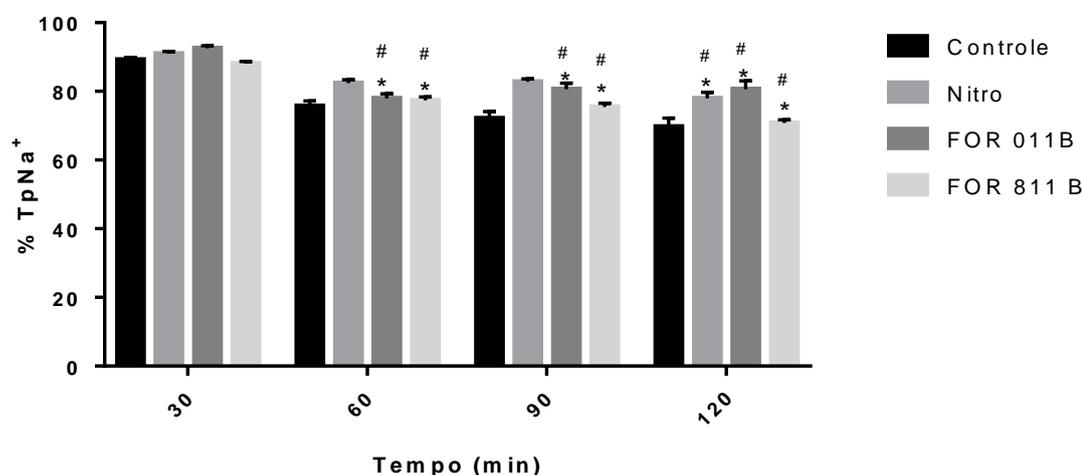
Assim como, também houve redução significativa no Percentual de Transporte Proximal de Sódio nos tempos 60 e 90 min dos grupos FOR011B e FOR811B e, no tempo 120 min houve redução dos três grupos em estudo ao comparar com o controle negativo. Ao realizar a comparação do controle interno de cada grupo com os demais tempos do seu respectivo grupo, houve diminuição significativa nos tempos 60, 90 e 120 min do FOR011B e FOR811B e, também houve redução no tempo 120 min do grupo nitro em comparação ao tempo 30 min. Não houve significância em relação a comparação do grupo nitro com os grupos dos metalofármacos.

Tabela 10- Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa⁺) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1µmol/L.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	89,2 ± 1,547	90,98 ± 1,115	92,55 ± 1,676	88,11 ± 1,351
60 min	75,7 ± 3,437	82,37 ± 1,685	77,95 ± 2,994*#	77,39 ± 2,116*#
90 min	72,16 ± 4,322	82,79 ± 1,401	80,64 ± 3,881*#	75,45 ± 2,443*#
120 min	69,73 ± 5,601	77,99 ± 2,924*#	80,66 ± 5,394*#	70,79 ± 2,013*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 15- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa⁺).



Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa⁺) em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 µmol/L. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). * p<0,05 relacionado a concentração 1µmol/L com o controle negativo. # p<0,05 relacionado a concentração 1 µmol/L com o controle interno (tempo 30). + p<0,05 relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

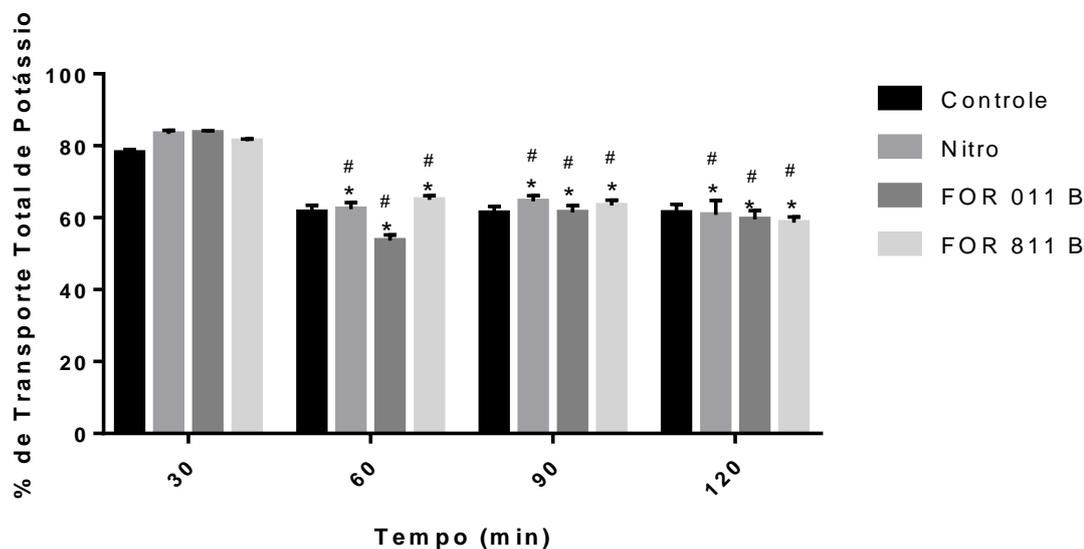
Com relação ao íon potássio, o Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) também reduziu significativamente nos grupos Nitro, FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120 min do experimento ao comparar com o controle negativo no tempo 30 min. A comparação do controle interno de cada grupo com os demais tempos foi significativa para todos os grupos, onde houve uma diminuição do percentual de transporte em todos os tempos dos grupos em estudo. Ao analisar os dados do grupo nitro em relação aos do metalofármaco não houveram diferenças significativas entre os mesmos.

Tabela 11- Percentual de Transporte Tubular Total de Potássio (%TK⁺) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1µmol/L.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	78,01 ± 2,096	83,26 ± 1,829	83,59 ± 1,29	81,29 ± 1,395
60 min	61,58 ± 4,268	62,38 ± 3,172*#	53,65 ± 3,481*#	64,94 ± 2,624*#
90 min	61,25 ± 4,177	64,58 ± 2,693*#	61,46 ± 4,194*#	63,37 ± 3,376*#
120 min	61,35 ± 5,341	60,76 ± 6,99*#	59,53 ± 5,372*#	58,62 ± 3,549*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 16- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Potássio (%TK⁺).



Percentual de Transporte Tubular Total de Potássio (%TK⁺) em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 $\mu\text{mol/L}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). * $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle negativo. # $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ com o controle interno (tempo 30). + $p < 0,05$ relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

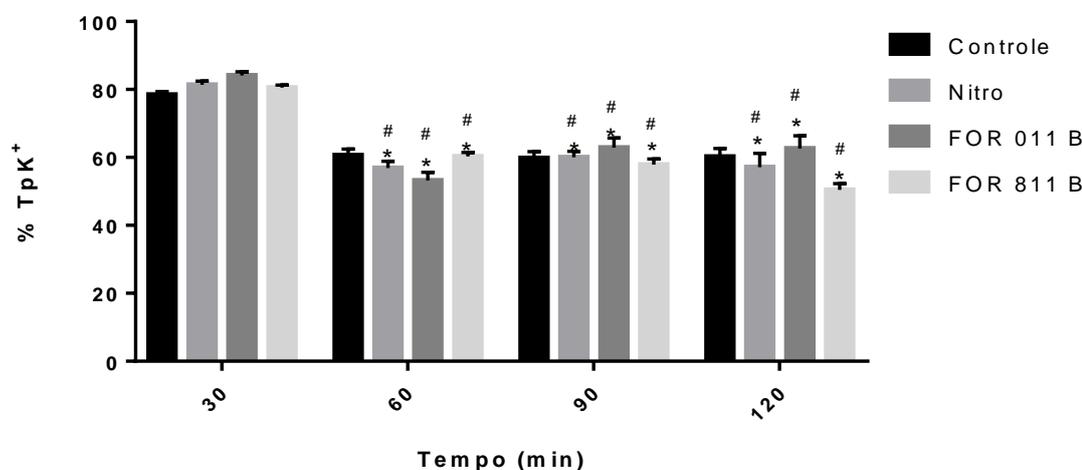
Houve redução significativa no Percentual de Transporte Proximal de Potássio (%TpK⁺) nos três grupos em estudo nos tempos 60, 90 e 120 min. Ao realizar a comparação do controle interno de cada grupo com os demais tempos do experimento, houveram diferenças significativas, nas quais teve redução do transporte proximal do íon potássio em todos os grupos nos tempos 60, 90 e 120 min em relação ao controle interno. Não houve significância na comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

Tabela 12- Percentual de Transporte Proximal de Potássio (%TpK⁺) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1µmol/L.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	78,47 ± 1,934	81,4 ± 1,839	84,15 ± 2,347	80,52 ± 1,702
60 min	60,65 ± 4,109	56,87 ± 3,436*#	53,24 ± 5,356*#	60,26 ± 2,697*#
90 min	59,8 ± 4,195	60,06 ± 2,939*#	62,85 ± 6,416*#	57,9 ± 3,595*#
120 min	60,23 ± 5,329	57,15 ± 7,064*#	62,66 ± 8,232*#	50,47 ± 4,133*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 17- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Proximal de Potássio (%TpK⁺).



Percentual de Transporte Proximal de Potássio (%TpK⁺) em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 µmol/L. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). * p<0,05 relacionado a concentração 1µmol/L com o controle negativo. # p<0,05 relacionado a concentração 1 µmol/L com o controle interno (tempo 30). + p<0,05 relacionado a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B.

Quando se analisou o íon cloreto, o Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl⁻) reduziu significativamente nos tempos 60 e 90 min para os grupos FOR011B e FOR811B e, também houve redução no tempo 120 min para os três grupos

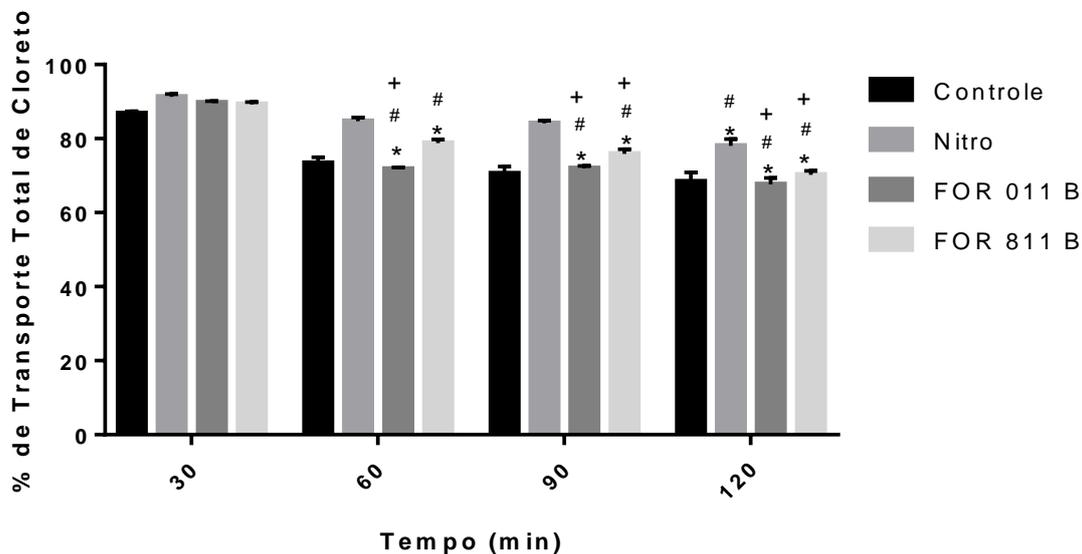
em estudo ao comparar com o controle negativo no tempo 30 min. Ao realizar a comparação do controle interno de cada grupo com os demais tempos do experimento, houve diminuição significativa nos tempos 60, 90 e 120 min dos metalofármacos e somente no tempo 120 min do grupo nitro. Em relação a comparação do grupo nitro com o FOR011B e FOR811B na mesma faixa de tempo, teve diferença significativa em todos os tempos para o FOR011B e nos tempo 90 e 120 min para FOR811B, onde houve maior diminuição do (%TCl-) para os metalofármacos em estudo.

Tabela 13- Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1 μ mol/L.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	86,82 \pm 1,328	91,3 \pm 1,294	89,73 \pm 0,827	89,26 \pm 1,386
60 min	73,34 \pm 3,587	84,67 \pm 1,755	71,75 \pm 1,096*##+	78,79 \pm 2,269*#
90 min	70,56 \pm 4,254	84,1 \pm 1,348	71,98 \pm 1,389*##+	75,91 \pm 2,719*##+
120 min	68,4 \pm 5,589	78 \pm 3,214*##	67,63 \pm 3,886*##+	70,23 \pm 2,338*##+

Os dados são expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 18- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl⁻).



Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl⁻) em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 μ mol/L. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). * $p < 0,05$ relacionado a concentração 1 μ mol/L com o controle negativo. # $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). + $P < 0,05$ comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

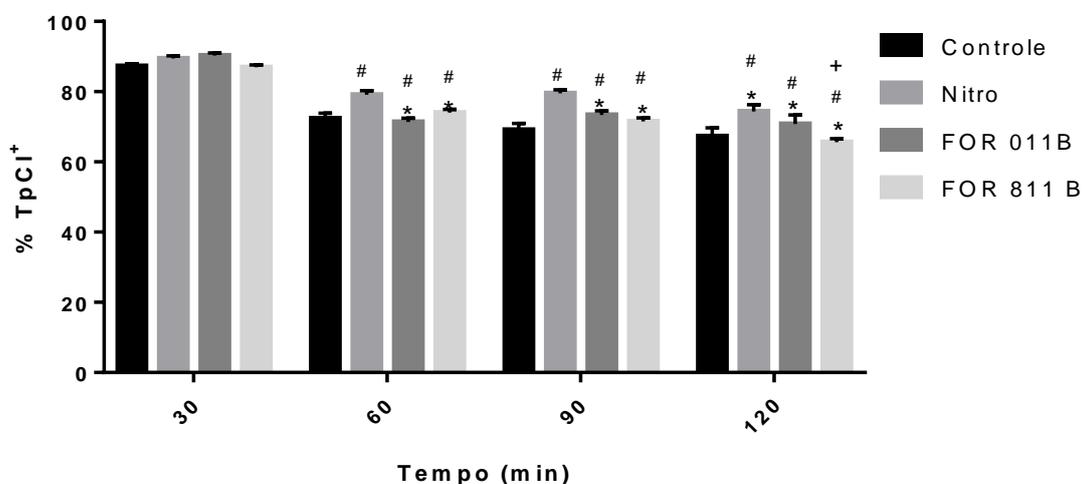
Para o Percentual de Transporte Proximal de Cloreto (%TpCl⁻) houve uma diminuição significativa nos tempos 60, 90 e 120 min para os grupos FOR011B e FOR811B, e diminuiu no tempo 120 min para o grupo Nitro ao comparar com o controle negativo. Ao comparar o controle interno de cada grupo com os demais tempos do experimento, houve uma diminuição significativa do (%TpCl⁻) nos tempos 60, 90 e 120 min para todos os grupos em análise. Ao realizar a comparação do grupo nitro com os grupos dos metalofármacos na mesma faixa de tempo, só houve diferença significativa no tempo 120 min do FOR811B, onde diminuiu o (%TpCl⁻).

Tabela 14- Percentual de Transporte Proximal Cloreto (%TpCl⁻) em rim isolado de rato na presença de Nitro, FOR011B e FOR811B nas concentrações 1µmol/L.

Tempo	Controle	Nitro	FOR011B	FOR811B
30 min	87,28 ± 1,515	89,44 ± 1,285	90,3 ± 1,578	86,99 ± 1,342
60 min	72,41 ± 3,34	79,16 ± 1,963#	71,35 ± 2,444*#	74,04 ± 1,976*#
90 min	69,11 ± 4,198	79,58 ± 1,604#	73,38 ± 2,679*#	71,51 ± 2,394*#
120 min	67,28 ± 5,477	74,39 ± 3,272*#	70,77 ± 5,77*#	65,65 ± 2,102*#+

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90, 120 e o controle negativo do grupo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

Figura 19- Efeitos promovidos pelo nitro e metalofármacos FOR011B e FOR811B sobre Percentual de Transporte Proximal Cloreto (%TpCl⁻).

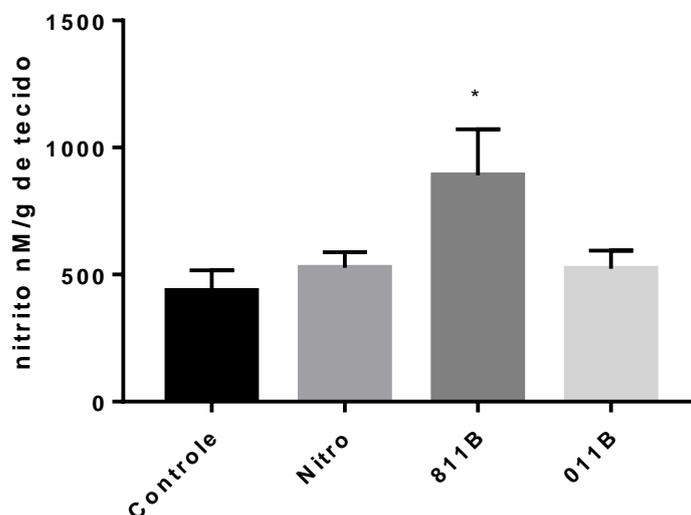


Percentual de Transporte Proximal de Cloreto (%TpCl⁻) em rim isolado de rato dos grupos nitro, FOR011B, FOR811B na concentração 1 µmol/L. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). * p<0,05 relacionado a concentração 1µmol/L com o controle negativo. # P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). +P<0,05 comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

5.2 Dosagem de nitrito/nitrato (NOx) no tecido renal

A figura 20 mostra os níveis de nitrito/nitrato (NOx) em tecido renal. O grupo FOR811B apresentou aumento dos níveis de NOx em relação ao grupo controle ($890 \pm 181,6$ nM/g tecido vs $435,8 \pm 80,57$ nM/g tecido), e o grupo controle e FOR011B não apresentaram significância ao comparar com o grupo controle.

Figura 20- Níveis de nitrito/nitrato tecidual em tecido renal



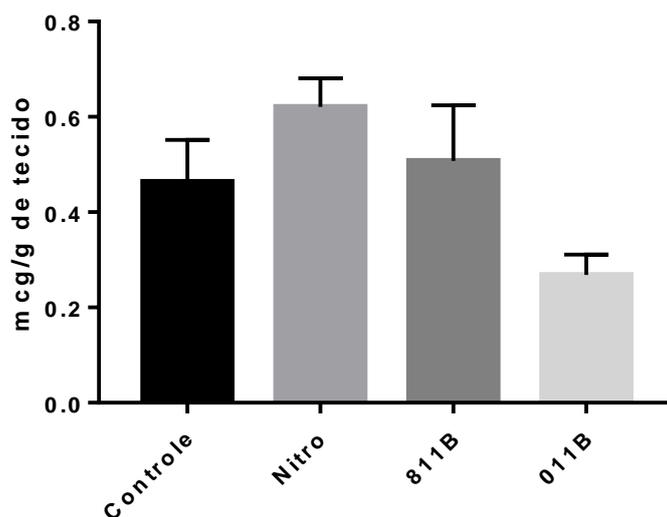
Efeito do FOR811B e FOR011B em níveis de NOx em tecido renal, após a perfusão de rim de rato isolado. Os valores da figura expressam a média \pm erro padrão dos níveis teciduais de NOx nos diferentes grupos experimentais. Grupos: controle; nitro, FOR811B e FOR011B com a dose $1 \mu\text{mol/L}$ em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

5.3 Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido renal

A figura 21 mostra os resultados em relação aos níveis de GSH em tecido renal após perfusão de rim isolado. Demonstrando um aumento não significativo do grupo nitro em relação ao controle e, também, em relação aos outros grupos em estudo. Ao observar os grupos do metalofármacos, percebe-se que não houve aumento significativo nos mesmo, porém o grupo FOR811B se mostrou mais parecido em

valores com o grupo nitro, do que o FOR011B, onde houve valores bem baixos de GSH.

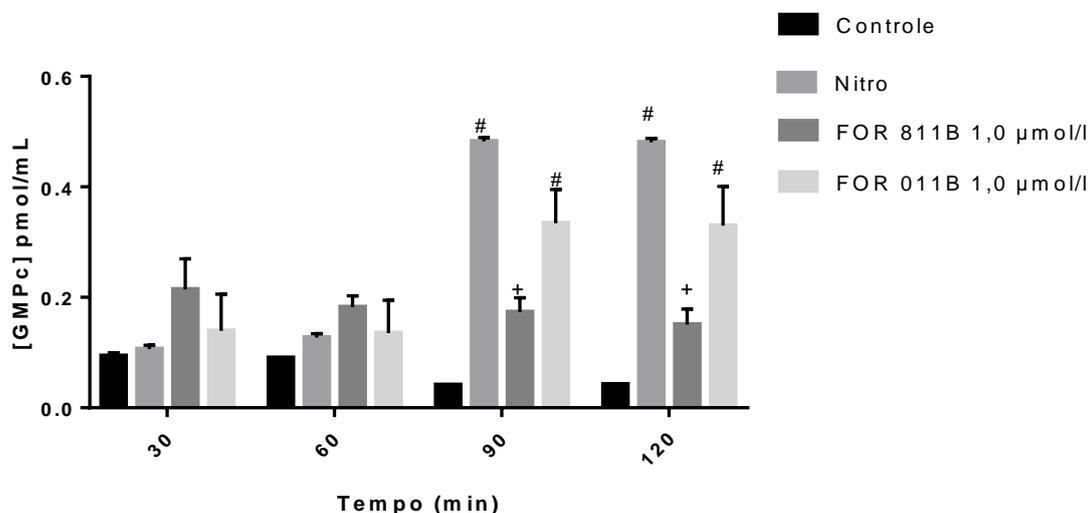
Figura 21- Níveis de GSH em tecido renal



Efeito do FOR811B e FOR011B em níveis de GSH em tecido renal, após a perfusão de rim de rato isolado. Os valores da figura expressam a média \pm erro padrão dos níveis teciduais de GSH nos diferentes grupos experimentais. Grupos: controle; nitro, FOR811B e FOR011B com a dose $1\mu\text{mol/L}$ em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

5.4 Determinação de GMPc urinário

A figura 22 mostra a determinação dos níveis de GMPc das urinas da perfusão. Houve um aumento significativo nos tempos 90 e 120 dos grupos Nitro e FOR011B, em relação ao controle interno. Ao relacionar o grupo nitro com os grupos dos metalofármacos, na mesma faixa de tempo, só houve significância no grupo FOR811B, onde reduziu os níveis de GMPc em relação ao grupo nitro. A comparação do grupo nitro e FOR011B não demonstrou significância.

Figura 22- Níveis de GMPc urinário

Os dados são expressos em média \pm E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two- Way ANOVA e pós teste de Tukey. # $P < 0,05$, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 de cada grupo com seu controle interno (tempo 30). + $P < 0,05$ comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 60, 90 e 120.

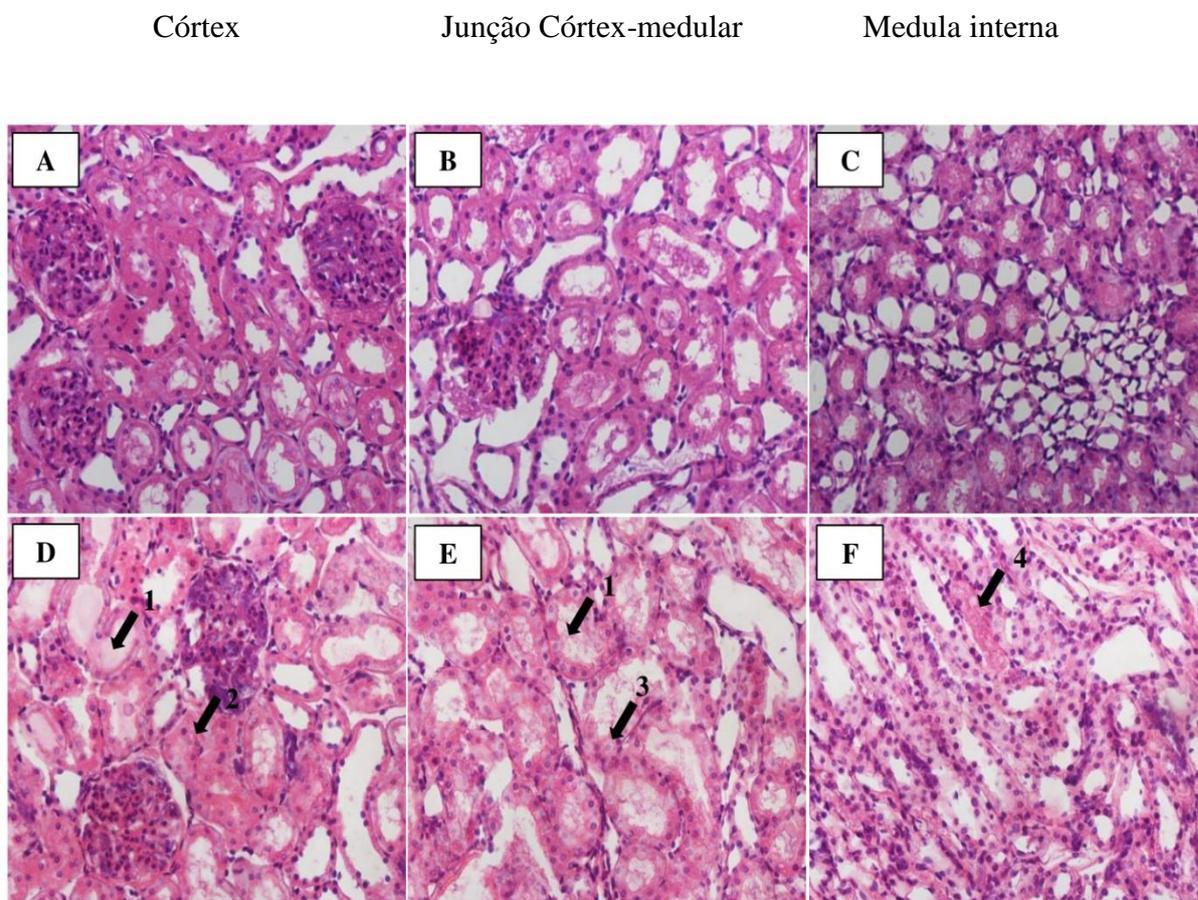
5.5 Análise histológica

A figura 23 corresponde às fotomicrografias do grupo controle negativo que representa o grupo no qual, os rins direitos perfundidos apenas com solução de Krebs-Hanseleit e do grupo controle positivo dos rins que foram perfundidos com Nitroprussiato 1,0 $\mu\text{mol/L}$. O grupo controle interno não apresentou alterações na arquitetura renal. Já o grupo controle positivo com Nitroprussiato 1,0 $\mu\text{mol/L}$ apresentou alterações como deposição de material protéico intratubular, tumefação tubular, degeneração hidrópica vacuolar e tubular.

A figura 24 demonstra as fotomicrografias da análise histológica de rins direitos dos grupos perfundidos com os metalofármacos FOR811B e 011B na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$. Uma leve atrofia glomerular, tumefação tubular e deposição de material protéico foram as alterações na arquitetura renal do grupo do FOR811B. Em relação ao grupo FOR011B, verificou-se também, alterações na

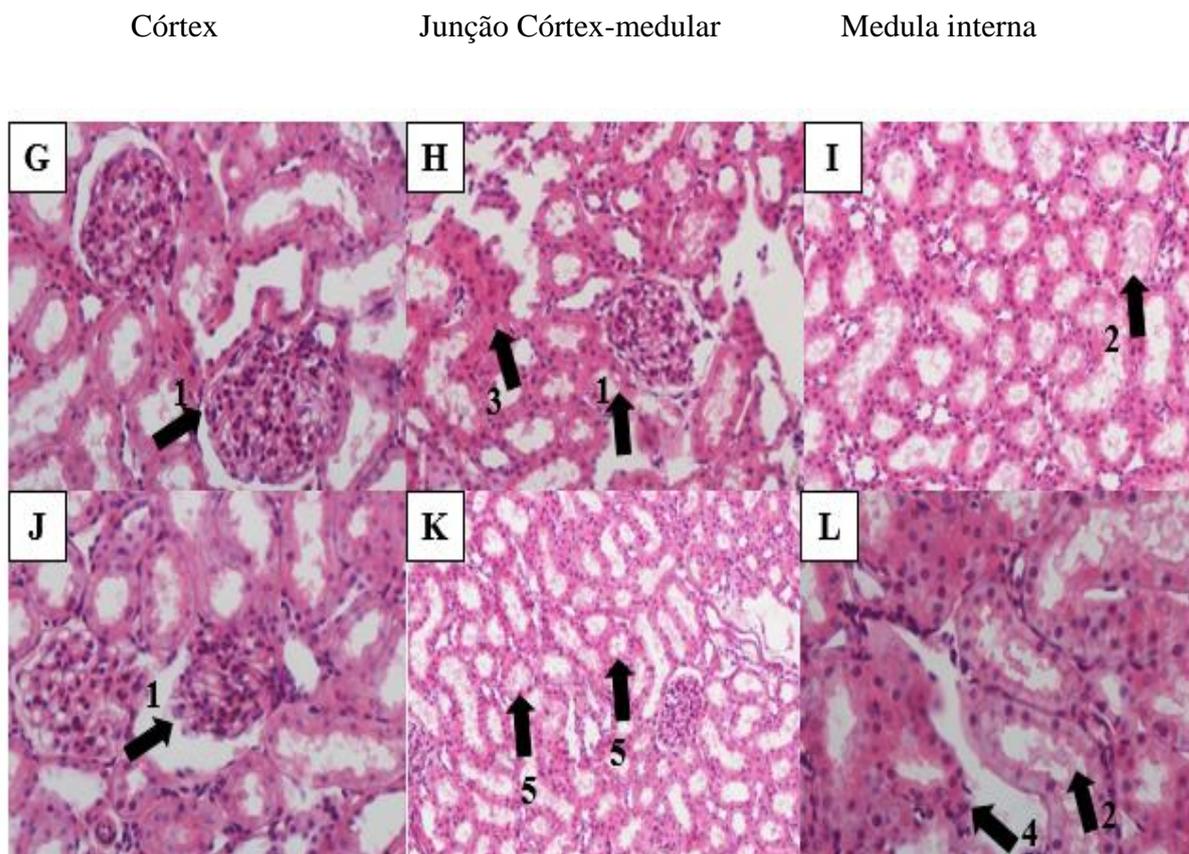
arquitetura renal, como atrofia glomerular, deposição de material protéico intraglomerular em túbulos proximais e degeneração tubular.

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



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

Figura 24 – Fotomicrografias representativas de rins de ratos perfundidos demonstrando o córtex, junção córtex-medular e medula interna. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0.



Grupo FOR811B no qual os rins foram perfundidos com o esse metalofármaco na concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ (G-H), o córtex apresentou uma leve e discreta atrofia glomerular (1), na região córtex-medular foi observado tumefação tubular (3) e atrofia glomerular (1) e na região da medula interna, demonstrou-se deposição de material protéico; no grupo FOR011B 1 $\mu\text{mol/L}$ (J-L), na região do córtex foi observado atrofia glomerular (1), na região córtex- medular demonstrou-se deposição de material protéico intraglomerular em túbulos proximais e na região da medula interna apresentou degeneração tubular (4) e deposição de proteína (2). As setas apontam as alterações. Fonte: MEC – UECE.

5.6 Cultura de células renais e viabilidade celular

Com o objetivo de mensurar o percentual de células vivas (viáveis) em comparação com o controle após uma exposição de uma concentração conhecida de células, realiza-se os ensaios de viabilidade celular. Tais células passaram por condições adversas (estresse físico ou processo químico, por exemplo). O teste de redução de MTT foi realizado neste trabalho, o qual visa investigar, a eficiência da respiração celular, apesar de ser de forma indireta.

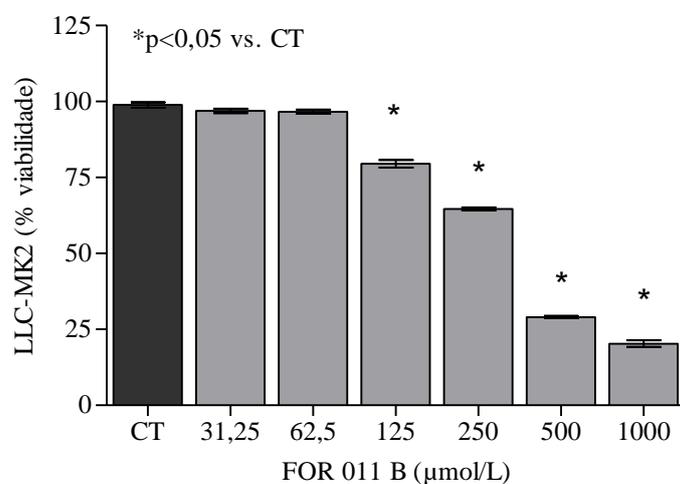
Como demonstrado nas figuras 25 e 26, a fim de determinar as concentrações de FOR011B e FOR811B sem efeitos tóxicos, as células LLC - MK2 em condições ideais de cultivo foram tratadas com os metalofármacos em concentrações crescentes (31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{mol/L}$), a substância apresentou um perfil de toxicidade nas concentrações estudadas, aparentemente, concentração dependente, mostrando que para o FOR011B a partir da concentração de 125 $\mu\text{mol/L}$ apresentou efeitos tóxicos e a menor concentração sem efeito tóxico na linhagem estudada foi 62,5 $\mu\text{mol/L}$, onde não houve alteração significativa na viabilidade. Da mesma forma, as células LLC-MK2 foram tratadas com as mesmas concentrações crescentes com o FOR811B, onde houve efeitos tóxicos a partir da concentração 250 $\mu\text{mol/L}$ e nas concentrações inferiores a esta, não houveram alterações significativas na viabilidade, o que mostra que não há efeitos tóxicos nestas.

Tabela 15 - Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011B e FOR811B.

% Viabilidade das células LLC-MK2

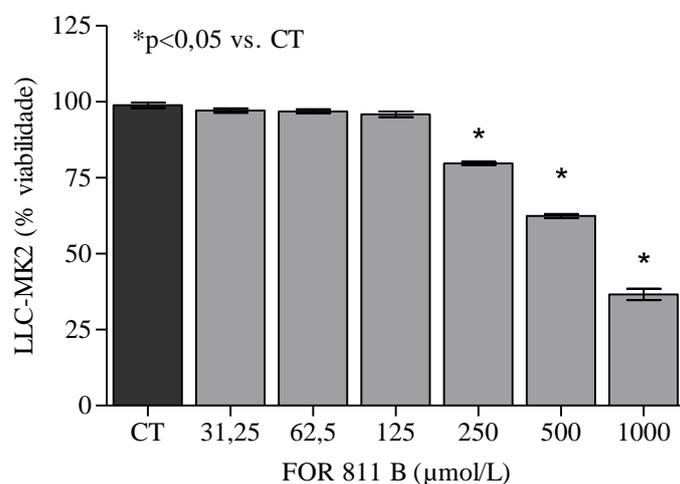
Controle	98,88±0,89					
	31,25 $\mu\text{mol/L}$	62,50 $\mu\text{mol/L}$	125 $\mu\text{mol/L}$	250 $\mu\text{mol/L}$	500 $\mu\text{mol/L}$	1000 $\mu\text{mol/L}$
FOR011B	96,94±0,76	96,65±0,68	79,53±1,26*	64,61±0,52*	29,05±0,37*	20,29±1,06*
FOR811B	97,13±0,76	96,85±0,68	95,88±0,94	79,74±0,52*	62,41±0,67*	36,61±1,92*

Figura 25 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011B.



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

Figura 26 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR811B.



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

Após conhecimento da faixa de concentração de trabalho, submeteu-se as células às condições de I/R *in vitro* através do método da câmara anaeróbica e tratadas

com os respectivos metalofármacos a fim de investigar possíveis efeitos protetores diretos por meio do aumento no percentual de viabilidade celular. Na figura 27 o grupo controle (C) representa a totalidade no percentual de viabilidade, que representa as células mantidas em condições de aerobiose. Após submeter o cultivo ao procedimento de I/R sem o tratamento com os metalofármacos, o modelo sobre a linhagem celular (grupo I/R) foi obtido, no qual reduz a viabilidade para aproximadamente 50%.

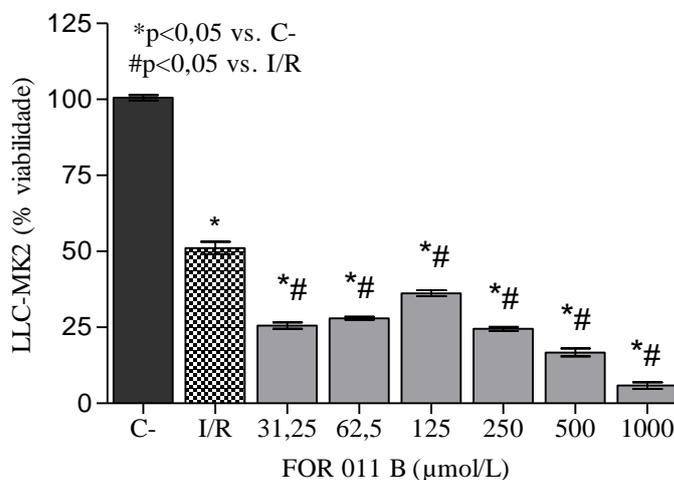
Submeteu-se as células ao modelo da câmara anaeróbica e, posteriormente, foi realizado o tratamento com o FOR011B e FOR811B dentro da respectiva faixa de concentração avaliada como não tóxica para LLC-MK2. Quando as concentrações de FOR011B não tóxicas para LLC-MK2 foram aplicadas sobre as células em processo de I/R, a toxicidade permaneceu causando até morte nas menores concentrações das concentrações em estudo (figura 22). Dessa forma, não foi dado continuidade com o metalofármaco FOR011B para os experimentos seguintes.

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

% Viabilidade das células LLC-MK2

Controle	100,5±0,91					
I/R	51,11±2,03					
	31,25 µmol/L	62,50 µmol/L	125 µmol/L	250 µmol/L	500 µmol/L	1000 µmol/L
FOR011B	25,57±1,01*#	28,01±0,46*#	36,24±0,95*#	24,5±0,67*#	16,73±1,30*#	5,85±1,08*#
FOR811B	45,46±1,01*	47,9±0,46*	31,02±0,81*#	20,97±0,58*#	27,68±2,15*#	5,14±0,90*#

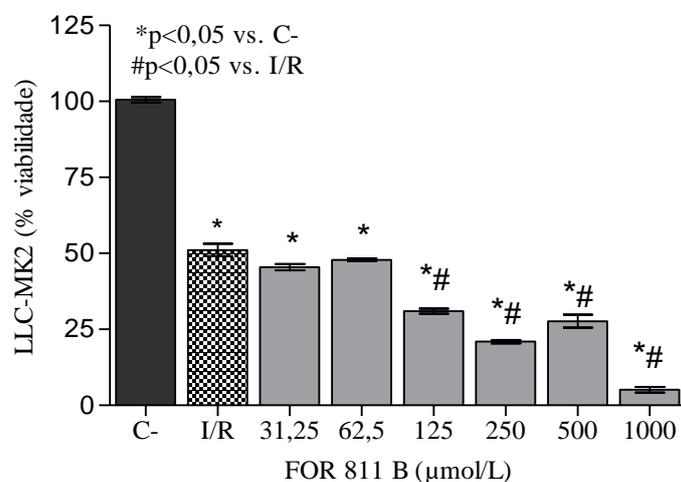
Figura 27- Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de FOR011B.



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

Para o metalofármaco FOR811B, conforme a figura 21 a concentração mínima encontrada sem efeito tóxico na linhagem estudada foi de 125 $\mu\text{mol/L}$, sendo a mesma tóxica para as células em processo de I/R. A figura 28 demonstra que os poços tratados com as concentrações 62,5 e 31,25 $\mu\text{mol/L}$ ao comparar com as células que passaram pelo processo de I/R não apresentaram diferença na viabilidade. Portanto, a menor concentração em estudo foi elencada para a verificação da influência da substância na respiração celular, utilizando rodamina 123, através da técnica da análise do potencial transmembrânico mitocondrial.

Figura 28- Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de FOR811B.

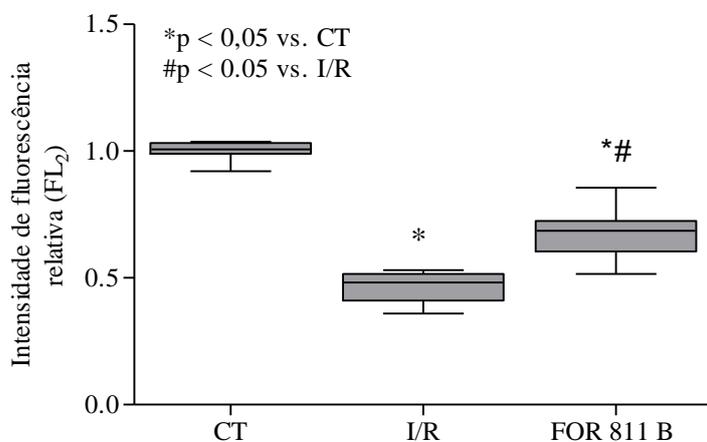


Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós teste de Tukey * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo I/R.

5.7 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial

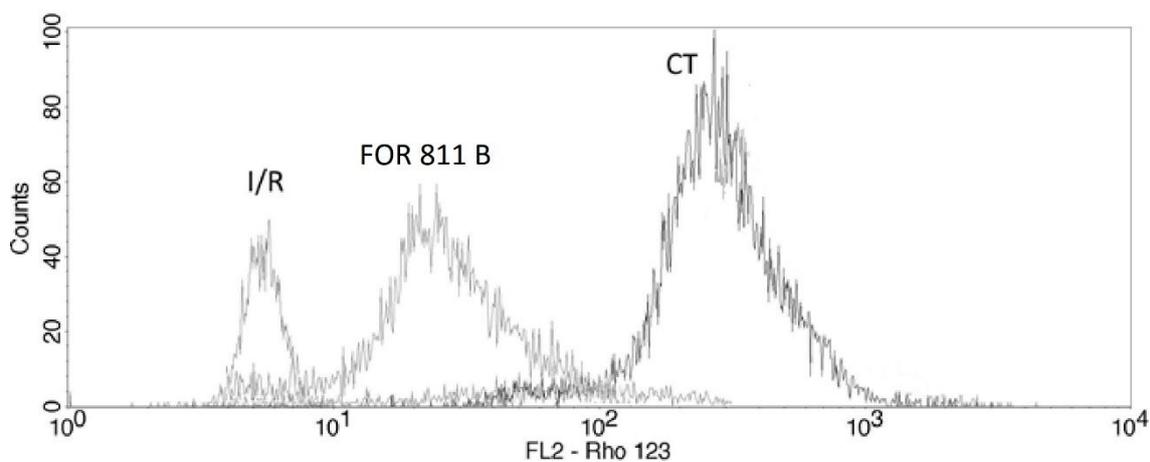
Rodamina 123 (Rho 112) é um corante que tem capacidade de revelar nas células viáveis as mitocôndrias, por sua vez avaliar o potencial mitocondrial. Através do método da câmara anaeróbica, as células LLC-MK2 submetidas ao processo de I/R tiveram a fluorescência relativa reduzida em comparação ao controle, conforme a figura 29. Na concentração estudada, o FOR811B, foi capaz de aumentar a fluorescência relativa nos poços tratados, demonstrando um potencial efeito protetor sobre o efeito de disfunção da respiração celular e da cadeia transportadora de elétrons causado pela lesão por I/R. Conforme a figura 30, o histograma representativo relativo à distribuição populacional da fluorescência, confirmando os dados estatísticos obtidos.

Figura 29- Análise da respiração celular pelo uso do corante rodamina.



No gráfico estão representados o grupo controle, I/R *in vitro* e tratadas com a menor concentração do FOR811B (31,25 $\mu\text{mol/L}$). Os experimentos foram realizados com $n=6$, e os dados expressos com razão de fluorescência relativa ao controle \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de pós teste de Tukey * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo isquemia

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



Estão representados o grupo I/R, tratado com FOR811B 31,25 $\mu\text{mol/L}$ e o controle. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

6 DISCUSSÃO

Foi realizado o estudo do órgão isolado para elucidar as possíveis alterações renais promovidas pelos mesmos, devido a esse modelo ser ideal para compreensão da fisiologia renal sem a interferência de mecanismos regulatórios sistêmicos (COSTA, 2016).

Ao investigar os parâmetros da pressão de perfusão (PP), observou-se que a pressão de perfusão aumentou no grupo do FOR011B nos tempos 90 e 120 ao comparar com o controle interno e, na comparação do grupo nitro com os grupos dos metalofármacos, só houve diferença significativa no FOR011B, onde houve também um aumento da pressão de perfusão nos tempos 60, 90 e 120. Ao analisar os dados da Resistência Vascular Renal (RVR) só houve acréscimo da mesma no grupo do FOR011B no tempo 120 em relação ao controle interno e, ao comparar o grupo nitro com as substâncias em estudo, houve diferença significativa apenas no metalofármaco 011 B onde aumentou a RVR nos tempos 60, 90 e 120. O aumento da PP e RVR pode relacionar-se diretamente com alguma atividade vasoativa do FOR011B sobre as arteríolas glomerulares aferentes e eferentes, provocando uma vasoconstrição e, conseqüentemente, aumento da pressão de perfusão (WAECKEL *et al.*, 2015). Esse aumento da PP ocorre devido a qualquer influência pressórica contrátil em um desses vasos, citados anteriormente, devido ao fato de serem componentes do sistema vascular com maior influência sobre o controle vasoativo (NORÕES, 2014). Para manutenção da hemodinâmica glomerular é de suma relevância o equilíbrio do tônus vascular das arteríolas aferentes e eferentes (ITO; ABE, 1997).

Em relação ao Fluxo Urinário (FU), houve um aumento nos tempos 90 e 120 do FOR011B e no tempo 120 do FOR811B ao comparar com o controle interno, assim como, também houve esse aumento no FU nos mesmos tempos e grupos ao realizar a comparação com o grupo nitro. Foi observado um decréscimo significativo no ritmo de filtração glomerular (RFG) aos 60 e 120 minutos do grupo nitro, no tempo 60 do grupo FOR011B e, em todos os tempos do grupo FOR811B quando comparou-se com o controle interno. Ao realizar a comparação do grupo nitro com os metalofármacos só houve aumento da RFG no tempo 120 de ambos os grupos. O *clearance* osmolar teve um acréscimo significativo nos grupos FOR011B e FOR811B nos tempos 90 e 120; 120 respectivamente, ao comparar com o controle interno. E, a mesma diferença significativa foi vista quando comparou o grupo nitro com os grupos dos

metalofármacos. Esse aumento do C_{OSM} pode relacionar-se ao aumento do fluxo urinário, que como visto anteriormente, aumentou igualmente nos mesmos tempos e grupos do estudo, uma vez que esse parâmetro é produto do fluxo urinário e da relação entre a osmolaridade urinária e do perfusato. Assim como, pode está diretamente relacionado ao aumento da osmolaridade da urina.

O início da formação da urina ocorre com uma grande quantidade de fluído que é praticamente livre de proteína e na cápsula de Bowman passa pelo processo de filtração, a partir dos capilares glomerulares. Com exceção das proteínas, a maior parte das substâncias no plasma são livremente filtradas, de forma que a concentração, praticamente, se iguala entre glomérulos e plasma. Determina-se o ritmo de filtração glomerular através do produto do coeficiente de ultrafiltração com as pressões de ultrafiltração dos capilares. Pressões hidrostáticas nos capilares glomerulares e na cápsula de Bowman compõe a pressão de ultrafiltração, assim como as pressões coloidosmóticas nesses dois segmentos também fazem parte. Modula-se a pressão hidrostática nos capilares glomerulares através da resistência das arteríolas aferentes e eferentes. Aumentar a resistência das arteríolas aferentes reduz a pressão hidrostática e o RFG. Porém, as dilatação dessas arteríolas causa aumento da pressão hidrostática e do RFG (GUYTON *et al.*, 2017).

Otras alterações observadas foram em relação ao transporte de eletrólitos em que houveram mudanças com os íons Na^+ , K^+ e Cl^- no transporte total e proximal. O percentual de transporte tubular total de sódio ($\%TNa^+$) reduziu significativamente aos 60 minutos dos grupos dos metalofármacos e manteve-se reduzindo até os 120 minutos, ao comparar com o controle interno e, para o grupo do nitro a redução ocorreu somente aos 120 minutos. Ao comparar o grupo nitro com o grupo dos metalofármacos houve diminuição significativa do $\%TNa^+$ no tempo 60 do FOR011B e aos 90 minutos reduziu para os dois grupos. Em relação ao percentual de transporte proximal de sódio ($\%TpNa^+$), ao realizar a comparação com o controle interno, também houve decréscimo significativo em todos os tempos dos grupos dos metalofármacos e aos 120 minutos do grupo nitro. Ao realizar a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B não houve significância entre os grupos. O percentual de transporte tubular total de potássio ($\%TK^+$) também reduziu significativamente em todos os grupos nos tempos 60, 90 e 120 ao comparar com seus controles internos. E ao realizar a comparação do grupo nitro com os demais grupos, não houveram significância entre os mesmos. Em relação ao percentual de transporte proximal de potássio (TpK^+) ocorreram

as mesmas alterações, onde o transporte proximal diminuiu significativamente em todos os tempos dos grupos em estudo e, a comparação do grupo nitro com os grupos FOR011B e FOR811B não obtiveram significância. Quando se analisou os dados do percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl⁻) houve redução significativa nos tempos 60, 90 e 120 dos grupos FOR011B e FOR811B e somente no tempo 120 do grupo nitro. Ao realizar a comparação do grupo nitro com os grupos dos metalofármacos, o grupo do FOR011B reduziu de maneira significativa em todos os tempos e, no grupo do FOR811B houve decréscimo nos tempos 90 e 120. Em relação ao percentual de transporte proximal de cloreto (%TpCl⁻) houve uma diminuição significativa nos tempos 60, 90 e 120 para todos os grupos em estudo e, a comparação do grupo nitro com os grupos dos metalofármacos, só houve diferença significativa no grupo FOR811B no tempo 120, onde reduziu significativamente o (%TpCl⁻).

Demonstrou-se que a infusão de óxido nítrico, em cães anestesiados, aumentou excreção de sódio, demonstrando ação direta do NO na excreção do eletrólito e diurese. Porém, não relacionou-se tais efeitos com alterações no RFG, dessa forma, pode estar sendo relacionado diretamente à função do transporte tubular (MAJID *et al.*, 1998).

O NO afeta hemodinâmica renal e funções tubulares renais em rim normal, além de causar diminuição da resistência das arteríolas aferentes e eferentes, ocasionando uma redução da atividade da bomba de Na⁺/K⁺/ATPase em consequência do decréscimo da reabsorção nos túbulos proximais (SRISAWAT *et al.*, 2015). Dessa forma, os experimentos do presente estudo corroboram com os estudos citados anteriormente, de acordo com os resultados que foram discutidos no parágrafo anterior, onde houve redução do percentual de transporte total e proximal dos eletrólitos Na⁺, K⁺ e Cl⁻ tanto dos metalofármacos em estudo como do grupo nitro.

Ao analisar os parâmetros vasculares, os quais sofreram alterações, entende-se que esses tiveram influência sobre a redução do ritmo de filtração glomerular e do aumento do fluxo urinário, demonstrando alterações da função renal em decorrência de alterações na hemodinâmica renal, uma vez que se sabe a influência direta do estado pressórico das arteríolas aferentes e eferentes renais no RFG e FU. A função renal pode ser avaliada em parte pela medida de filtração glomerular. Esse parâmetro renal é um fator de suma relevância na velocidade de formação da urina ou fluxo urinário. Através da influência da pressão, o perfusato é conduzido nos capilares do glomérulo. E devido a intensidade dessa pressão, parte dessa solução passa para a

cápsula de Bowman, formando o filtrado. O ritmo de filtração glomerular é fortemente influenciado pelo estado pressórico das arteríolas aferentes e eferentes que compõem os glomérulos. Contudo, esse não é o único fator determinante do RFG e, conseqüentemente, da formação de urina. Ao percorrer o sistema de túbulos nos néfrons, o filtrado tem influência de transportadores de eletrólitos e de água, o que interfere na sua composição ao longo do trajeto. Portanto, outros fatores determinantes do fluxo urinário são os transportes de eletrólitos e água ao longo dos túbulos renais (KOEPPEN *et al.*, 2009). Dessa forma, o aumento do fluxo urinário está diretamente correlacionado a diminuição do transporte de eletrólitos, uma vez que há maior quantidade de eletrólitos na luz tubular ocasionando natriurese e, conseqüentemente, diurese (DOBROWOLSKI *et al.*, 2015).

Devido ao fato dos compostos em estudo serem responsáveis por perdas significativas de eletrólitos, conduz a explicação da redução do ritmo de filtração glomerular (RFG), por meio do sistema de *feedback* túbulo-glomerular, que tem a finalidade de alcançar à autorregulação renal. Já que se sabe que os mecanismos vasculares envolvidos na queda desse parâmetro normalmente relacionam-se este *feedback*. Devido a altas concentrações de eletrólitos nas porções finais dos túbulos distais, esse mecanismo de defesa é ativado, especificamente na mácula densa. Essa estrutura é capaz de determinar a concentração de eletrólitos do filtrado que deixa a alça de Henle, uma vez que um sinal químico é enviado à arteríola aferente. Essas ações levam a vasoconstrição de início rápido, redução do fluxo sanguíneo e da pressão hidrostática, predominantemente no córtex externo, causando uma redução no RFG, natriurese e diurese (MUNGER *et al.*, 2012). Ainda não se tem as explicações a cerca de como acontece esse sinal (ZATZ, 2012). Em pequenos casos, esse mecanismo também pode ser executado, pela indução de vasodilatação da arteríola eferente. Proporcionando aumento da saída de sangue do glomérulo, causando uma redução na resistência dos capilares glomerulares, que leva a diminuição do filtrado glomerular (OLDROYD *et al.*, 2000; RIELLA, 2010).

Porém, os resultados encontrados neste estudo não corroboram com os mecanismos propostos acima, uma vez que houve redução do RFG, mas o fluxo urinário teve um aumento significativo, assim como o transporte de Na^+ diminuiu de maneira significativa e, em conseqüência ocasionou natriurese. Contudo, a infusão renal de um doador de NO, aumentou a excreção de sódio, demonstrando que os efeitos diretos do NO são natriuréticos e diuréticos (MAJID *et al.*, 1998; MAJID; WILLIAMS;

NAVAR, 1993). Esses efeitos não são associados diretamente com mudanças na taxa de filtração glomerular, indicando que há efeitos diretos sobre a função de transporte tubular (MAJID; NAVAR, 2001). Aumentos no GMPc induzidos pelo NO são eficientes para antagonizar os efeitos da angiotensina II (Ang II) que é responsável pela contração (SHULTZ *et al.*, 1990). Peptídeo natriurético atrial que causa aumento de GMPc das células mesangiais, devido a ativação de guanilato ciclase, também é responsável por antagonizar Ang II (APPEL *et al.*, 1986). Sabe-se que Ang II é responsável por uma maior vasoconstrição na arteríola eferente do que a que causa na arteríola aferente, em contrapartida, o peptídeo natriurético atrial dilata a arteríola aferente e contrai a eferente (ITO *et al.*, 1993; MARIN-GREZ; FLEMING; STEINHAUSEN, 1986). REN *et al* (2001) demonstraram que a dilatação da arteríola aferente induzida por alterações de NaCl na mácula densa foi mediada por um receptor A2 de adenosina, levando a crer que adenosina pode ser produzida na mácula densa ou células mesangiais e é responsável, por mediar o *feedback* túbulo-glomerular das arteríolas aferentes e eferentes. Dessa forma, diante dos resultados expostos anteriormente, infere-se que o metalofármaco FOR011B possa agir através de ações semelhantes ao ANP, devido a inibição de NO na mácula densa, ocasionando vasoconstrição da arteríola aferente, aumentando PP, RVR e, conseqüentemente, reduzindo o RFG.

Ao analisar as comparações realizadas entre o grupo nitro com os metalofármacos em estudo, percebeu-se que o FOR011B obteve mais diferenças significativas em relação ao grupo nitro, demonstrando que o complexo de rutênio FOR811B possui uma maior semelhança com composto nitroprussiato, reforçando a teoria de que esse composto é doador de NO.

A lesão renal aguda possui diversas causas entretanto, a de maior relevância é a isquemia e reperfusão (RAO *et al.*, 2017). Diversos órgãos são acometidos pelos danos da isquemia e, adicionalmente, efeitos mais sérios são causados após a reperfusão desses órgãos. As principais causas da isquemia são transplante renal, choque, cirurgia vascular, parada cardíaca com recuperação, além de ser uma causa comum de morte celular e falência renal (BRITO *et al.*, 2017; MENKE *et al.*, 2014). A fisiopatologia da lesão renal por isquemia e reperfusão é multifatorial e envolve estes processos: resposta inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e hipóxia causada por depleção de ATP (WEI *et al.*, 2017). Os efeitos deletérios da lesão por isquemia e reperfusão podem ser atenuados por intervenções medicamentosas que causem

vasodilatação na reperfusão, durante sua fase inicial, que promovem uma melhora no fluxo sanguíneo e oxigenação renal, dessa forma há preservação da função renal ou uma atenuação dos efeitos danosos. Associado a isso, as substâncias doadoras de NO que vão agir pela via GCs/GMPC podem beneficiar a reperfusão ao favorecer a biodisponibilidade de NO que se reduz no processo de lesão por isquemia (HOOSGOOD *et al.*, 2014).

Existem diferentes substâncias que possuem atividade vasodilatadora, dentre elas estão os complexos de nitrosil-rutênio como estudo mostra por Silva (2009). Há outros estudos que apontam que esses complexos agem através da doação de NO e, que apresentam vantagens de serem menos tóxicos, além de uma boa aplicabilidade na clínica (VATANABE *et al.*, 2017).

Com o objetivo de investigar as ações mais diretas dos metalofármacos e estudar a fisiopatologia da injúria por I/R, realizou-se os ensaios de citotoxicidade e avaliação da respiração celular *in vitro*. Para realização desses, utilizou-se a linhagem de células LLC-MK2, uma vez que são uma linhagem de células imortalizadas de túbulos proximais de macacos (*Macaca mulata*) sendo essas utilizadas com grande frequência em estudos de citotoxicidade (HULL *et al.*, 1962).

Para o FOR011B a menor concentração sem efeito tóxico na linhagem estudada foi 62,5 $\mu\text{mol/L}$, onde não houve diminuição da viabilidade celular. Em relação ao FOR811B, houve efeitos tóxicos a partir da concentração 250 $\mu\text{mol/L}$ e nas concentrações inferiores a esta, não houveram alterações significativas na viabilidade, o que mostra que não há efeitos tóxicos nestas. Esses achados demonstram um perfil mais tóxico do FOR011B em relação ao FOR811B. As células foram submetidas ao processo de I/R, onde houve diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle. Ao realizar o tratamento dessas células, com as concentrações dos metalofármacos que não foram tóxicas, os compostos em estudo não foram capazes de reverter o processo de isquemia, pois não houve aumento da viabilidade celular em relação ao grupo isquêmico. Porém, não foi descartada a possibilidade dessas substâncias possuírem um papel protetor devido à propriedades antioxidantes intrínsecas. Dessa forma existem estudos que demonstram o potencial antioxidante dos complexos de rutênio (SANTANA *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2017) e, devido ao fato de LRA por I/R causar interferência na função mitocondrial, através da modulação dessas, (KURIAN; PEMAIH, 2014), foi avaliado o potencial mitocondrial, por meio da técnica de citometria de fluxo, nas células que foram submetidas ao processo de

isquemia/reperfusão. Pelo fato da toxicidade do FOR011B ter permanecido, mesmo nas concentrações menores, ao realizar o tratamento da I/R, a substância foi descartada e não foi dada continuidade nos experimentos para avaliação do potencial mitocondrial. Os resultados da avaliação do potencial mitocondrial, ao utilizar a menor concentração, 31,25 $\mu\text{mol/L}$, foi capaz de aumentar a fluorescência dos poços tratados, demonstrando seu potencial efeito protetor sobre a disfunção da respiração celular e da cadeia transportadora de elétrons que são causados pela I/R. Devido ao fato do FOR011B não possuir papel protetor em relação ao isquemia, e o FOR811B foi capaz de fazê-lo, essas achados conduzem que o perfil antioxidante do composto está diretamente relacionado a presença do NO na molécula do FOR811B, uma vez que o FOR011B não o possui.

O sistema NADPH-oxidase e mitocôndria são alguns dos mecanismos que produzem espécies reativas de oxigênio (ERO). A cadeia respiratória mitocondrial pode ser desequilibrada pelo processo de hipóxia, o que resulta em acúmulo de elétrons e uma produção subjacente de ERO, que pode causar danos teciduais diretos devido a uma produção excessiva, especialmente morte celular programada (MAIANSKI *et al.*, 2004). Funções importantes no metabolismo celular e sinalização redox são realizadas pelas mitocôndrias. Além do fato, dessas serem responsáveis pela produção de EROs. Glicólise e fosforilação oxidativa são reações redox de grande relevância ao metabolismo energético, que são catalisadas por várias desidrogenases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida, NAD(H). Por meio da cadeia de respiração mitocondrial, gera-se ATP através das moléculas de NADH oxidadas, onde são utilizadas para marcação de função mitocondrial (ZHAO; YANG, 2016). Através de estudo elaborado com complexos de rutênio, demonstrou-se uma rápida liberação de NO pelos compostos em análise, além da relevância do potencial de redução, que se mostrou efetivo para sistemas biológicos. Adicionalmente, foi mostrado que a oxidação mitocondrial de NADH era concomitante a redução do complexo nitrosil-rutênio e, que componentes intracelulares eram capazes de reduzir o grupo nitrosil (TOLEDO JUNIOR *et al.*, 2002).

No ensaio de dosagem de nitrito/nitrato, o complexo de rutênio FOR811B causou um aumento significativo em relação ao grupo controle, mas não houve significância ao comparar com o grupo nitro. Entretanto, o grupo FOR011B não teve significância em relação ao grupo controle, muito menos, em comparação com grupo nitro. Em um estudo com modelo de lesão gástrica, observou-se um aumento

significativo da concentração de nitrito/nitrato (NO_x) no conteúdo gástrico de camundongos submetidos a tratamento com nitrosil-rutênio (SANTANA, 2013). Os resultados mostram a capacidade do FOR811B ser doador de NO, após a perfusão do rim isolado com 1 μmol/L do complexo de rutênio em estudo.

Com relação a avaliação do estresse oxidativo, os grupos em estudo não apresentaram significância dos níveis de GSH nos tecidos renais após a perfusão. Entretanto, o metalofármaco FOR811B se comportou de maneira mais semelhante ao grupo nitro, onde houve uma tendência para aumentar os níveis de GSH em relação ao controle, demonstrando um potencial efeito antioxidante do FOR811B. O grupo FOR011B demonstrou uma tendência de reduzir os níveis de GSH, inferindo uma característica desse composto causar desequilíbrio redox, uma vez que uma redução dos níveis de GSH é visto como prova desse desequilíbrio (GIUSTARINI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2017).

Ao avaliar os níveis de GMPc urinários, percebe-se que o grupo FOR811B não obteve aumento significativo, inferindo-se que esse metalofármaco não doa NO através do mecanismo via ativação de GCs/GMPc. Contudo, algumas evidências recentes, sugerem que a vasodilatação mediada por NO ocorre não apenas pela ativação de guanilil ciclase, mas também por meio da ativação de canais de K⁺ dependente de Ca²⁺ nas células da musculatura vascular (GOLAN *et al.*, 2014). O NO age através de uma ativação direta dos canais de K⁺ por meio de um mecanismo independente de guanilil ciclase, levando a uma hiperpolarização das células e, conseqüentemente, à vasodilatação (GOLAN *et al.*, 2014). Em contrapartida, o grupo FOR011B teve uma tendência a aumentar os níveis de GMPc, levando a crer que esse complexo de rutênio tem a capacidade de ativar guanilil ciclase. Porém, somente com esse resultado não se pode elucidar que esse metalofármaco age por tal mecanismo.

A análise histológica do rins perfundidos pelos metalofármacos em estudo e pelo nitroprussiato na concentração de 1,0 μmol/L demonstrou alterações como atrofia glomerular, deposição de material protéico intraglomerular, tumefação tubular e degeneração tubular. Ao ser realizado os experimentos em células LLC-MK2, houve toxicidade para os dois grupos dos metalofármacos, nas concentrações maiores demonstrando ter uma relação dose-dependente. Como também, a alteração nos transportes dos eletrólitos causadas pelos metalofármacos FOR011B e FOR811B e, pelo nitroprussiato podem estar diretamente relacionadas às alterações tubulares que foram

demonstradas na histologia. Em relação ao grupo nitro, onde utilizou-se o nitroprussiato que é um fármaco anti-hipertensivo muito utilizado na clínica, apresenta uma toxicidade dose-dependente na qual é comprovada e atribuída, principalmente, pela produção de cianeto, liberação de NO e de espécies reativas (GOC *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, os complexos de rutênio têm sido alvo de investigação devido à sua capacidade de doar NO. Em vários sistemas, já é sabido sua capacidade em relaxar vasos. No presente estudo, o metalofármaco FOR811B teve um potencial efeito antioxidante, assim como também foi capaz de aumentar a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no tecido renal, revelando sua capacidade em doar NO.

7 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que o metalofármaco FOR011B (1 μ mol/L) foi capaz de alterar parâmetros da hemodinâmica renal tais como: aumento da pressão de perfusão e resistência vascular renal; diminuição do ritmo de filtração glomerular; aumento do fluxo urinário e a diminuição do clearance osmolar e os transportes totais e proximais dos eletrólitos.

O complexo de rutênio FOR811B (1 μ mol/L), nos parâmetros de hemodinâmica renal, foi capaz de induzir aumento do fluxo urinário, diminuição do ritmo de filtração glomerular e clearance osmolar; causou também decréscimo dos transportes totais e proximais dos eletrólitos.

Apenas o FOR811B demonstrou efeito protetor sobre a disfunção da respiração celular e da cadeia transportadora de elétrons causado pela lesão por I/R nas análises em linhagens de células LLC-MK2, assim como foi capaz de aumentar os níveis de (NOx) na dosagem de nitrito/nitrato. Entretanto, faz-se necessário futuros experimentos para investigar o mecanismo pelo qual o FOR811B tem a capacidade de doar óxido nítrico de maneira controlada e em níveis subtóxicos, para que possa ser utilizado terapêuticamente de maneira eficaz e segura.

8 REFERÊNCIAS

- APPEL, R. G.; WANG, J.; SIMONSON, M.S.; DUNN, M. J.: A mechanism by which atrial natriuretic factor mediates its glomerular actions. **Am J Physiol.** 251:F1036—F1042, 1986.
- BASILE, D. P.; YODER, M. C. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 14, n. 1, p.3-14, 2014.
- BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Comparison of the mechanism underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium Nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**. v. 46, p. 215-222, 2007.
- BERALDO, H. **Contribuições da química inorgânica para a química medicinal.** Cadernos temáticos de Química Nova na Escola, 6, 4-6, 2005.
- BRIONI J.D., NAKANE M., HSIEH G. C., MORELAND R. B. KOLASA T., SULLIVAN J. P. Activators of soluble guanylatecyclase for the treatment of male erectile dysfunction. **Int J Impot Res.** v. 14, n. 1, p. 8-14, 2002.
- BUTLER, A.R.; NICHOLSON, R. Life, death, and nitric oxide. 1a ed. London, **Royal Society of Chemistry**, p.140, 2003.
- CALANDRELI, I.; TFOUNI, E. **Reatividade química e eletroquímica de trans[RuCl(NO)(py)₄]²⁺.** In: XV Encontro Regional de Química, Ribeirão Preto, 2005.
- CERQUEIRA, J. B. G. **Identificação dos mecanismos envolvidos no relaxamento da musculatura lisa cavernosa e da aorta de coelho, induzido por doadores de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio, 2008.** Tese de Doutorado. (Doutorado em Cirurgia) – Universidade Federal do Ceará.
- CLARKE, M. J. SUGEL, H; DEKKER, M. **Metal ions in Biological Systems.** New York, 242, 1980.
- CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews.** 232 (1-2), p.69-93, 2002.
- COSTA, L. L. M. **Toxicidade oral aguda e avaliação dos efeitos pressóricos e renais causados pela quinona oncocalicxona A isolada da *Auxemma oncocalyx*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

COSTA, M. F. B. **Estudo do efeito nefroprotetor do extrato alcoólico do de *Própolis vermelha em um modelo de lesão renal aguda por isquemia/reperfusão em ratos***. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

COSTA, C. O. S.; ARAÚJO NETO, J. H.; BALIZA, I. R. S.; DIAS, R. B.; VALVERDE, L. DE F.; VIDAL, M. T. A.; SALES, C. B. S.; ROCHA, C. A. G.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; BATISTA, A. A.; BEZERRA, D. P. Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p.104367-104392, 2017.

CRAVER, E.; MCCRATE, A.; NIELSEN, M.; SWAVEY, S. Tris-ruthenium(II)/coper(II) multimetallic porphyrin: Synthesis, characterization, DNA binding and supercoiled DNA photocleavage studies. **Inorganica Chimica Acta**. 363(2), p. 453-456, 2010.

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

DUSSE, L. M. S., VIEIRA, L. M., CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003

FORD, P. C.; WINK, D. A.; STANBURY, D. M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. **FEBS Lett**; 326: 1-3, 1993.

FRICKER, S. P. **Metal based drugs: from serendipity to design**. Dalton Trans:4903-17, 2007.

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

GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A. H.; ARMSTRONG, E. H.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

HAMBLEY, T. W. Chemistry.Metal-based therapeutics. **Science** 318:1392-3, 2007

HOLLENBERG, N.K. Renal function in the patient with hypertension. **Med Clin N Am** 88:131-40, 2004.

HOSGOOD, S. A.; RANDLE, L. V.; PATEL, M.; WATSON, C. J.; BRADLEY, J. A.; NICHOLSON, M. L. Sildenafil citrate in a donation after circulatory death experimental model of renal ischemia-reperfusion injury. **Transplantation**, v. 98, p. 612-617, 2014.

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

HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. GROWTH. Characteristics of monkey kidney cell strains llc-mkt, llc-mk2, and llc-mk~(nctc-3196) and their utility in virus research. **Kidney cell strains**, p.903-017, 1962.

ITO, S., ARIMA, S., REN, YL et ai. O fator relaxante derivado do endotélio / óxido nítrico modula a ação da angiotensina II na arteríola aferente isolada, mas não eferente, de coelho microperfundida. **J Clin Invest** . 1993 ; 91 : 2012–2019.

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

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

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

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

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

Kidney Disease; Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. Available: http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/KDIGO%20AKI20Guideline.pdf. Accessed February 5, 2015.

KO, S.; VENKATESAN, S.; NAND, KUSHMA; LEVIDIOTIS , V.; NELSON, C.; JANUS, E. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems coding underestimates the incidence and prevalence of Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease in General Medical Patients. **Inter. Med. J.**, 2017. No prelo.

KURIAN, G. A.; PEMAIH, B. Standardization of *in vitro* Cell-based Model for Renal Ischemia and Reperfusion Injury. **Indian J Pharm Sci.**, v.76, n.4, p.348-353, 2014.

LEE, V.G.; JOHNSON, M. L.; BAUST, J.; LAUBACH, V.E.; WATKINS, S.C.; BILLIAR, T. R. The roles of iNOS in liver ischemia-reperfusion injury. **Shock.** 16:355-60, 2001.

LEE, J. U. Nitric oxide in kidney: its physiological role and pathophysiological implications. **Electrolyte & Blood Pressure, Korean**, v. 6, n. 27, p. 27-34, 2008.

LEE, I. C.; KO, J. W.; PARK, S. H.; SHIN, N. R.; SHIN, I. S.; KIM, Y. B.; KIM, J. C. Ameliorative effects of pine bark extract on cisplatin-induced acute kidney injury in rats. **Ren Fail.**, v.39, n.1, p.363-371, 2017.

LEGOUIS, D. *Ex vivo* analysis of renal proximal tubular cells. **BMC Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 1-11, 2015.

LUNARDI, C.N.; SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 42: 87-93 ISSN 0100-879X Review, 2009.

MAJID, D.S., NAVAR, L.G. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. **Am J Hypertens** 14:74S–82S, 2001.

MAJID, D.S.A., OMORO, S.A., CHIN, S.Y., NAVAR, L.G. Intrarenal nitric oxide activity and pressure natriuresis in anesthetized dogs. **Hypertension** 32:266–272, 1998.

MAJID, D.A.S., WILLIAMS, A., NAVAR, L.G. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. **Am J Physiol** 264:F79–F87, 1993.

MARIN-GREZ, M., FLEMING, J. T. E. STEINHAUSEN, M. O peptídeo natriurético atrial causa vasodilatação pré-glomerular e vasoconstrição pós-glomerular no rim de ratos. **Natureza** . 1986 ; 324 : 473–476.

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

MESTRONI, G.; ZASSINOVICH, G.; ALESSIO, E.; BOMTEMPI, A.; Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. **Inorganic Chim Acta**. 137, 63, 1987.

MUNGER, K. A. et al. The Renal Circulations and Glomerular Ultrafiltration. In: TAAL, M. W. et al. (Eds.) **Brenner & Rectors – The Kidney**. 9. Ed. Philadelphia: Saunders, p. 94-137, 2012.

NOROES, T. B. S. **Efeitos renais promovidos por polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria córnea***. 2014. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OLDROYD, S. D. et al. Effects of adenosine receptors antagonists on the responses the contrast media in the rat isolated kidney. **Clin. Sci**. v.98, p.303- 311, 2000

ORVIG, C.; ABRAMS, M.J. ; Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chem. Rev.** 2201, 1999.

PEREIRA, E. R. S.; PEREIRA, A. C.; ANDRADE, G.B.; NAGHETTINI, A.V.; PINTO, F. K. M. S.; BATISTA, S. R.; MARQUES, S. M. Prevalência de doença renal

crônica em adultos atendidos na Estratégia de Saúde da Família. **J Bras Nefrol**, 38(1):22-30.,2016.

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

RANG, H. P.; DALE, M. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 14-42, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8ª ed. Elsevier, p. 237-241, 2016.

RAO, K.; SETHI, K.; ISCHIA, J.; GIBSON, L.; GALEA, L.; XIAO, L.; YIM, M.; CHANG, M.; PAPA, N.; BOLTON, D.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S.; PATE, O. Protective effect of zinc preconditioning against renal ischemia reperfusion injury is dose dependente. **Plos One**, v.12, n.7, 2017.

REISNER, E.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K; POMBEIRO, A. J. L. Electrontransfer activated metal-based anticancer drugs. **Inorganica Chimica Acta**. 361, 1569-1583, 2008.

RIELLA, M.C. Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1264, 2010.

RIJIT, S. H. VAN; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the devolpment of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, 14, 1089-1097, 2009.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escheria coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**. 205, 698, 1965.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSCO, J. E.; MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**. 222, 385, 1969.

SANTANA, A. P. M. **Efeito protetor do nitrosil-rutênio [Ru(bpy)2(SO3)NO](PF6) em modelos experimentais de lesões gástricas em camundongos- envolvimento da via NO/GCs/K_{ATP}**. 2013. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SANTANA, A. P. M.; TAVARES, B. M.; LUCETTI, L. T.; GOUVEIA JR., F. S.; RIBEIRO, R. A., SOARES, P. M. G.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F.; MEDEIROS, J. V. R.; SOUZA, M. H.L.P. The nitric oxide donor cis [Ru(bpy)2(SO3)NO](PF6) increases gastric mucosa protection in mice – Involvement of the soluble guanylate cyclase/KATP pathway. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 35-42, 2015.

SANTOS, E.S.; MARINHO, C. M. S. Principais causas de insuficiência renal aguda em unidades de terapia intensiva: intervenção de enfermagem. **Rev. Enf. Ref. III(9)**: 181-9, 2013.

SANTOS, R. L. G.; DE OLIVEIRA, D. R. F.; NUNES, M. G. S.; BARBOSA, R. M. P.; GOUVEIA, V. D. A. Evaluation of the knowledge of chronic renal patients in

conservative treatment about dialytic modalities. **Journal of Nursing UFPE** on line, 9(2), 651-660, 2015.

SHAH, V.; HADDAD, F.G.; GARCIA-GARDENA, G.; FRANGOS, J.A.; MENNONE, A.; GROSZMANN, R. J.; SESSA, W.C. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide regulation of resistance in the hepatic sinusoids. **J Clin Invest.** 100:2923-30, 1997.

SILVA, D. O. Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drug as metallopharmaceuticals in cancer therapy, **Anticancer agents in medicinal chemistry**, 10, 4, 312-23, 2010.

SILVA, F. O. N.; ARAÚJO, S. X. B.; HOLANDA, A. K.; MEYER, E.; SALES, F. A. M.; DIÓGENES, I. C. N.; CARVALHO, I. M. M.; MOREIRA, I. S.; LOPES, L. G. F.; Synthesis, characterization, and NO release study of the Cis and trans $[\text{Ru}(\text{bpy})_2 - (\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$ Complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**. v. 2006, n.10, p. 2020-2026, 2006.

SILVA, J.J.N.; OSAKABE, A.L.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.N.; FRANCO, D.W.; In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities ruthenium NO donors. **British Journal of Pharmacology**, v.152, p.112-121, 2007.

SILVA, J.J.N.; PAVANELLI, W.R.; SALAZAR GUTIERREZ, F. R.; LIMA, F. C. A.; SILVA, F. B. A.; SILVA, J. S.; FRANCO, D.W. Complexation of the anti-trypanosoma cruzi drug benznidazole improves solubility and efficacy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 4104-4114, 2008.

SINGH, A.P., MUTHURAMAN, A., JAGGI, A.S., SINGH, N., GROVER, K., HAWAN, R. Animal models of acute renal failure. **Pharmacol Rep.**, v.64, p.31-44, 2012.

SHULTZ, P.J.; SCHORER, A.E.; RAIJ, L.: Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. *Am J Physiol.* 258:F162—F167, 1990.

SYKES, A. G. Reactions of Complexes of Platinum Metals with Bio-Molecules Platinum. **Met. Rev.** 32, 170, 1988.

TOLEDO JÚNIOR, J. C.; LOPES, L. G. F.; ALVES, A. A.; SILVA, L. P.; FRANCO, D. W. Release of NO by a nitrosyl complex upon activation by the mitochondrial reducing power. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.89, p.267–271, 2002.

TORSONI, A. S.; DE BARROS, B. F.; TOLEDO, J.R.; HAUN, M.; KRIEGER, M. H.; TFOUNIE.; FRANCO, D. W. “Hypotensive Properties and Acute Toxicity of trans- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})(\text{PF}_6)_3]$, a New Nitric Oxide Donor”. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 6(3), p. 247, 2002.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Cood Chem.**, v.236: 57-69, 2003.

ÜLGER, F.; KÜÇÜK, M. P.; KÜÇÜK, A. O.; İLKAYA, N. K.; MURAT, N.; BILGIÇ, B.; ABANOZ, H. Evaluation of acute kidney injury (AKI) with RIFLE, AKIN, CK, and KDIGO in critically ill trauma patients. **Eur J Trauma Emerg Surg.**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00068-017-0820-8>> Acesso em 26 de janeiro de 2018.

VATANABE, I. P.; RODRIGUES, C. N. S.; BUZINARI, T. C.; MORAES, T. F.; SILVA, R. S.; RODRIGUES, G. J. Ruthenium Complex Improves the Endothelial Function in Aortic Rings From Hypertensive Rats, **Arq Bras Cardiol.**, v. 109, n. 2, p. 124-131, 2017.

WAECKEL, L.; BERTIN, F.; CLAVREUL, N.; DAMERY, T.; KÖHLER, R.; PAYSANT, J.; VESTRI-MOREL, P. S.; SIMONET, S.; VAYSSETTES-COURCHAY, C.; WULFF, H.; VERBEUREN, T. J.; FÉLÉTOU, M. Preserved regulation of renal perfusion pressure by small and intermediate conductance K_{Ca} channels in hypertensive mice with or without renal failure. **European Journal of Physiology**, v. 467, n. 4, p.817-831, 2015.

WEE, H. A.; DYSON, P. J. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: Towards targeted chemotherapy. **Eur. J. Inorg. Chem.**, 20, 4003–4018, 2006.

WEI, J.; SONG, J.; JIANG, S.; ZHANG, G.; WHEELER, D.; ZHANG, S.; LAI, E. Y.; WANG, L.; BUGGS, J.; LIU, R. Role of intratubular pressure during the ischemic phase in acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.312:,p. F1158–F1165, 2017.

WIN, D. A.; GRISHAM, M. B.; MITCHELL, J. B.; FORD, P. C. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. **Methods Enzymol**, 268: 12-31, 1996.

WINK, D.A.; DARBYSHIRE, J. F.; NIMS, R.W.; SAAVEDRA, J.E.; FORD, P.C. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/ O₂ reaction. **Chem Res Toxicol** . 6: 23-27, 1993.

WONG, S. K.; GARBERS, D. L. Receptor guanylyl cyclases. **J Clin Invest.** 90: 299-305, 1992.

ZANATTA, Claudete Maria et al. Papel do sistema endotelina na nefropatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab**[online], v. 52, n. 4, p. 581-588, 2008.

ZANICHELLI, P. G.; MIOTTO, A. M.; ESTRELA, H. F.; SOARES, F.R.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C., et al. The [Ru(Hedta)NO](0.1-) system: structure, chemical reactivity and biological assays. **J Inorg Biochem.** 98: 1921-1932, 2004.

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

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

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