

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EDUARDO FRIZZERA MEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia uniflora* NA LESÃO
RENAL AGUDA EXPERIMENTAL**

VITÓRIA

2017

EDUARDO FRIZZERA MEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia uniflora* NA LESÃO
RENAL AGUDA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava

VITÓRIA
2017

EDUARDO FRIZZERA MEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia uniflora* NA LESÃO
RENAL AGUDA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 20 de dezembro de 2017.

Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava – Orientadora, UFES

Prof Dr. Roger Lyrio, UFES

Prof. Dr. Leonardo dos Santos, UFES

Prof. Dr. Breno Valentim, UFES

Profa. Dra. Bianca Prandi Campagnaro, UVV

Vitória

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai, e a seu filho Jesus, por sempre guiar nos caminhos corretos e estar presente nos momentos em que mais precisamos.

Aos meus avós, Vanda e Riva (*in memoriam*), por toda a educação e ensinamentos com os quais me criaram.

Aos meus pais pelo incentivo ao estudo e por nunca permitirem que eu desistisse dos meus sonhos e ao meu irmão Guilherme por todo o apoio.

A minha orientadora e grande amiga Ágata Lages Gava, pelos conselhos, orientações e ensinamentos que foram muito importantes nessa caminhada de estudos, muito obrigado pelas oportunidades e pelas lutas.

À Fabiana e o meu filho Pedro, por todo amor, compreensão e incentivo. Vocês sempre foram e serão muito importantes na minha vida. Não posso esquecer da minha princesa Maria Eduarda que ajudou no processo de finalização da tese.

Aos professores Vasquez e Silvana, por me receberem no laboratório. Obrigado pela paciência, pelas discussões de ideias, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Ao professor Marcelo Baldo pelo incentivo e ajuda no início da caminhada rumo ao doutorado

Muito obrigado os colegas da Pós-Graduação, Ananda, Marcos pois sem eles a vida no laboratório não teria graça. Ainda aos colegas: Simone, Fabrício, Gustavo, Thiago Menezes, Marcela, Rafaela, Jamila, Paula, Elis pois ajudaram muito no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os conhecimentos transmitidos, que foram de particular importância para realização deste trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Pitangueira que foi coletada as folhas B) frutos e folhas da pitangueira –	19
Figura 2: Fotos ilustrativas do procedimento de isquemia/reperfusão renal.	25
Figura 3: Taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de inulina	35
Figura 4: Fluxo plasmático renal avaliado pelo clearance de PAH.....	36
Figura 5: Quantificação do fluxo sanguíneo renal	37
Figura 6: Avaliação da resistência vascular renal	38
Figura 7: Produção de ânion superóxido. Quantificação da produção de ânion superóxido no Córtex (A) e Medula (B) renal	39
Figura 8: Produção de peróxido de hidrogênio. Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio no Córtex (A) e Medula (B) renal.	40
Figura 9: Produção de peroxinitrito e hidroxila. Quantificação da produção peroxinitrito e hidroxila no Córtex (A) e Medula (B) renal.	41
Figura 10: Avaliação da capacidade enzimática antioxidante de células renais.	42
Figura 11: Análise por Western blot das enzimas SOD e Catalase em tecido renal dos animais tratados e não tratados com EU.....	43
Figura 12: Avaliação das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio em células de tecido renal.	44
Figura 13: Detecção de apoptose por citometria de fluxo com Anexina-V e IP.....	46
Figura 14: Análise de regressão linear e correlação entre apoptose (% de células positivas para Anexina) e produção de espécies reativas de oxigênio (fluorescência do DHE).	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da LRA de acordo com os critérios KDIGO. Adaptado de “KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012.	14
Tabela 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato obtido das folhas de <i>E. uniflora</i> (EU).	34

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada por um rápido e potencialmente reversível declínio na função renal; no entanto, o tratamento atual da LRA não é específico e está associado a cuidados de suporte limitados. Considerando a necessidade de novas abordagens terapêuticas, acreditamos que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* (*pitanga*) por possuir propriedades antioxidantes, pode ser benéfico para o tratamento da LRA induzida por isquemia/reperfusão renal (I/R).

O extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* (200mg/kg, oral) ou veículo (salina 0,9%) foram administrados a ratos Wistar machos anteriormente à indução da isquemia renal bilateral (45 minutos). Após 24 horas de reperfusão, os *clearances* de inulina e paraminohipurato foram realizados para determinar a taxa de filtração glomerular (TFG), o fluxo plasmático renal (FPR), o fluxo sanguíneo renal (FSR) e a resistência vascular renal (RVR). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a apoptose renal foram avaliados por citometria de fluxo. As avaliações da expressão das enzimas antioxidantes foram realizadas por meio da técnica de Western blot. Média \pm EPM. ANOVA 2 vias, teste post hoc de Tukey, $p < 0,05$.

Os resultados demonstraram efeito protetor do extrato de *Eugenia uniflora* na dose utilizada. A administração do extrato de EU preveniu as alterações induzidas pela I/R sobre a TFG (SH + VH $7,5 \pm 0,5$ / SH +EU $6,8 \pm 0,3$ / I/R+VH $2,9 \pm 0,1$ e I/R+EU $6,6 \pm 0,8$ mL/min/Kg), FPR (SH+VH: $16,7 \pm 1,4$ / SH+EU: $19,1 \pm 3,3$ / I/R+VH $4,6 \pm 0,6$ e I/R+EU $18,7 \pm 2,6$ mL/min/Kg), FSR (SH+VH: $26,3 \pm 3,0$ / SH+EU: $29,3 \pm 7,0$ / I/R+VH: $7,6 \pm 0,9$ e I/R+EU: $29,1 \pm 4,2$ mL/min/Kg) e RVR(SH+VH $4,6 \pm 0,7$ / SH+EU $5,7 \pm 2,0$ / I/R+VH $21,8 \pm 5,9$ e I/R+EU $4,5 \pm 1,1$ a.u.). Avaliando a produção de ROS o extrato foi capaz de impedir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nos animais I/R (SH+VH: $344,52 \pm 23$ / SH+EU: $332,2 \pm 13$ / I/R+VH $503,12 \pm 33$ e I/R+EU $370,69 \pm 27$ u.a). Essa prevenção do aumento de ROS está relacionada ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes SH+VH (catalase $0,710 \pm 0,090$ e SOD $0,271 \pm 0,046$); SH+EU (catalase $0,750 \pm 0,110$ e SOD $0,269 \pm 0,020$); I/R+VH (catalase $0,420 \pm 0,100$ e SOD $0,090 \pm 0,14$) e I/R+EU (catalase $0,080 \pm 0,200$ e SOD $0,209 \pm 0,037$). Ainda, o extrato foi capaz de prevenir apoptose nos animais I/R (SH+VH: 4.8 ± 1.25 /SH+EU: 4.9 ± 0.19 / I/R+VH 10.20 ± 1.2 e I/R+EU $3.9 \pm 0.9\%$), valores dos grupos). Estes resultados demonstram o efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* sobre a LRA.

Palavras chaves: isquemia/reperfusão, *Eugenia uniflora*, Lesão Renal Aguda

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is characterized by a rapid and potentially reversible decline in renal function; however, the current treatment of AKI is not specific and is associated with limited supportive care. Considering the need for new therapeutic approaches, we believe that the hydroalcoholic extract of leaves of *Eugenia uniflora* (pitanga) because of its antioxidant properties, may be beneficial for the treatment of RAI induced by renal ischemia / reperfusion (I / R).

Hydroalcoholic extract from *Eugenia uniflora* leaves (200mg / kg, oral) or vehicle (0.9% saline) was administered to male Wistar rats prior to the induction of bilateral renal ischemia (45 minutes). After 24 hours of reperfusion, clearances of inulin and paraminonitrothiazurate were performed to determine the glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), renal blood flow (RBF) and renal vascular resistance (RVR). The production of reactive oxygen species (ROS) and renal apoptosis were evaluated by flow cytometry. The evaluations of the expression of the antioxidant enzymes were performed by the Western blot technique. Mean \pm SEM. ANOVA 2-way, Tukey post-hoc test, $p < 0.05$.

The results showed protective effect of *Eugenia uniflora* extract at the dose used. Administration of the EU extract prevented I / R induced changes in GFR (SH + VH 7.5 ± 0.5 / SH + EU 6.8 ± 0.3 / I / R + VH 2.9 ± 0 , IPR + SH + VH: 16.7 ± 1.4 / SH + EU: 19.1 ± 3.3 / I / R + VH 4.6 ± 0.6 and I / R + EU 18.7 ± 2.6 mL / min / kg), FSR (SH + VH: 26.3 ± 3.0 / SH + EU: 29.3 ± 7.0 / I / R + VH: 7.6 ± 0.9 and I / R + EU: 29.1 ± 4.2 mL / min / kg) and RVR (SH + VH 4.6 ± 0.7 / SH + EU 5.7 ± 2.0 / I / R + VH 21.8 ± 5.9 and I / R + EU 4.5 ± 1.1 au). In this study, the extract was able to prevent the increase of the production of reactive oxygen species in the animals I / R (SH + VH: 344.52 ± 23 / SH + EU: 332.2 ± 13 / I / R + VH 503.12 ± 33 and I / R + EU 370.69 ± 27 water). This prevention of the increase of ROS is related to the increase of the activity of the antioxidant enzymes SH + VH (catalase 0.710 ± 0.090 and SOD 0.27 ± 0.046); SH + EU (catalase 0.750 ± 0.110 and SOD 0.69 ± 0.020); I / R + VH (catalase 0.420 ± 0.100 and SOD 0.090 ± 0.14) and I / R + EU (catalase 0.080 ± 0.200 and SOD 0.209 ± 0.037). Moreover, the extract was able to prevent apoptosis in I / R animals (SH + VH: 4.8 ± 1.25 / SH + EU: 4.9 ± 0.19 / I / R + VH 10.20 ± 1.2 and I / R + EU $3.9 \pm 0.9\%$, group values). These results demonstrate the protective effect of *Eugenia uniflora* hydroalcoholic extract on AKI.

Keywords: ischemia / reperfusion, *Eugenia uniflora*, Acute Renal Injury

Lista de Abreviaturas

ATP - Adenosina tri-fosfato	P - Massa corpórea do animal
ROS - Espécies reativas de oxigênio	FSR - Fluxo sanguíneo renal
SUS - Sistema Único de Saúde	RVR - Resistência vascular renal
I/R - Isquemia/reperfusão	PAM - Pressão arterial média
mL - Mililitro	PBS - Tampão Fosfato Salino
°C - Graus Célsius	EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
Kg - quilograma	SFB - Soro fetal bovino
NaCl - Cloreto de sódio	DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
TFG - Taxa de filtração glomerular	H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
FPR - Fluxo plasmático renal	DHE - Dihidroetídeo
kD - KiloDalton	µM – Micromol
PE - Polietileno	PI - iodeto de propídeo
MM – Massa molecular	EPM - Erro padrão da média
I.P. – Intraperitoneal	ANOVA - Análise de Variância
PAH – Para-aminohipirato	LRA – Lesão renal aguda
rpm – Rotação por minutos	FG – Filtração Glomerular
SOD : Superóxido Dismutase	h - Horas
H₂O : água	> - Maior
H₂O₂ : peróxido de hidrogênio	% - Percentual
HPF : hidroxifenilfluoresceína	mg - Miligramas
Ca²⁺ : Calcio	M – Peso molecular
DCF : diacetato de 2'7'diclorofluoresceína	pH – Ponte de hidrogênio
CAT : catalase	NO – Óxido nítrico
Cl - <i>Clearance</i> da substância (inulina ou PAH)	DAF - 4,5-diaminofluoresceína
X_u - Concentração da substância X na urina	nm – nanomol
X_p - Concentração da substância no plasma	p<0,05 – Probabilidade menor que 0,05
FU - Fluxo urinário	µL - Microlitro

RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS

KOH- Hidróxido de potássio

SH- Sham

EU- *Eugenia uniflora*

FeCl₃- Cloreto Férrico

IL6-Inteleucina 6

IL1-Inteleucina 1

KDIGO – *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

AlCl₃- Cloreto de alumínio

CYP450- Citocromo 450

Pb(ACO₂)- Acetado de Chumbo

mM- milimolar

OH- radical hidroxila

O₂- - anion superóxido

Sumário

1)	INTRODUÇÃO	13
1.1	Lesão renal aguda	13
1.1.1	Fisiopatologia	15
1.1.2	Manejo clínico da LRA	17
1.2	<i>Eugenia uniflora</i>	18
2)	JUSTIFICATIVA	Erro! Indicador não definido.
3)	HIPOTESE	Erro! Indicador não definido.
4)	OBJETIVOS	21
4.1	Objetivo Geral	21
4.2	Objetivos Específicos	21
5)	MÉTODOS	22
5.1	Coleta do material vegetal e preparo do extrato	22
5.2	Prospecção fitoquímica do extrato	22
5.3	Animais experimentais.....	23
5.4	Grupos experimentais.....	23
5.5	Indução da lesão renal aguda.....	24
5.6	Protocolo de Função Renal.....	26
5.7	Isolamento de células renais	28
5.10	Detecção de óxido nítrico	30
5.11	Determinação dos níveis das enzimas antioxidantes por WESTERN BLOT ³¹	
5.12	Avaliação das vias pró-oxidantes e antioxidantes	32
6)	RESULTADOS	34
6.1	Etapa química	34
6.2.1	Taxa de Filtração Glomerular	35
6.2.2	Fluxo plasmático renal.....	36
6.2.3	Fluxo sanguíneo renal.....	37
6.2.4	Resistência vascular renal.....	38
6.3	Avaliação do Estresse Oxidativo.....	39
6.3.1	Ânion Superóxido.....	39
6.3.2	Peróxido de hidrogênio.....	40
6.3.3	Radical hidroxila e ânion peroxinitrito	41
6.3.4	Avaliação do sistema antioxidante no tecido renal	42
6.3.5	Avaliação da participação das principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio	44

6.4	Avaliação da apoptose	45
7)	DISCUSSÃO	48
8)	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
9)	CONCLUSÃO	61
10)	REFERÊNCIAS	62

1) INTRODUÇÃO

1.1 Lesão renal aguda

A lesão renal aguda (LRA) possui como característica o declínio da taxa de filtração glomerular (TFG) e retenção de resíduos de compostos nitrogenados. (SINGH et al., 2012). Outras manifestações clínicas e laboratoriais incluem a diminuição da produção de urina (nem sempre presente), acúmulo de metabólitos ácidos e aumento de sódio e potássio no plasma.(BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012) O prejuízo resultante da LRA é a incapacidade dos rins desenvolverem suas funções como: manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, controle da osmolaridade e dos volumes dos compartimentos corporais, manutenção do equilíbrio ácido-base e das funções endócrinas. (BARROS, 2013).

De acordo com *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury*, uma lesão renal aguda é caracterizada quando o paciente apresenta um aumento de creatinina sérica maior que 0,3 mg/dL em 48 horas, ou aumento da creatinina sérica em mais 1,5 vezes o valor basal em menos de 7 dias, ou volume urinário menor que 0,5ml/Kg/h em 6 horas (KELLUM et al., 2012). A classificação mais recente da LRA e mais utilizada na clínica leva em consideração a concentração de creatinina plasmática e produção de urina do paciente, conforme ilustrado na tabela 01.

Tabela 1: Classificação da LRA de acordo com os critérios KDIGO. Adaptado de “KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012.

Estágio	Creatinina Plasmática	Produção de Urina
1	1,5 a 1,9 vezes o basal ou aumento $\geq 0,3$ mg/dL	$<0,5$ mL/kg/h por 6-12 horas
2	2,0 a 2,9 vezes o basal	$<0,5$ mL/kg/h por ≥ 12 horas
3	3,0 vezes o basal; ou aumento $\geq 0,4$ mg/dL; ou se <18 anos, TFG ≤ 35 ml/min/1,73 m ² ; ou início da terapia de substituição renal	$<0,3$ mL/kg/h por ≥ 24 horas ou anúria por ≥ 12 horas

A LRA é uma doença com grande incidência em pacientes hospitalizados ao redor do mundo. Nos Estados Unidos a incidência de LRA nos hospitais aumentou de 4,9% para 7,2% em 17 anos (NASH; HAFEEZ; HOU, 2002), já na Austrália um estudo de coorte demonstrou uma incidência de 18% dessa doença com uma piora do estado de saúde do paciente evoluindo para óbito (UCHINO et al., 2006).

Na população geral, segundo estudo feito por Ricci e Ronco, a LRA possui uma incidência de 0,25%. Entretanto, quando os pacientes são hospitalizados essa incidência passa para 18% e quando os pacientes evoluem o quadro para um estado crítico a incidência sobe para 30 a 60% (RICCI; RONCO, 2012). Já outro estudo evidencia que LRA acomete um de cinco adultos e um de três crianças hospitalizadas com doenças agudas. (REWA; BAGSHAW, 2014)

Apesar dos dados epidemiológicos serem de países desenvolvidos, a LRA é cada vez mais reconhecida como um fator de morbidade, mortalidade e prejuízo econômico principalmente para países em desenvolvimento (LI; BURDMANN; MEHTA, 2013). Nos países em desenvolvimento, a LRA comporta-se de forma bimodal. Nos grandes centros urbanos e modernos os pacientes com essa

doença são semelhantes aos pacientes dos países desenvolvidos: possui predominância de uma doença adquirida em hospital em pacientes com insuficiência multiorgânica sendo a principal causa da LRA a isquemia renal associada por sepses ou por drogas nefrotóxicas. Já nas áreas rurais ou cidades menores a LRA está associada com uma doença adquirida na comunidade acometendo jovens previamente saudáveis. Entre as condições que podem levar um dano renal pode-se destacar: doenças infecciosas (malária, dengue, febre amarela, leptospirose, tétano e vírus da imunodeficiência humana), aborto e medicamentos naturais. Todas estas estão associadas à pobreza a qual está ligada à falta de saneamento básico, precariedade na educação e na carência no acesso à infraestrutura urbana adequada e ainda, uma dificuldade de acesso aos serviços de saúde (LI; BURDMANN; MEHTA, 2013; LOMBARDI et al., 2008).

No Brasil, um estudo realizado no hospital escola do município de São Paulo entre os anos de 2005 a 2006, apresentou 76% dos pacientes com LRA, sendo esses submetidos a tratamento dialítico de hemodiálise nas UTIs (SECCO; CASTILHO, 2007). Os óbitos devido à LRA possuem números expressivos. Segundo DATASUS, em 2015 o Brasil apresentou uma mortalidade de 4.525 pacientes sendo as regiões nordeste (1.238) e sudeste (1.951) com os maiores casos de óbitos (BRASIL DATASUS, 2015).

Assim sendo, a LRA possui um grande impacto na saúde pública, sendo considerada um fator de morbidade e mortalidade para os pacientes internados bem como promovendo um aumento de custos econômicos advindos de um aumento do tempo de internação.

1.1.1 Fisiopatologia

Uma das principais causas da LRA é o processo de isquemia e reperfusão renal, ou seja, por uma diminuição do fluxo sanguíneo para o rim, seguido de uma restauração do fluxo e do suprimento de oxigênio. Essa restrição de fluxo sanguíneo promove uma diminuição da oferta de oxigênio e o fornecimento de nutrientes aos néfrons e o aumento da demanda energética com depleção de ATP. Como consequência, ocorre o acúmulo intracelular de cálcio e de espécies

reativas de oxigênio (ROS), infiltração de células inflamatórias e ativação de vias apoptóticas (MAKRIS; SPANOU, 2016; ZAHRAN et al., 2015b).

A organela que mais é atingida pela diminuição dos níveis de oxigênio é a mitocôndria. Portanto, estruturas como túbulos contorcidos proximais são mais sensíveis à lesão renal do que outros segmentos do néfrons pois essas estruturas são mais dependentes do ATP mitocondrial (WEINBERG, 1991). Ainda, com o esgotamento do ATP, ocorre o prejuízo do funcionamento da bomba Ca^{2+} /ATPase a qual é responsável pela retirada do excesso de cálcio citosólico. O acúmulo desse íon no citoplasma ativa fosfolipases e proteases promovendo um aumento ainda na permeabilidade da membrana, com consequente influxo maior de Ca^{2+} para os compartimentos citoplasmáticos e mitocondriais, levando a lesão celular irreversível (TUCCI JR. et al., 2005).

Assim como a isquemia gera danos graves ao funcionamento renal, a reperfusão também participa de maneira significativa no estabelecimento da lesão renal, uma vez que, durante a fase de reperfusão ocorre a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando peroxidação lipídica e danos na membrana celular. Somado a isso, as ROS podem causar danos oxidativos em proteínas e no DNA contribuindo para apoptose e morte celular o que também promove um avanço da doença (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; MALEK; NEMATBAKHSH, 2015). Esse processo apoptótico pode ocorrer de duas formas. Pela via intrínseca, estresses intra ou extracelulares geram sinais que interagem com membros anti ou pró-apoptóticos da mitocôndria, alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial e levando à liberação do citocromo c e outros fatores indutores de apoptose ativando as caspases. Pela via extrínseca, a ligação de fatores específicos, como o $\text{TNF-}\alpha$, à superfície celular ativa a cascata de caspases, levando à morte celular. (PRICE; SAFIRSTEIN; MEGYESI, 2009; SABBAHY; VAIDYA, 2011).

O processo de LRA é multifatorial e a ativação de vias inflamatórias também contribui para o avanço da doença, desempenhando um papel importante na sua fisiopatologia. A inflamação que acontece durante a LRA está envolvida com um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), cuja produção é induzida pelo infiltrado mononuclear e pelas células endoteliais (MALEK; NEMATBAKHSH,

2015; PATEL et al., 2004). Também ocorre um grande aumento da síntese de leucotrienos e da atividade da ciclooxigenase. (MALEK; NEMATBAKHSH, 2015; PATEL et al., 2004).

1.1.2 Manejo clínico da LRA

Na clínica, a melhor maneira de aprimorar os resultados dos pacientes críticos com disfunção renal é a prevenção. Entre as formas de prevenção podemos citar o uso de cristaloides isotônicos para expansão de volume intravascular em pacientes de risco com LRA e o uso de vasopressores em conjunto com fluidos em pacientes com choque vasomotor com risco de LRA (KELLUM; LAMEIRE, 2013). O uso de diuréticos de alça era muito empregado na clínica como forma de prevenção pois acreditavam que poderia reduzir o trabalho metabólico e ainda diminuir a concentração de toxinas nos túbulos (STAR, 1998). Um outro estudo demonstrou que os diuréticos seriam usados como forma de tratamento e não prevenção da LRA pois eles poderiam gerenciar a sobrecarga de volume e otimizar o equilíbrio ácido-base e a homeostase de eletrólitos (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; RICCI; RONCO, 2012). Entretanto, dados epidemiológicos sugerem que os diuréticos de alça podem aumentar a mortalidade de pacientes portadores de doenças graves com LRA (KELLUM; LAMEIRE, 2013). Em 2013 a “KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury” sugeriu não utilizar os diureticos de alça para tratamentos de LRA exceto nos casos de manejo de sobre carga de volume (KELLUM; LAMEIRE, 2013).

Outros fármacos com potenciais ações terapêuticas no tratamento da LRA seriam os vasodilatadores, como dopamina e fenoldopam (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; KELLUM; LAMEIRE, 2013). Apesar destes fármacos já terem sido utilizados na clínica como forma de tratamento para a LRA, alguns estudos demonstraram a existência de efeitos adversos (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; KELLUM; LAMEIRE, 2013). O Guia de Práticas Clínicas para Lesão Renal Aguda recomenda o abandono do uso destas drogas vasodilatadoras

exclusivamente para tratamento e prevenção da LRA. (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; KELLUM; LAMEIRE, 2013)

Os peptídeos natriuréticos também poderiam ser terapias interessantes para o tratamento da LRA uma vez que são bons vasodilatadores. Entretanto, o dado da literatura sobre o uso desses fármacos é contraditório (KELLUM; LAMEIRE, 2013). Sendo assim, o Guia de Práticas Clínicas para LRA recomenda não utilizar esse fármaco para tratamento e nem prevenção da LRA (KELLUM; LAMEIRE, 2013).

Diversas drogas para tratar a LRA têm sido testadas nos últimos anos, como por exemplo teofilina e o fator de crescimento semelhante a insulina-1, porém sem sucesso e nenhuma medicação específica está disponível na prática clínica, sendo necessária a pesquisa de novos fármacos que possam efetivamente tratar a doença (KELLUM; LAMEIRE, 2013).

Considerando a biodiversidade brasileira e ausência de opções de tratamento para a LRA, a pesquisa por produtos naturais se torna cada vez mais promissora, especialmente compostos cujo mecanismo de ação é capaz de reduzir/bloquear os fatores envolvidos na progressão e/ou desenvolvimento da doença.

1.2 *Eugenia uniflora*

O uso de plantas com ação terapêutica tem origem histórica sendo utilizada como chás, tinturas e outras formulações e seu conhecimento popular passado verbalmente (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Uma parte dos medicamentos comercializados no mundo tem origem em produtos naturais. Entre os anos de 2001 e 2002 um quarto dos medicamentos mais vendidos mundialmente eram obtidos de fontes naturais (AGARWAL et al., 2009) .

Diante do enorme potencial de descoberta de fármacos ante os produtos naturais, em 2008 o Ministério da Saúde lançou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), baseando-se em uma lista de espécies vegetais com uso consagrado já nos serviços de saúde, no conhecimento popular e em estudos químicos e farmacológicos. Essas espécies têm alto potencial de gerar produtos de interesse ao SUS e, por isso avançar nas etapas da cadeia produtiva (BRASIL, 2012).

A *Eugenia uniflora* é uma planta amplamente distribuída no Brasil e em alguns países da América do Sul e tem sido utilizada na medicina popular para tratar uma série de desordens (PIO CORRÊA; PENA, 1984; SIMÕES, 1998). Tem como nome popular Pitangueira, Cerejeira-brasileira, Ginja, Pitanga-branca, Pitanga-do-mato, Pitanga-rósea, Pitanga-roxa, Pitangueira-miúda, Pitangueira-vermelha, Pitanga-vermelha, Pitangueira-comum, dentre outros (FIUZA et al., 2008).

O gênero *Eugenia* é um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 500 espécies, das quais cerca de 400 encontram-se no Brasil e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais (Alonso, 1998). Acredita-se que *E. uniflora* tenha sido introduzida na medicina popular pelos índios Guaranis no século XV (Alonso, 1998). Infusões das folhas desta planta são usadas como anti-hipertensivo e diurético (AMAT; VAJIA, 1991) bem como para o tratamento de desordens digestivas (BANDONI et al., 1972; RATERA, E.E., RATERA, 1980), como antipirético e antirreumático (ALICE et al., 1991).

A *Eugenia uniflora* (Pitangueira), apresenta-se na forma de árvore ou arbusto, atingindo de 4 a 10 m de altura, copa estreita, de tronco liso de cor pardo clara. Suas folhas são simples, cartáceas, de 3 a 7 cm de comprimento, com aroma característico.(FIUZA et al., 2008)

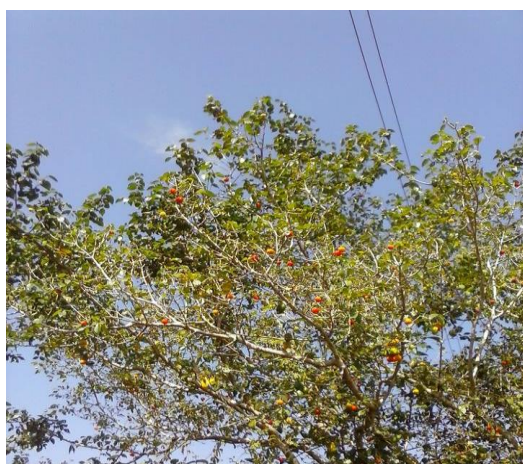


Figura 1: A) Pitangueira que foi coletada as folhas B) frutos e folhas da pitangueira – Fonte: arquivo pessoal do autor

Seus frutos são comestíveis, sendo muito apreciada e conhecida no Brasil. Tem seu uso muito disseminado na medicina popular, porém sua investigação química realizada até então é muito limitada.

Alguns estudos têm confirmado as bases farmacológicas para o uso popular da *Eugenia uniflora*. Trabalhos já demonstraram que diferentes extratos de *Eugenia uniflora* melhoram a hiperglicemia e hipertrigliceridemia em camundongos (ARAI et al., 1999), além de ter atividade sobre o metabolismo lipídico (FERRO et al., 1988). Também foi demonstrado que a planta tem propriedades diuréticas (SCHAPOVAL et al., 1994) e atividade inibitória sobre a xantina-oxidase (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

Achados da literatura demonstram que os extratos de folhas de *Eugenia uniflora* apresentam alta propriedade anti-inflamatória (SCHAPOVAL et al., 1994) e o suco da pitanga é capaz de reduzir a produção de IL-8 em células epiteliais de gengiva (JOSINO SOARES et al., 2014). De acordo com estes dados, a utilização de outras plantas do mesmo gênero, como a *Eugenia punicifolia* e *Eugenia jambolana* também parecem exercer atividade anti-inflamatória (BASTING et al., 2014; EL-SHENAWY, 2009).

As plantas do gênero *Eugenia* também parecem ser capazes de reduzir apoptose e o estresse oxidativo. Um estudo realizado por Ghosh et al (2016) demonstrou que a *Eugenia jambolana* reduziu a apoptose normalizou a expressão de Bax, Bcl-2, caspase-9, caspase-3 e catalase em ratos diabéticos. (GHOSH et al., 2016) Estudos in vitro demonstraram que a polpa da fruta de *Eugenia jambolana* protegeu contra os danos ocasionados pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. A melhora incluiu aumento na expressão da glutathione peroxidase e capacidade antioxidante total, além de reduzir a expressão de moléculas envolvidas no processo apoptótico, como caspase-3, caspase-8, Fas e caspase-9 (GARCIA MDEL; GODOY; CELUCH, 2013).

Considerando que a *Eugenia uniflora* parece reduzir o stress oxidativo, a inflamação e apoptose, fatores estes que estão diretamente envolvidos na progressão da lesão renal aguda, a hipótese do presente estudo é de que a utilização do extrato de *Eugenia uniflora* possa ter efeitos benéficos sobre o desenvolvimento/progressão da LRA.

2) OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da utilização do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* sobre a LRA em ratos

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a identificação fitoquímica qualitativa do extrato vegetal;
- Avaliar se o extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* é capaz de prevenir/atenuar:
 - A lesão renal aguda induzida pela isquemia reperfusão renal;
 - O aumento do estresse oxidativo induzido pela isquemia reperfusão renal;
- Avaliar o potencial anti-apoptótico do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora*;

3) MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato

O material vegetal selecionado foi constituído de folhas da *Eugenia uniflora* (EU). Realizou-se a coleta no turno da manhã (das 8 às 10h), em 30 de junho de 2016, a partir de plantas adultas localizadas no sítio Bom Sucesso dos Coqueiros. As coordenadas geográficas de localização destas plantas correspondem a: latitude de -20.8833 e longitude de -41.5333. A identificação do material vegetal foi realizada pela professora Dr^a. Juliana Aparecida Severi, da Universidade Federal do Espírito Santo. Após a realização da coleta, o material dotado de flores foi reservado para a confecção de exsicatas e estas foram depositadas no Herbário da UFES para documentação, sob o número VIES-30550.

As folhas de *Eugenia uniflora* foram coletadas de plantas adultas e sadias. Uma exsicata da porção fértil foi armazenada no Herbário Central da UFES para documentação. Após coleta, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante a 45°C, durante 7 dias. O material desidratado foi pulverizado em moinhos de facas para produção de um pó, o qual foi submetido ao processo de extração por remaceração em etanol 95% (1:5 p/v, 75h, 3 repetições). A mistura foi filtrada em papel filtro e as soluções extrativas foram concentradas sob pressão reduzida e liofilizadas até a obtenção de um extrato seco.

3.2 Prospecção fitoquímica do extrato

Após a extração, a solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida no rotaevaporador (Heidolph, Laborota-4000), em temperatura inferior a 50 °C. Em seguida, transferido para vidro tarado e submetido à liofilização (Liotop, L101) para completa remoção de água e resíduos de solvente orgânico. Os extratos obtidos permaneceram armazenados em freezers, constituindo um banco de extratos no Departamento de Farmácia e Nutrição (DFN) do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) .

O extrato obtido foi inicialmente submetido à prospecção fitoquímica qualitativa, a fim de obter informações preliminares acerca dos principais grupos de

metabólitos secundários presentes (MATOS, 2009; WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 1984). Foram pesquisadas a presença de compostos fenólicos, realizada por meio de reação de complexação de FeCl₃; Flavonoides, por meio de reação de Shinoda (presença de ácido) e de Pew (para pesquisa da presença de diidroflavonol); Taninos, pelos testes com gelatina, acetato de chumbo (pesquisa de taninos hidrolisáveis) e acetato de cobre (taninos condensados); Cumarinas pela reação com KOH; Terpenos, Glicosídeos Cardiotônicos e esteroides, reação com ácido fosfórico (Pesez) e Kedde; Alcalóides com reagente de Mayer e Wagner e por último Saponinas.

3.3 Animais experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, machos (80-100g), fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em condições controladas e estáveis em biotério (temperatura 22 °C, umidade de 50-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas) e tiveram livre acesso à água e ração. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o número 73/2016

3.4 Grupos experimentais

O presente estudo contou com os seguintes grupos experimentais:

- a) Sham + veículo (SH+VH): animais que receberam o veículo (salina + Twin 1%, 1mL), por gavagem, durante 28 dias e foram submetidos a cirurgia fictícia ao fim do tratamento.
- b) Sham + *Eugenia uniflora* (SH+EU): animais que receberam o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* (200 mg/Kg peso corporal), por gavagem, durante 28 dias e foram submetidos a cirurgia fictícia ao fim do tratamento.
- c) Isquemia/reperfusão + veículo (I/R+VH): animais que receberam o veículo (salina + Twin 1%, 1mL), por gavagem, durante 28 dias e foram submetidos a cirurgia para indução da LRA ao fim do tratamento.

- d) Isquemia/reperfusão + *Eugenia uniflora* (I/R+EU): animais que receberam o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* (200 mg/Kg peso corporal), por gavagem, durante 28 dias animais e foram submetidos a cirurgia para indução da LRA ao fim do tratamento.

A dosagem do extrato hidroalcoólico foi definida por um projeto inicial do nosso grupo que trabalhou com ratos SHR (MARIANI, 2016), em que encontramos um efeito benéfico com 200 mg/Kg (dados ainda não publicados).

3.5 Indução da lesão renal aguda

A indução da lesão renal aguda foi realizada por meio de cirurgia de isquemia/reperfusão renal. Para tanto, os animais foram anestesiados com ketamina (91 mg/kg) e xilazina (9,1 mg/kg) por via intraperitoneal e posicionados em decúbito dorsal. Após a tricotomia foi realizada uma incisão abdominal e as artérias renais foram expostas e amarradas com linha cirúrgica, interrompendo suprimento de sangue aos rins. Após 45 minutos de isquemia bilateral a linha foi removida e o fluxo sanguíneo para os rins reestabelecido (BETZ et al., 2012a; SIVARAJAH, 2003). Em sequência, a camada muscular e a incisão cutânea foram suturadas. Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto pela ligadura da artéria renal.

Após a cirurgia, os animais receberam injeção subcutânea de 1 mL de NaCl 0,9% para prevenir desidratação e foram mantidos em observação até se recuperarem da anestesia (BETZ et al., 2012a)

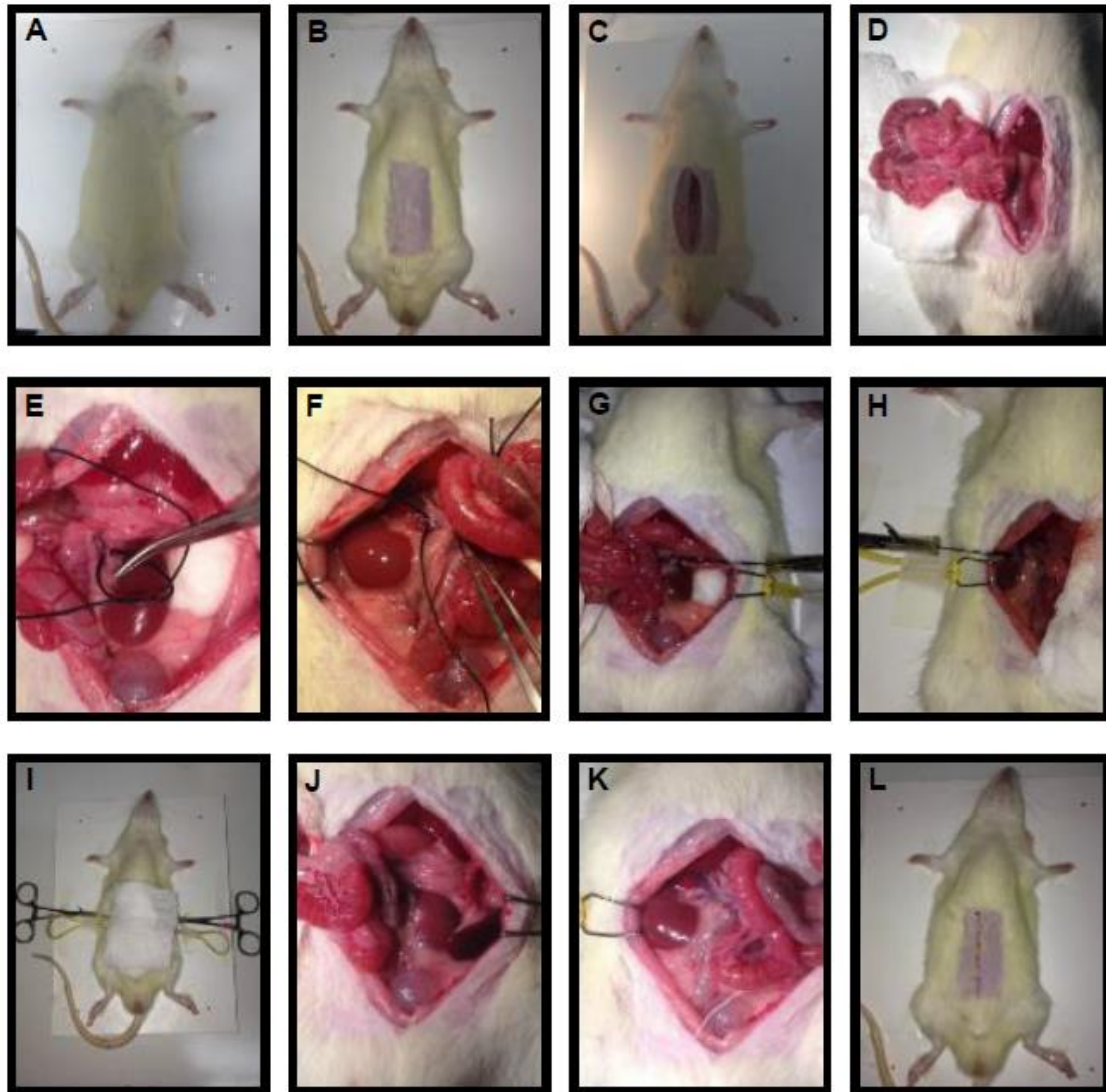


Figura 2: Fotos ilustrativas da isquemia/reperfusão renal. A: animal posicionado em decúbito dorsal; B: tricotomia; C: incisão no abdômen; D: exteriorização do intestino para exposição do rim; E: isolamento da artéria renal direita; F: isolamento da artéria renal esquerda; G: isquemia do rim direito (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); H: isquemia do rim esquerdo (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); I: manutenção da isquemia por 45 minutos; J: reperfusão do rim direito (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); K: reperfusão do rim esquerdo (confirmada pela mudança de coloração do tecido renal); L: sutura após a cirurgia

3.6 Protocolo de Função Renal

Vinte e quatro horas após o início da reperfusão renal ou cirurgia fictícia, a determinação dos parâmetros de taxa de filtração glomerular, fluxo plasmático e sanguíneo renal e resistência vascular renal foi realizada utilizando-se o clearance de inulina e paraaminohipurato (PAH). Para tanto, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.) e tiveram sua traquéia cateterizada (PE-240) para facilitar a respiração. A artéria carótida direita (PE 50), a veia jugular esquerda (PE 50) e bexiga (PE 320) dos animais foram cateterizadas para coleta de sangue, infusão de inulina e para-aminohipurato e coleta de urina, respectivamente. O volume urinário foi determinado gravimetricamente. Os animais foram infundidos durante o experimento com uma solução salina isotônica com manitol a 3% a uma velocidade de 0,06 mL/min mediante uma bomba de infusão contínua. Após a preparação do animal foi administrada por via intravenosa uma dose prime de inulina e paraaminohipurato (30mg/100g de peso corporal de inulina e 0,6mg/100g de peso corporal de PAH) e após este procedimento, teve início a infusão de manutenção destas substâncias. Após um período de estabilização de 30 minutos, foram realizados 4 períodos de coleta de urina de 30 minutos, seguidas por coletas de sangue.

A determinação dos valores plasmáticos e urinários de inulina foi realizada por meio da utilização do método modificado de Fuhr (1955) e a quantificação dos valores plasmáticos e urinários de paraaminohipurato foi realizada por meio do método modificado de Fuhr (FUHR; KACZMARCZYK; KRUTTGEN, 1955). Utilizando-se do fluxo urinário e quantificação dos valores plasmáticos e urinários de inulina e para-aminohipurato, foram calculadas as suas taxas de depuração, que refletem a taxa de filtração glomerular (TFG) e o fluxo plasmático dos animais (FPR), respectivamente segundo a seguinte fórmula:

$$Cl = \frac{\left(\frac{[X_u] \times [F_u]}{X_p} \right)}{P} \quad (1)$$

Onde:

- Cl = clearance da substância (inulina ou PAH) normalizado pelo peso corpóreo do animal;
- X_u = concentração da substância na urina;
- X_p = concentração da substância no plasma;
- F_u = fluxo urinário;
- P = massa corporal do animal (kg).

Um capilar heparinizado foi preenchido de sangue para quantificação do hematócrito, o que permitiu o cálculo do fluxo sanguíneo renal (FSR) por meio da fórmula: $FSR = FPR/(1\text{-hematócrito})$.

Durante o tempo supracitado, a pressão arterial média (PAM) dos animais foi continuamente registrada por meio da utilização de um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados. A resistência vascular renal (RVR) foi então determinada matematicamente por meio da lei de Ohm, onde $RVR = PAM/FSR$.

3.7 Isolamento de células renais

Células renais foram isoladas conforme técnica padronizada (DIAS et al., 2014; FOLKMANN; LOFT; MØLLER, 2007) e utilizadas posteriormente nas análises por citometria de fluxo. Para tanto, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Hepes, coletados, divididos em córtex e medula, triturados com uma tesoura cirúrgica e incubados em solução de extração contendo 25% de Tripsina em EDTA por 30 minutos a 37°C para dissociação das células. Logo depois o extrato de células foi filtrado por meio de uma membrana de nylon (BD falcon 70 µm) para remover os resíduos celulares e as amostras foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) para remoção das enzimas. As células foram armazenadas a -80°C em solução contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em soro fetal bovino (SFB) até posterior análise.

3.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio

A análise de ROS foi realizada por citometria de fluxo conforme descrito anteriormente (CAMPAGNARO et al., 2013; TONINI et al., 2013). Dihidroetídio (DHE) e diacetato de 2'7'diclorofluoresceína (DCF-DA) foram usados para detectar ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular, respectivamente. Devido a sua capacidade de penetrar livremente as membranas celulares, o DHE é amplamente utilizado para monitorar a produção de $\bullet\text{O}_2^-$. Após reação com $\bullet\text{O}_2^-$, o DHE é oxidado formando etídio, um produto fluorescente vermelho que se liga ao DNA e amplifica o sinal de fluorescência. O DCF-DA é um indicador de produção de H_2O_2 não fluorescente, e quando oxidado no interior da célula converte-se à forma fluorescente que permanece presa na célula.

DHE (160 µM) e DCF-DA (20 mM) foram adicionados à suspensão de células (10^6 células) e incubados a 37°C por 30 minutos, no escuro, para estimar as concentrações intracelulares de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 . Como controle positivo, as amostras foram tratadas por 5 minutos com 10 µM de doxorrubicina ou 50 mM de H_2O_2 para criar estresse oxidativo sem causar toxicidade às células, e como controle

negativo, as células foram incubadas com etanol. As células foram, então, lavadas, ressuspensas em PBS, e os níveis de ROS foram analisados imediatamente por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição de histogramas, construída usando o software FCS Express. Para quantificação da fluorescência do DHE e DCF, as amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram utilizados em cada medição. As células foram excitadas a 488 nm e as fluorescências do DHE e DCF foram detectadas usando, respectivamente filtros de 585/42 e 530/30. Os dados foram expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

3.9 Detecção de espécies altamente reativas de oxigênio

Espécies altamente reativas de oxigênio, como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e ânion peroxinitrito (ONOO^-), foram seletivamente detectadas pela hidroxifenilfluoresceína (HPF) conforme técnica descrita (SETSUKINAI et al., 2003). Primeiramente, 10^6 células renais foram incubadas com HPF ($10\ \mu\text{M}$) a 37°C por 30 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram tratadas com $100\ \mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio e $10\ \mu\text{M}$ de doxorubicina. As células foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição dos histogramas construídos usando o software FCS Express (De Novo). Para quantificação da fluorescência do HPF, amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram utilizados em cada medida. As células foram excitadas a 488 nm, a fluorescência foi detectada usando um filtro de 530/30 e os dados foram expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

3.10 Detecção de óxido nítrico

Para estimar a quantidade de óxido nítrico (NO) intrarrenal 2 μM do marcador fluorescente 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato (DAF-2/DA) foram adicionados à suspensão de células (10^6) e incubados a 37°C por 180 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram tratadas com 100 μM de nitroprussiato de sódio. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA) (SCHACHNIK et al., 2009). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição de histogramas construída usando o software FCS Express (De Novo). Para quantificação da fluorescência do DAF as amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram usados em cada medida. As células foram excitadas a 488 nm, a fluorescência detectada usando filtro de 530/30 e os dados expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

3.11 Determinação dos níveis das enzimas antioxidantes por *WESTERN BLOT*

A análise da expressão proteica foi determinada pelo método de Western Blotting. As amostras foram homogeneizadas em um tampão de lise contendo (em mmol/l) 150 NaCl, 50 Tris-HCL, 5 EDTA.2Na, 1 MgCl₂ mais inibidor de protease (Sigma Fast: Sigma). A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Quantidades iguais de proteína (50 µg), foram submetidas à eletroforese (25mA por gel para separação) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Em seguida as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose durante período de 2:40 a 60V em um sistema de blotting úmido. Após a transferência, foi realizado o bloqueio da membrana com TBS-T + leite 5% (molico desnatado) por 2:30 horas e em seguida lavada por 3 vezes com TBS-T por 5 minutos. As membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpos monoclonais de rato para a catalase (CAT; 1:2000; Sigma fast, EUA), os anticorpos policlonais de coelho para superóxido dismutase (SOD-2; 1:500; Sigma rápidos, USA). Após a lavagem das membranas com TBS-T, as mesmas foram incubadas com anti-mouse IgG (1:1000, Inc. Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). As mesmas membranas foram usadas para determinar a expressão β-actina utilizando um anticorpo monoclonal para β-actina (1:5000; Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA), e os resultados foram calculados utilizando a relação entre a densidade das proteínas de interesse corrigidas pela intensidade da proteína utilizada como controle (β-actina). Para a detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada a incubação das membranas com ECL para geração de sinal fluorescência enzimática e depois foram analisadas em ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Os sinais de imunoblot foram quantificados utilizando o software Bio-Rad Image Lab

3.12 Avaliação das vias pró-oxidantes e antioxidantes

Para avaliar a contribuição das principais vias pró e anti-oxidantes no desenvolvimento da LRA, foi realizada a quantificação da produção de ROS por citometria de fluxo, antes e após os bloqueios de enzimas envolvidas nas vias de síntese/remoção de ROS. Para determinar a contribuição de cada via oxidante, foram utilizados os seguintes bloqueios : apocinina na concentração de 600µM por 10 minutos para avaliar a influência da NAD(P)H oxidase; clotrimazol 100 µM por 10 minutos para avaliar a CYP450 e alopurinol 100 µM por 10 minutos para avaliar a participação da xantina oxidase na produção de ROS (DE SOUZA PINTO et al., 2012; MCNALLY et al., 2003). Para avaliação da capacidade antioxidante, a SOD foi inibida com a droga dietilditiocarbamato (DDC) a 500 µM por 16 horas, a catalase foi bloqueada por 2 horas com 20 mM de 3-AT e a GPx foi inibida com o ácido mercaptossuccinico na concentração de 0,05nM por 2 horas. (DUMAY et al., 2006; FRANCO et al., 2009; UEDA et al., 2003). Decorrido este tempo, às células foram novamente marcadas, no escuro, com DHE e DCF, por 30 min à 37°C para posterior aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

3.13 Avaliação da Apoptose

As células apoptóticas foram quantificadas pela dupla marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) usando kit de detecção de apoptose (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA). Para isso, células renais (5×10^5) foram lavadas duas vezes com PBS, 2 µl de anexina V-FITC e 2 µl de PI foram adicionados e vortexados. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente (25°) no escuro. Por fim, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson). Células marcadas com Anexina V-/PI+ foram reconhecidas como necróticas, marcadas com Anexina V+/PI+ reconhecidas como apoptose tardia, e marcadas com Anexina V+/PI- reconhecidas como apoptose inicial (MONGA et al., 2013).

3.14 Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm EPM. A comparação estatística entre os diferentes grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) de 2-vias, seguida pelo post hoc de Tukey. Para a análise de correlação entre apoptose e produção de ROS foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. A significância estatística foi mensurada usando o modelo de regressão linear. A análise estatística foi feita usando o software Prisma (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

4) RESULTADOS

4.1 Etapa química

Na etapa química foi realizada a prospecção fitoquímica por meio de testes qualitativos com o objetivo de indicar a presença dos principais compostos presentes nas folhas. Dessa forma foi identificado os seguintes compostos descritos na tabela 02.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato obtido das folhas de *E. uniflora* (EU).

Classe de composto	Ensaio	Resultado
Compostos Fenólicos	FeCl ₃ 5%	+
Flavonoides	AlCl ₃ 5%	+
	Shinoda	+
	Pew	+
Taninos	Gelatina 2%	+
	Pb(AcO) ₂	+
Cumarinas	KOH 10%	-
Terpenóides	Lieberman-B.	+
	Pesez	+
Glicosídeos cardiotônicos	Kedde	-
Saponinas	Agitação	+
Alcalóides	Mayer e Bouchardat	-

4.2 Avaliação da Função Renal

4.2.1 Taxa de Filtração Glomerular

A Figura 3 mostra os resultados da TFG. Exceto por ser um marcador exógeno, a inulina preenche os demais critérios que um marcador ideal de filtração glomerular deveria ter, ou seja: ser livremente filtrada pelos glomérulos; não ser nem sintetizada e nem destruída pelos túbulos; ser fisiologicamente inerte; e não ser nem reabsorvida e nem secretada pelos túbulos (COHEN, 1974). Logo, sua taxa de excreção é diretamente proporcional à taxa de filtração. A depuração (clearance) da inulina passou a ser considerada o método padrão da medida da taxa de filtração glomerular (TFG) tanto para animais como para o homem (GELSÅ, 1979; WOOLFSON; NEILD, 1997).

O tratamento com *Eugenia uniflora* não alterou o clearance de inulina no grupo SH +EU ($6,8 \pm 0,3$ mL/min/Kg), quando comparado com o grupo SH + VH ($7,5 \pm 0,5$ mL/min/Kg). Como esperado, a I/R resultou em diminuição da TFG ($2,9 \pm 0,1$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. grupos SH), e a administração de prévia de *Eugenia uniflora* impediu a diminuição da TFG nos animais I/R ($6,6 \pm 0,8$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. IR+ VH).

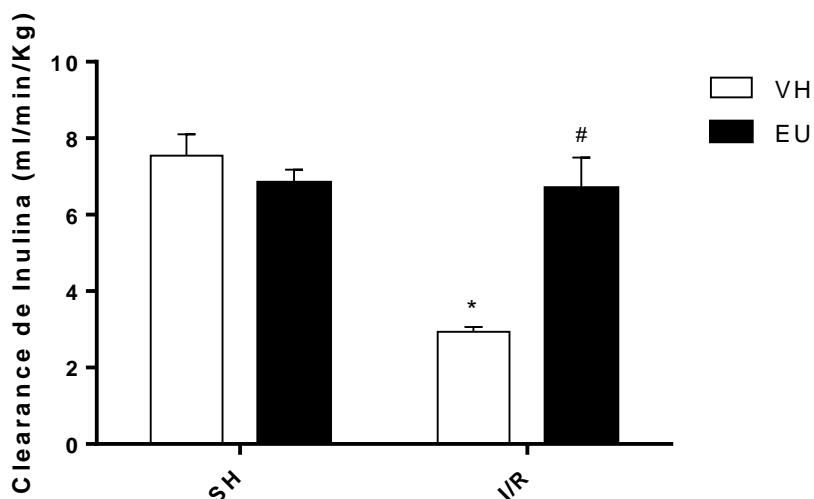


Figura 3: Taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de inulina nos grupos SH+ VH (n=5), SH+ EU (n=5), I/R+ VH (n=5), I/R+ EU (n=7). * $p < 0,05$ vs. grupos sham; # $p < 0,05$ vs. I/R+ VH

4.2.2 Fluxo plasmático renal

Para calcular o fluxo plasmático renal (FPR), é necessário a utilização de uma substância que além de ser livremente filtrada deve também ser secretada, e suas concentrações urinárias serão sempre maiores que as filtradas. Toda quantidade dessa substância que entrar no rim será excretada através dos processos de filtração e secreção (AIRES, 2008). Para isso, utilizamos o paraamino-hipurato (PAH), que é um pequeno ânion orgânico solúvel em água, com peso molecular igual a 194 D. Os resultados do *clearance* de PAH são mostrados na Figura 4. O *clearance* de PAH não foi afetado pelo tratamento com *Eugenia uniflora* no grupo SH (VH: $16,7 \pm 1,4$ vs. EU: $19,1 \pm 3,3$ mL/min/Kg). No entanto, a indução da I/R no grupo I/R +VH reduziu o FPR ($4,6 \pm 0,6$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. grupos SH). No grupo I/R que recebeu previamente o extrato de *Eugenia uniflora* não houve redução do *clearance* ($18,7 \pm 2,6$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. IR +VH).

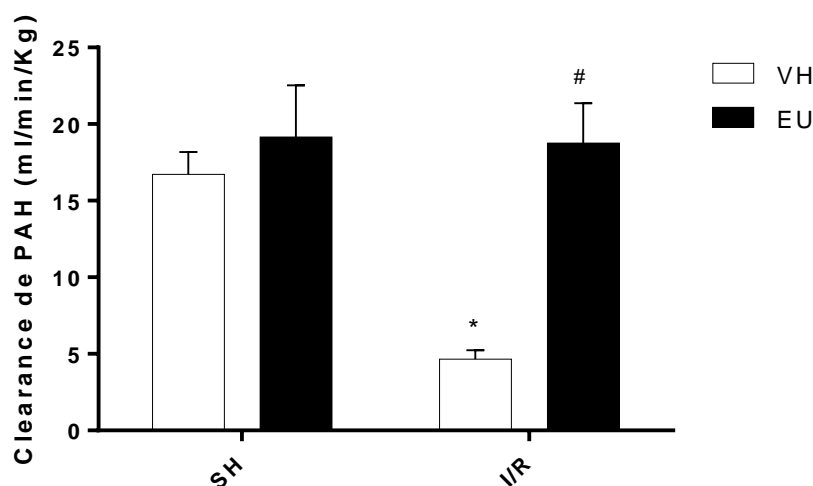


Figura 4 : Fluxo plasmático renal avaliado pelo clearance de PAH nos grupos SH+VH (n=5), SH+ EU (n=5), I/R+ VH (n=5), I/R+ EU (n=7).). * $p < 0,05$ vs. grupos sham; # $p < 0,05$ vs. I/R +VH.

4.2.3 Fluxo sanguíneo renal

Para o cálculo do fluxo sanguíneo renal foram utilizados os valores de hematócrito medidos durante o protocolo de função renal, que não foi significativamente diferente entre os grupos (SH+VH: $0,39 \pm 0,017$; SH+ EU: $0,39 \pm 0,023$; I/R+ VH $0,37 \pm 0,018$ e I/R +EU: $0,39 \pm 0,008$). Portanto, o padrão de resposta do FSR foi semelhante ao do FPR, sem diferenças entre os animais SH (VH: $26,3 \pm 3,0$ vs. EU: $29,3 \pm 7,0$ mL/min/Kg $p < 0,05$) e o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* impediu um prejuízo no FSR do grupo I/R (VH: $7,6 \pm 0,9$ vs. EU: $29,1 \pm 4,2$ mL/min/Kg $p < 0,05$). Os resultados do FSR são mostrados na Figura 5

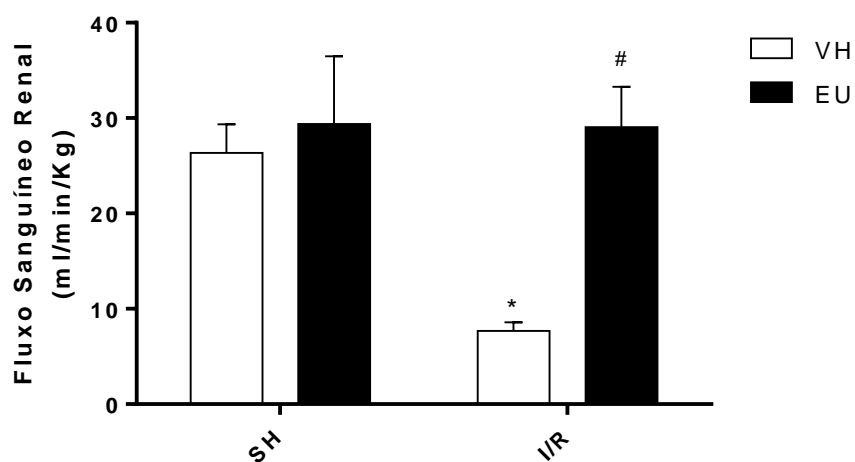


Figura 5: Fluxo sanguíneo renal nos grupos SH+VH (n=5), SH+ EU (n=5), I/R+ VH (n=5), I/R+ EU (n=7). *. $p < 0,05$ vs. grupos sham; # $p < 0,05$ vs. I/R+ VH.

4.2.4 Resistência vascular renal

A RVR encontra-se representada na Figura 6. Observou-se um aumento da RVR no grupo I/R tratado com veículo (21,8 ± 5,9 a.u.) quando comparada com os grupos SH+VH (4,6 ± 0,7 a.u.) e SH+EU (5,7 ± 2,0 a.u.). Novamente, o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* foi capaz de impedir um aumento da resistência vascular renal nos animais com I/R (4,5 ± 1,1 a.u.).

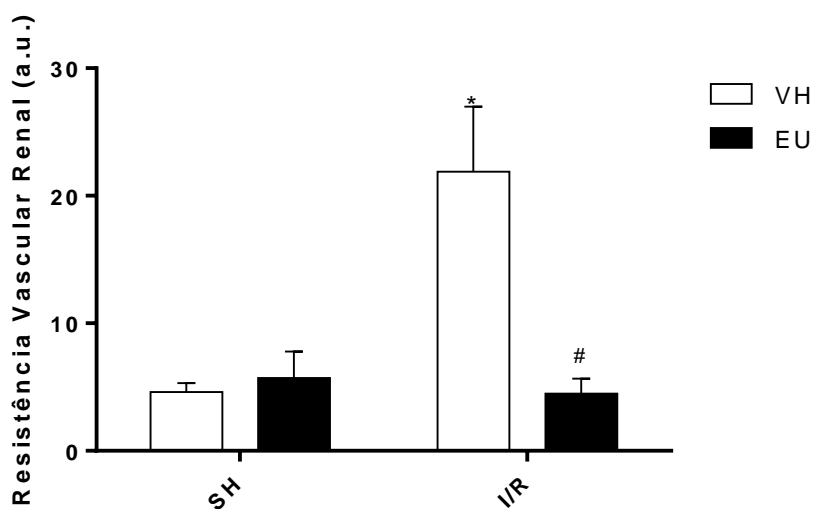


Figura 6: Avaliação da resistência vascular renal nos grupos SH+VH (n=5), SH+EU (n=5), I/R+ VH (n=5), I/R+ EU (n=7).). *p<0,05 vs. grupos sham; # p<0,05 vs. I/R+ VH.

4.3 Avaliação do Estresse Oxidativo

4.3.1 Ânion Superóxido

A análise do ânion superóxido foi realizada por citometria de fluxo usando o marcador fluorescente DHE. A Figura 7 demonstra a quantificação da produção de ânion superóxido renal dos animais SH e I/R. No córtex renal (A), nenhuma alteração na fluorescência do DHE foi observada (SH+VH: $389,7 \pm 20$; SH+EU: $378,8 \pm 22$; I/R +VH: 470 ± 15 ; I/R+ EU: 357 ± 39 u.a.). Na medula renal (B) os animais I/R tratados com veículo apresentaram um aumento na produção do ânion superóxido ($503,12 \pm 33$ u.a.) quando comparado com os grupos Sham (VH: $344,52 \pm 23$; EU: $332,2 \pm 13$ u.a.). Porém, o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* impediu o aumento na fluorescência do DHE no grupo I/R+ EU ($370,69 \pm 27$ u.a.).

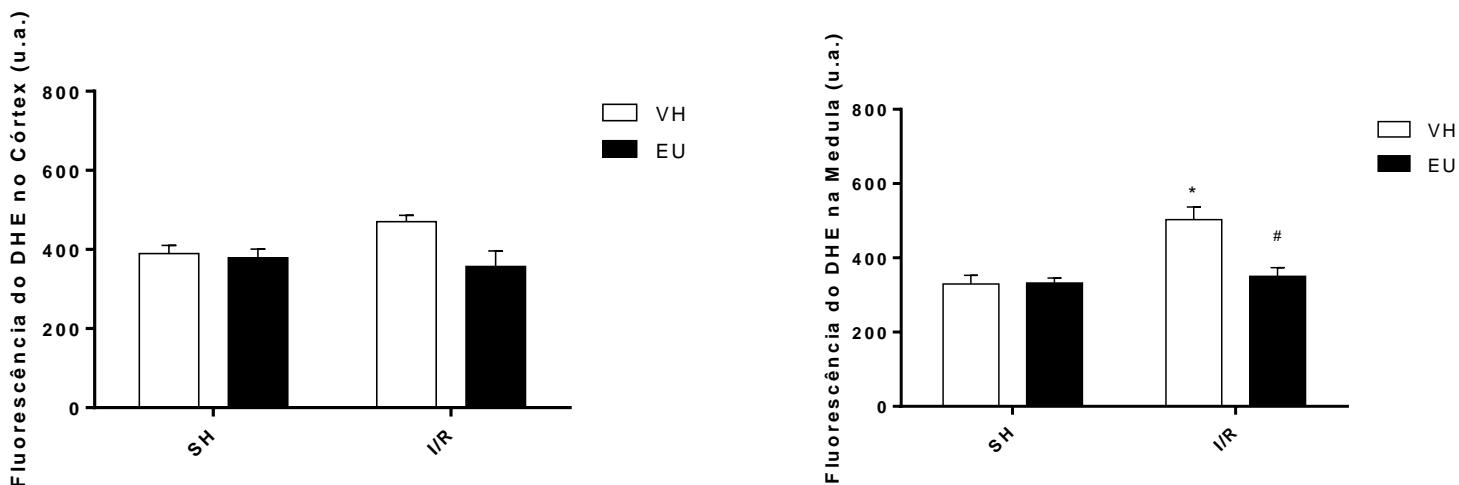


Figura 7: Produção de ânion superóxido. Quantificação da produção de ânion superóxido no Córtex (A) e Medula (B) renal nos grupos SH+VH (n=5), SH+ EU (n=5), I/R+VH (n=5) e I/R+EU (n=6). *p<0,05 vs. grupos sham; # p<0,05 vs. I/R VH.

4.3.2 Peróxido de hidrogênio

A quantificação do peróxido de hidrogênio foi feita por citometria de fluxo usando o DCF (Figura 8). No córtex renal (A), a I/R (SH+VH: $509,38 \pm 34$; I/R+ VH: $756,7 \pm 34$ u.a.) e o tratamento com *Eugenia uniflora* (SH+EU: $511,24 \pm 74$ I/R+EU: $569,3 \pm 77$ u.a.) não afetaram a produção de peróxido de hidrogênio. Novamente, na medula renal (B), a I/R resultou em aumento da fluorescência do DCF (Sham VH $330,84 \pm 51$ vs. I/R+VH: $571,1 \pm 62$ u.a.). A administração de *Eugenia uniflora* por gavagem não modificou a produção de peróxido de hidrogênio nos animais Sham (360 ± 47 u.a.), mas preveniu o aumento da fluorescência do DCF no grupo I/R ($377,5 \pm 26$ u.a.).

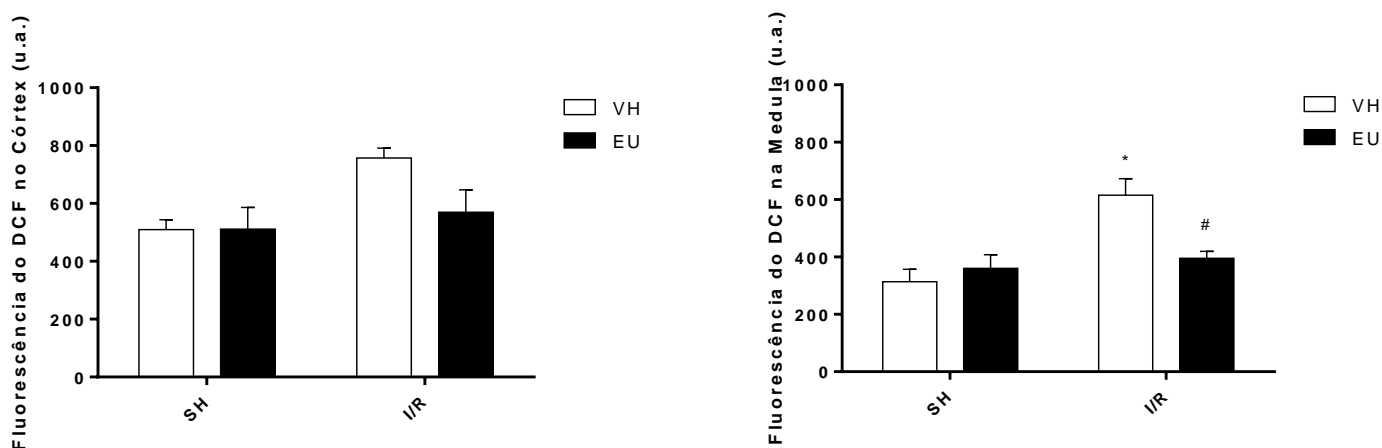


Figura 8: Produção de peróxido de hidrogênio. Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio no Córtex (A) e Medula (B) renal. Quantificação da produção nos grupos SH+VH (n=5), SH+EU(n=5), I/R+VH (n=5) e I/R+ EU (n=7) na medula renal.).*p<0,05 vs. grupos sham; # p<0,05 vs. I/R+VH.

4.3.3 Radical hidroxila e ânion peroxinitrito

A produção de peroxinitrito e hidroxila foi calculada usando a fluorescência do HPF no córtex e medula renal (Figura 9). A quantificação do HPF demonstra que o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* não exerce nenhum efeito sobre a produção de peroxinitrito e hidroxila no córtex renal (VH: $494,9 \pm 32$ vs. EU: $451,26 \pm 72$ u.a. vs I/R+VH: $538,6 \pm 58$ vs I/R+EU: $381,1 \pm 33$). Porém, a I/R aumentou a fluorescência do HPF medular ($568,2 \pm 48$ u.a. vs VH: $389,2 \pm 10$ $p < 0,05$), e o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* nestes animais impediu o aumento da produção de peroxinitrito e hidroxila no rim ($403,8 \pm 17$ u.a.).

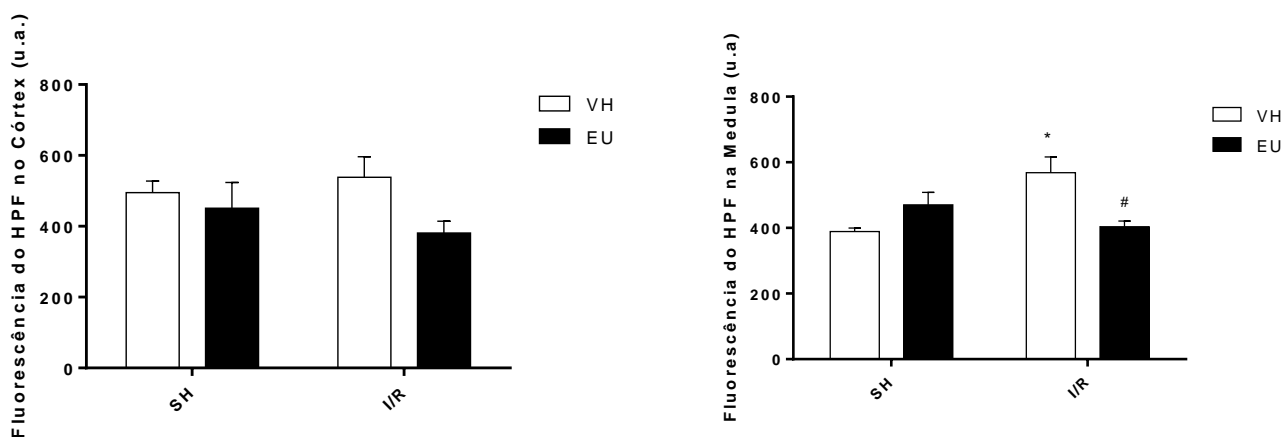


Figura 9: Produção de peroxinitrito e hidroxila. Quantificação da produção peroxinitrito e hidroxila no Córtex (A) e Medula (B) renal. Quantificação da produção nos grupos SH+VH (n=5), SH+EU (n=5), I/R+VH (n=5) e I/R+EU (n=7) na medula renal.).* $p < 0,05$ vs. grupos sham; # $p < 0,05$ vs. I/R+ VH.

4.3.4 Avaliação do sistema antioxidante no tecido renal

Afim de entender se o sistema de enzimas antioxidantes participa no processo de redução de ROS avaliamos três principais enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD, catalase e glutathiona peroxidase). Nossos achados demonstram que o nos animais SHAMs com ou sem o tratamento com a *Eugenia uniflora* possuem atividade enzimática normais para as três enzimas bloqueadas. No entanto, nos animais que sofreram a isquemia reperusão ocorreu um prejuízo da atividade do sistema enzimático, no qual o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* foi capaz de impedir o prejuízo encontrado nos animais com isquemia reperusão

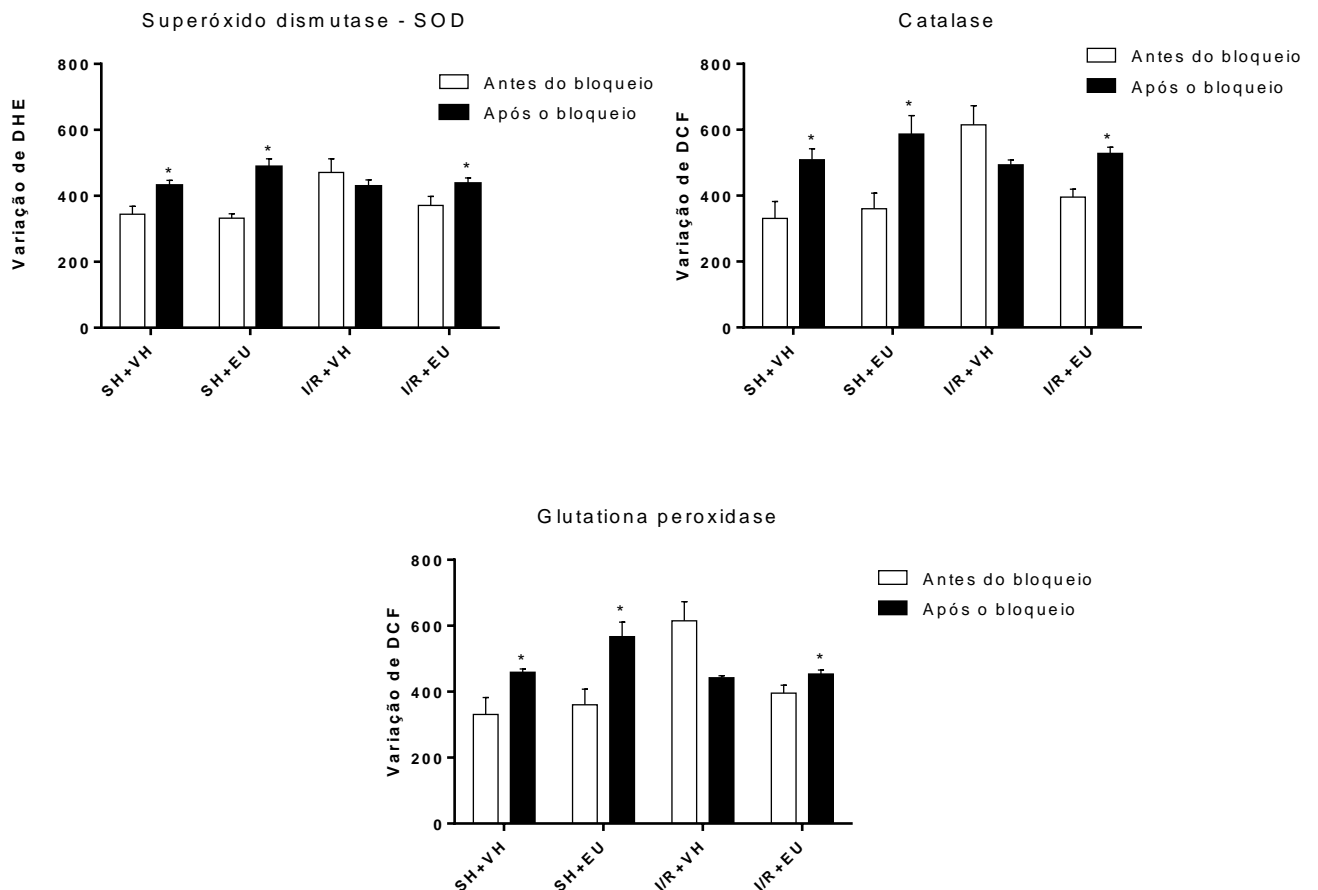


Figura 10: Avaliação da capacidade enzimática antioxidante de células renais. Do lado esquerdo, os gráficos mostram os efeitos de inibidores das enzimas superóxido

dismutase, catalase e glutationa peroxidase na redução de ROS. Valores expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$ vs o antes do bloqueio e após o bloqueio

Diante dos resultados apresentados sobre a participação das atividades das enzimas antioxidantes, investigamos então, a expressão proteica dessas enzimas por meio de técnica de *western blot* e encontramos uma diminuição da expressão das enzimas superóxido dismutase e catalase no grupo I/R+V. Entretanto o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* foi capaz de aumentar as expressões dessas enzimas no animais I/R (figura 11).

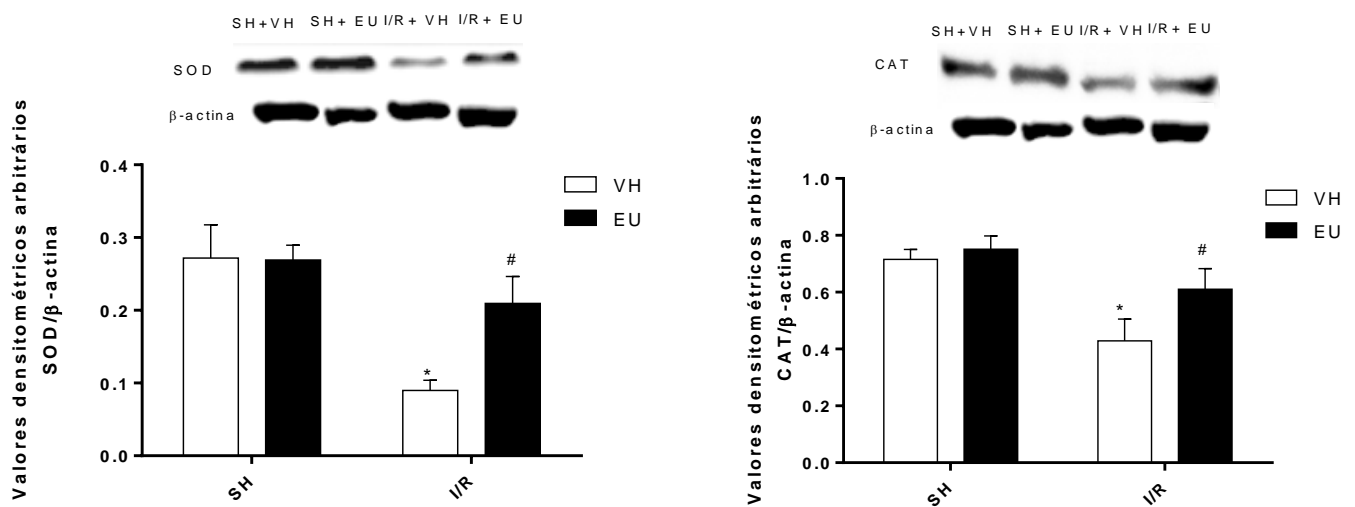


Figura 11: Análise por Western blot das enzimas SOD e Catalase em tecido renal dos animais tratados e não tratados com EU. Os dados foram expressos como média \pm EPM, SH+VH (catalase 0,710 \pm 0,090 (n=7) e SOD 0,271 \pm 0,046 (n=4); SH+EU = 6 (catalase 0,750 \pm 0,110 (n=6) e SOD 0,269 \pm 0,020 (n=4)); I/R+VH (catalase 0,420 \pm 0,100 (n=4) e SOD 0,090 \pm 0,14 (n=5)) e I/R+EU (catalase 0,080 \pm 0,200 (n=5) e SOD 0,209 \pm 0,037 (n=5)). * $p < 0,05$ vs Sham e # $p < 0,05$ vs IR+VH

4.3.5 Avaliação da participação das principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio

Visto que o tratamento prévio com *Eugenia uniflora* influencia no sistema de enzimas antioxidantes, nós também avaliamos se existem alterações na produção de ROS por meio das principais vias de produção que são a via mitocondrial, NADPH oxidase, e CYP450. Como já era esperado os animais submetidos ao processo de isquemia e reperfusão apresentam uma redução na produção de ROS quando ocorreram os bloqueios das enzimas oxidantes. Entretanto, o tratamento com *Eugenia uniflora* não influenciou na atividade enzimática das três principais vias oxidantes, pois não apresentou alteração na variação de DHE.

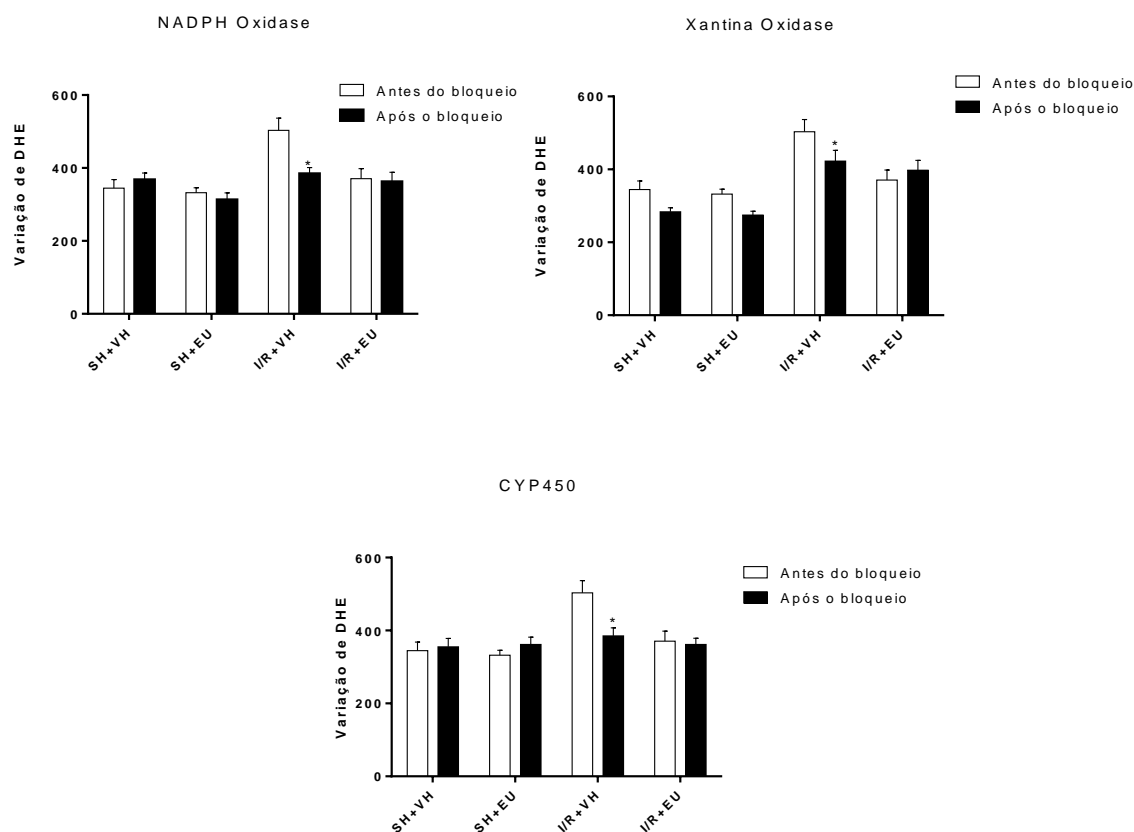


Figura 12: Avaliação das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio em células de tecido renal. Do lado esquerdo, os gráficos mostram os efeitos de inibidores das enzimas NADPHox, Xantina oxidase e citocromo P450 na produção de ROS. Valores expressos como média \pm EPM. Abreviações: NADPH oxidase (NADPHox) e citocromo P450 (CYP450).

4.4 Avaliação da apoptose

Os resultados de apoptose no rim podem ser visualizados na figura 13, que mostra a marcação pela Anexina V e PI. No início da apoptose, a fosfatidilserina, uma proteína normalmente localizada na superfície interna da membrana plasmática, transloca-se para superfície externa, ficando disponível para ligação com a Anexina V. O PI é um marcador específico de ácidos nucleicos que penetra nas células caso a membrana esteja permeável, não marcando as células vivas. Deste modo, a citometria de fluxo usando Anexina V e PI pode distinguir células vivas e saudáveis (Q3: Anexina V-/PI-) de células em apoptose inicial (Q4: Anexina V+/PI-) e células em apoptose tardia ou necróticas (Q2: Anexina V+/PI+). Os gráficos representativos (A) são as quantificações de apoptose (B) demonstram que a I/R aumenta significativamente a porcentagem de células apoptóticas renais ($10.20 \pm 1.2\%$) quando comparado com os animais Sham (SH+VH: 4.8 ± 1.25 ; SH+EU: 4.9 ± 0.19 %). O tratamento de EU promove um efeito benéfico no grupo I/R+EU ($3.9 \pm 0.9\%$), resultando em valores de apoptose bem próximos aos observados no grupo Sham.

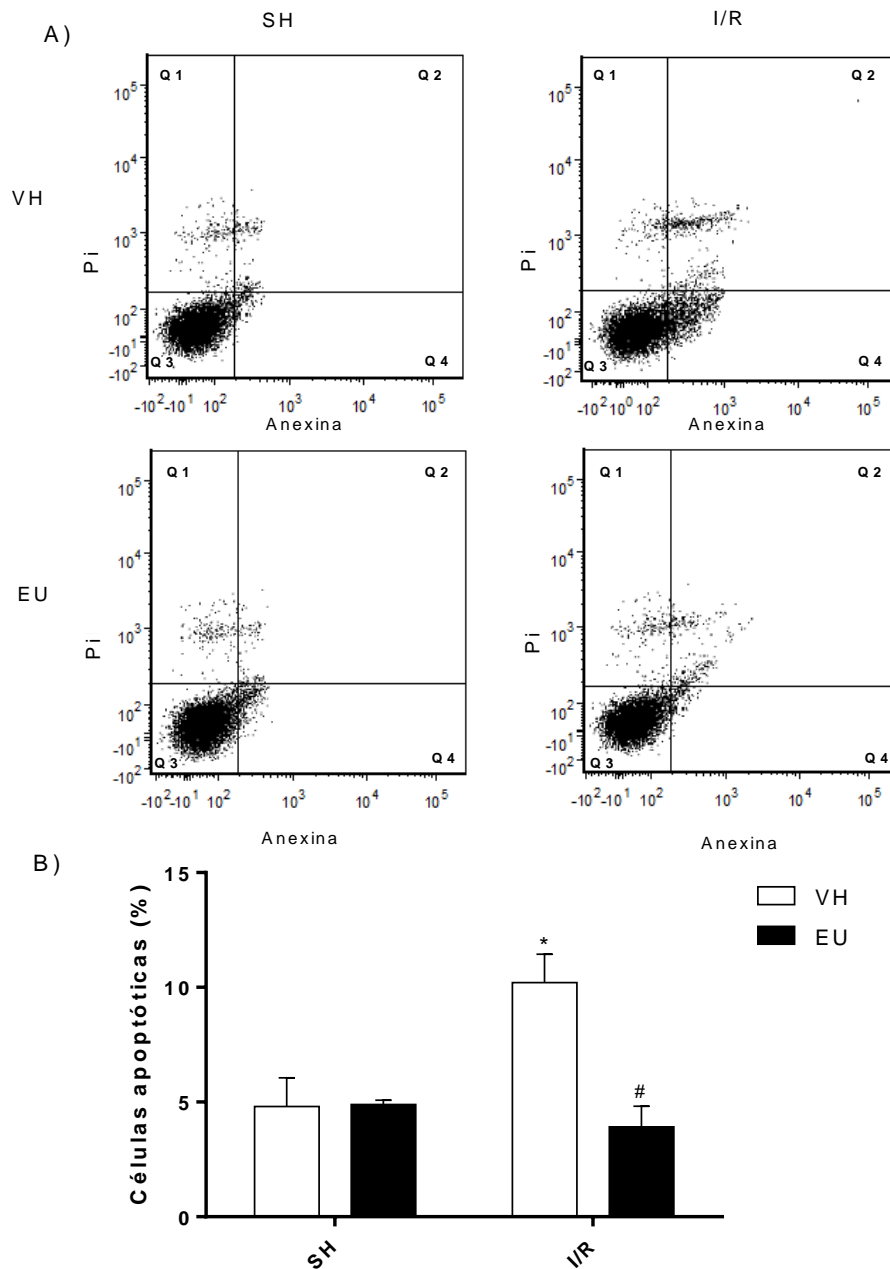


Figura 13: Detecção de apoptose por citometria de fluxo com Anexina-V e IP nos grupos SH+VH (n=4), SH+EU (n=4), I/R+VH (n=4), I/R+EU (n=5). (A) Dot plot representativo da citometria de fluxo de células renais marcadas com Anexina-V e PI. (B) Gráfico de barras mostrando a média de porcentagem de células apoptóticas (Q2+Q4) nos diferentes grupos. *p<0,05 vs. Sham; #p<0,05 vs. I/R+VH.

Diante dos resultados de ROS e de apoptose, apresentados pelos animais I/R tratados previamente com *Eugenia uniflora*, realizamos uma correlação entre apoptose e a produção de ROS (figura 14). A correlação demonstrou uma correlação positiva nos animais I/R+VH porém, nos animais I/R+EU essa correlação positiva desaparece evidenciando uma melhora da apoptose nos animais tratados devido uma diminuição de ROS.

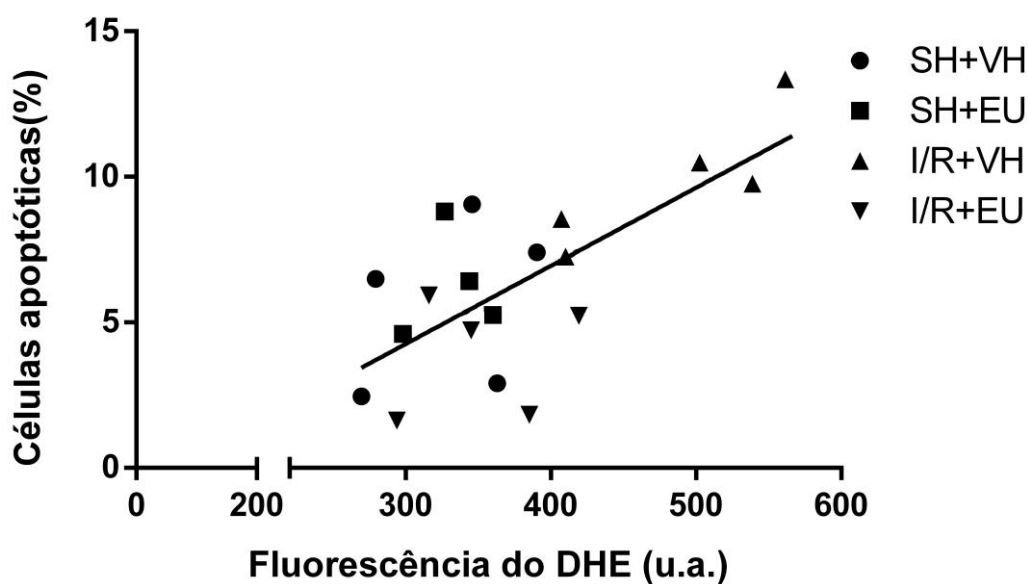


Figura 14: Análise de regressão linear e correlação entre apoptose (% de células positivas para Anexina) e produção de espécies reativas de oxigênio (fluorescência do DHE). Dados mostram uma correlação positiva entre apoptose e a produção de ROS no grupo I/R+VH mas sem correlação nos grupos SHAM e I/R+EU. A correlação entre variáveis foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson e um modelo de regressão linear.

5) DISCUSSÃO

Com os avanços da medicina alopática e da indústria farmacêutica nos últimos anos, os fitoterápicos foram colocados em segundo plano, sendo vistos como crendices populares e sem bases científicas. Entretanto, devido ao aumento dos efeitos colaterais e ao alto custo dos medicamentos, a Fitoterapia vem novamente sendo colocada em destaque e os estudos científicos com plantas medicinais sendo retomados.

Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que o uso da lectina de *Dioclea violacea*, produto natural de origem vegetal, possui propriedades benéficas sobre a função renal de animais I/R (FREITAS et al., 2015). Ainda, um outro trabalho do nosso grupo, demonstrou que o uso do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos SHR (dados ainda não publicados).

Diante do potencial dos produtos naturais como possíveis agentes terapêuticos, neste trabalho investigamos o papel protetor do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* na LRA experimental. Nossos resultados demonstram que a administração de 200mg/Kg do extrato durante 28 dias nos animais I/R preservou a taxa de filtração glomerular, o fluxo plasmático renal, o fluxo sanguíneo renal enquanto que, ao mesmo tempo, impediu o aumento da resistência vascular renal. O extrato de *Eugenia uniflora* também preveniu o aumento da apoptose nos animais com I/R. Ainda, na análise de estresse oxidativo foi revelado que o extrato evitou uma produção exacerbada de ROS nos animais com I/R em relação ao grupo sem tratamento. Diante desses achados, podemos considerar este produto natural como possível terapia coadjuvante em doenças renais.

Alguns estudos apresentados na literatura demonstram que grande parte dos produtos naturais que possuem uma ação de proteção renal desenvolvem essa habilidade por possuírem substâncias que apresentam um efeito antioxidante (FREITAS et al., 2015; LIMA et al., 2016). Sendo assim, fomos investigar quais os compostos presentes no extrato de folhas de *Eugenia uniflora* e encontramos os seguintes metabólitos secundários: compostos fenólicos, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas, e ausência dos compostos: cumarinas,

glicosídeos cardiotônicos e alcaloides, todos estes evidenciados em testes fitoquímicos qualitativos.

Os compostos fenólicos são descritos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (ROCHA et al., 2011). Existem aproximadamente cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonoides, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis, os quais possuem atividade antioxidante comprovada (MILENE ANGELO; JORGE, 2007).

Os nossos resultados corroboram com os dados da literatura. Alguns trabalhos demonstram que o extrato de *Eugenia uniflora* exibe a presença de compostos fenólicos (FORTES et al., 2015; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; VINHOLES; VIZZOTTO, 2017) e carotenoides (VINHOLES; VIZZOTTO, 2017). Outros trabalhos têm demonstrado que os principais flavonoides encontrados no extrato hidroalcoólico de EU são a miricetrina (LEE et al., 1997; SAMY et al., 2014), miricetina 3-O-(4''-O-galloyl)- α -L-rhamnopiranosídeo e a miricetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo (SAMY et al., 2014). Ainda também foram relatados a presença do flavonoide quercetina nos frutos (HOFFMANN-RIBANI et al., 2009).

Ainda, de acordo com a literatura, o tratamento com flavonoides pode ser uma promissora terapia para LRA. Como demonstrado por Ohkita e colaboradores, a suplementação de flavangnol, um flavonoide, foi capaz de melhorar a função renal de ratos que foram submetidos ao processo de isquemia e reperfusão renal (OHKITA et al., 2005). Em outro estudo foi avaliado o efeito de proteção renal dos flavonoides, e encontraram que uma redução dos fatores inflamatórios presentes no processo fisiopatológico da isquemia e reperfusão (ZHAO et al., 2016).

Apesar dos flavonoides serem os compostos mais ativos, com as principais atividades biológicas descritas (OKOH-ESENE et al., 2011), os taninos também possuem uma contribuição nos efeitos benéficos observados com o extrato de *Eugenia uniflora*. Taninos são compostos fenólicos, de grande interesse econômico e ecológico, possuem a habilidade de formar complexos insolúveis

em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MONTEIRO et al., 2005). Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que gera a perda do poder lubrificante (MONTEIRO et al., 2005). Além disso, os taninos também possuem um grande potencial antioxidante podendo dessa forma atuar na no sequestro de radicais livres.

O nosso resultado, em relação a presença de taninos, também corrobora com os da literatura. Alguns autores também encontraram taninos nos extratos de folhas de EU (AURICCHIO et al., 2007; FORTES et al., 2015; OKOH-ESENE et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Em relação aos taninos encontrados no extrato de folhas de EU os autores descrevem os seguintes taninos: oenoteína, eugeniflorina D1 ($C_{75}H_{52}O_{48}$) e eugeniflorina D2 ($C_{68}H_{48}O_{45}$) (LEE et al., 1997).

Os achados da literatura também demonstram que extratos contendo taninos exercem um efeito protetor sob os rins. Yadav e colaboradores demonstraram que o extrato de *Ficus religiosa*, rico em taninos, possui uma ação protetora contra os danos renais causados pela cisplatina, um fármaco que possui um alto índice lesivo renal. (YADAV; SRIVASTAVA, 2013).

Os carotenoides, também encontrados no extrato de *Eugenia uniflora*, possuem efeito protetor renal durante a isquemia e reperfusão, pois eles reduzem a peroxidação de lipídios e a produção de radicais livres (AUGUSTI et al., 2008; PALIPOCH; THAMMARAT, 2013)

Outro metabolito secundário encontrado no extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* foi o terpeno, esse metabolito secundário possui ampla ocorrência em plantas superiores. Além das plantas, esse composto também é encontrado em organismos marinhos, algas, microrganismos e em menor extensão em fungos. Em relação à estrutura química os mono e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e das resinas (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011). Os triterpenos possuem grande interesse devido a seu amplo espectro de atividade biológica, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica e antioxidante (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011)

Além dos triterpenos, os sesquiterpenos constituem outra classe de terpenos com grande diversidade de estruturas e de ocorrência em plantas, fungos e algumas bactérias. Nas plantas, participam ativamente dos processos de interações entre planta-planta, planta-inseto e planta-patógeno protegendo-as dos ataques de predadores (FEHLBERG, 2011). Os óleos essenciais constituem uma grande fonte de sesquiterpenos e os compostos bisabolol, cariofileno, α -cadineno, β -farneseno e β -selineno apresentam ampla distribuição nos voláteis de espécies das famílias Labiatae, Myrtaceae, Pinaceae, Rutaceae e Lauraceae (FEHLBERG, 2011). Trabalhos já relatam o uso nefroprotetor de sesquiterpenos, alguns autores já descrevem essa ação do bisabolol, que possui atividade antioxidante e diminui o dano renal causado pela isquemia e reperfusão (LIMA et al., 2016).

O modelo experimental usado para simular a LRA foi a isquemia/reperfusão renal, que foi realizada pela ligadura das artérias renais direita e esquerda durante 45 minutos, seguida de reperfusão por um período de 24 horas, uma vez que a lesão por isquemia e reperfusão é uma das principais causas de LRA (BAGUL; FROST; DRAGE, 2013; LE CLEF et al., 2016). Em nosso estudo, observamos uma redução da taxa de filtração glomerular, o fluxo plasmático renal, o fluxo sanguíneo renal e um aumento da resistência vascular renal nos animais submetidos à isquemia reperfusão que receberam veículo, estando em conformidade com outros trabalhos, que demonstram uma diminuição no fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular, aumento da apoptose e espécies reativas de oxigênio (BETZ et al., 2012b; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012b).

Uma vez demonstrado que o modelo é representativo em relação aos mecanismos fisiopatológicos da LRA, observamos que o tratamento prévio com o extrato de *Eugenia uniflora* foi capaz de prevenir a queda da taxa de filtração glomerular e o do fluxo sanguíneo renal bem como o aumento da resistência vascular renal dos animais isquêmicos. Na literatura até o presente momento não temos trabalhos demonstrando que o uso do extrato de *Eugenia uniflora* previne a alteração da função renal de ratos com lesão renal aguda. Entretanto, sendo o gênero *Eugenia* pertencente à família Myrtaceae, alguns trabalhos demonstram que extratos de plantas pertencente a essa família possuem efeitos de proteção renal. A *Eugenia dysenterica* DC., também

pertencente à família Myrtaceae, possui uma propriedade protetora renal contra lesões induzidas por metais pesados como cromo (ÁVILA et al., 2016).

Uma das moléculas mais importantes para a hemodinâmica renal é o óxido nítrico (NO). Este radical é sintetizado durante a conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina pela família de enzimas conhecidas como NOS (Óxido Nítrico Sintase). Durante a isquemia o NO parece proteger o tecido isquêmico, por ter ação vasodilatadora. De maneira compensatória, durante este processo a eNOS é ativada e tem sua expressão aumentada (GOLIGORSKY; BRODSKY; NOIRI, 2002). Alguns estudos demonstraram que o aumento da atividade da eNOS está associada com uma redução da lesão por I/R (CHEN et al, 2008). Corroborando este dado, outro estudo demonstra um aumento do dano renal com a redução da eNOS, fortalecendo a hipótese de participação da eNOS na regulação da produção do NO durante a isquemia e reperfusão e prevenção da lesão renal (BETZ et al., 2012b) .

Na fase de reperfusão, o NO pode reagir com os radicais superóxido, impedindo a reação em cadeia para a produção adicional de espécies reativas de oxigênio (ROS), e, assim, reduzir a ativação de leucócitos e a formação de mediadores inflamatórios. No entanto, o excesso da produção de NO pode ser prejudicial devido à sua capacidade para gerar o peroxinitrito, o qual pode causar a peroxidação lipídica das membranas celulares (CHIAZZA et al., 2015).

Diante disso, acreditamos que um dos mecanismos envolvidos na conservação da TFG, FPR e FSR bem como na manutenção da RVR nos animais I/R que utilizaram o extrato de *Eugenia uniflora* seja através do aumento da expressão da eNOS atuando na regulação da produção de NO. A literatura apresenta resultados de proteção renal via aumento da eNOS com a utilização de produtos naturais. De acordo, o extrato de própolis é capaz de melhorar a expressão da eNOS durante a I/R, conferindo proteção renal (BEZERRA; COSTA, 2013). Uma outra hipótese seria uma redução da expressão da iNOS, uma vez que essa isoforma participa na progressão da lesão renal. Alguns estudos demonstram que os flavonoides, substância presente no extrato de *Eugenia uniflora*, reduz a expressão da iNOS (DUARTE; FRANCISCO; PEREZ-VIZCAINO, 2014)

Outras plantas também são capazes de alterar a função dos rins submetidos a isquemia/reperfusão. Como exemplo, a administração do extrato etanólico de *Nigella sativa* age como um efetivo varredor de radicais livres no processo de

isquemia e reperfusão, dessa forma diminuindo o prejuízo renal (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2017; KHAZDAIR, 2015). Outro extrato, com ação de proteção renal, é a *Zingiber officinale* sua principal ação é agir como um imunomodulador das respostas inflamatórias (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2017). A romã, *Punica granatum*, também possui uma ação antioxidante nos rins o que promove uma melhora da função renal de animais submetidos ao processo de isquemia e reperfusão (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2017; HASHEMI et al., 2013). De maneira interessante, todas estas plantas possuem na composição de seus extratos a presença de flavonoides (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2017), indicando que esta substância possa realmente desempenhar um papel protetor renal.

Os mecanismos moleculares subjacentes à lesão renal induzida por isquemia / reperfusão não são claros, mas diversos estudos têm relatado que vários fatores como: depleção de ATP, ativação de fosfolipases e infiltração de neutrófilos contribuem para a patogênese desse dano renal. O estresse oxidativo também foi considerado como um dos fatores que definitivamente estão envolvidos no desenvolvimento da LRA (OHKITA et al., 2005). Em nosso estudo, a produção de espécies reativas e altamente reativas de oxigênio foi avaliada separadamente no córtex e na medula renal por meio da produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroxila. Estas espécies reativas de oxigênio são produzidas por vias normais do metabolismo e são retiradas do organismo por antioxidantes, no entanto, em excesso, podem exercer reações prejudiciais (BARADARAN; NASRI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

O ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) é o resultado de uma redução de oxigênio por várias oxidases, como xantina oxidase, dihidro nicotinamida adenina dinucleótido oxidase e ciclooxigenase. Além desses mecanismos de formação de ânion superóxido, as mitocôndrias, por meio de sua cadeia de transporte de elétrons que começam em fosforilação oxidativa com o objetivo de produção de ATP, contribuem para a produção de ânion superóxido (DRÖSE; BRANDT, 2012; GUTTERIDGE, 1994).

Na I/R, o $\bullet O_2^-$ desempenha um importante papel, atuando no recrutamento de neutrófilos para área da lesão, o que amplia a extensão do dano inicial (ANDREOLI, 1991; SEHAJPAL et al., 2014). Além disso, apesar do $\bullet O_2^-$ ser um

oxidante fraco, ele atua como um precursor de espécies de oxigênio mais fortes, como peróxido, peroxinitrito, hipoclorito e cloraminas (ANDREOLI, 1991; MASZTALERZ et al., 2006).

Outra espécie que participa nos processos de lesão e danos celulares é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A presença de oxidases pode resultar na síntese direta de peróxido de hidrogênio por transferência de dois elétrons para o oxigênio molecular. H_2O_2 é capaz de produzir radicais altamente reativos como resultado da sua interação com íons metálicos. A ação direta do H_2O_2 envolve o ataque à estrutura das proteínas heme com liberação de ferro, inativação enzimática e oxidação de DNA, lipídios e grupos -SH. H_2O_2 pode ser esgotado pela catalase, a enzima contendo ferro heme envolvida na conversão de peróxido de hidrogênio em água (GUTTERIDGE, 1994; PISOSCHI; POP, 2015). Assim como ocorre com o $\bullet O_2^-$ em modelos experimentais de isquemia/reperfusão renal, é demonstrado que o H_2O_2 apresenta-se aumentado nos rins dos animais insuficientes quando comparado com o Sham (HUANG et al., 2012).

Outro radical que é altamente perigoso devido a sua reatividade ser a mais elevada são os radicais hidroxila (OH). Ao contrário dos radicais superóxido que são considerados relativamente estáveis e têm taxas de reação relativamente baixas e constantes com componentes biológicos, os radicais hidroxílicos são espécies de curta duração que possuem alta afinidade para outras moléculas. (OH), como já mencionado, é um poderoso agente oxidante que pode reagir com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas da célula, incluindo DNA, proteínas, lipídios, aminoácidos, açúcares e metais. As 3 principais reações químicas de radicais hidroxílicos incluem a absorção, adição e transferência de elétrons de hidrogênio (KOHEN; NYSKA, 2002).

O ânion peroxinitrito é um potente oxidante produzido pela reação entre o $\bullet O_2^-$ e o óxido nítrico (NO) ($NO + \bullet O_2^- = ONOO^-$). Quando o $ONOO^-$ está na forma protonada ($ONOOH$), possui reatividade semelhante ao OH (LI; JACKSON, 2002; NOIRI et al., 2001). Tanto o OH, quanto o $ONOO^-$ podem ser classificados como espécies altamente reativas de oxigênio por possuir poder oxidante forte o suficiente para hidroxilar diretamente anéis aromáticos (SETSUKINAI et al., 2003).

No nosso estudo observamos um aumento da produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ânion peroxinitrito na medula renal dos animais isquêmicos e que foram prevenidos pelo tratamento com extrato de *Eugenia uniflora*. Interessantemente, não foram constatadas diferenças na produção de ROS no córtex renal entre os diferentes grupos. O fato da produção de radicais livres ser maior na medula do que no córtex renal pode ser explicada pois o processo fisiopatológico da LRA provocada por isquemia/reperfusão renal desencadeia, principalmente, mudanças estruturais e funcionais em células tubulares e endoteliais, com dano proeminente nos néfrons justamedulares e remodelamento túbulo-intersticial mais evidente na medula do que no córtex (BAGUL; FROST; DRAGE, 2013). Além disso, estruturas localizadas na medula renal, como o ramo medular ascendente espesso da alça de Henle, são particularmente sensíveis à diminuição do oxigênio, sendo bastante afetadas durante a isquemia (BEŁTOWSKI, 2010).

Tendo em vista que o desenvolvimento do estresse oxidativo contribui para a indução da lesão renal na I/R, o tratamento da LRA com diversas substâncias antioxidantes tem se mostrado promissor. Como exemplos podemos citar o tempol (CHATTERJEE et al., 2000) e a vitamina C (MILORADOVIC et al., 2009). Entretanto, outras substâncias também são prósperas para reduzir o desenvolvimento da lesão renal aguda como: agonistas do receptor de proliferação de peroxissomo ativado (BETZ et al., 2012b; ZOU et al., 2013), inibidores da fosfodiesterase-4 (MAMMADOV et al., 2012) e inibidores da fosfodiesterase-5 (DE ALMEIDA et al., 2016; ZAHRAN et al., 2015a). Moléculas que atuam inibindo a infiltração de neutrófilos também se mostraram capazes de reduzir o estresse oxidativo na I/R (HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012a). Apesar de existirem substâncias com grande potencial para a prevenção e ou tratamento da lesão renal aguda, o uso de extratos de plantas, como o extrato de *Eugenia uniflora*, possuem mais benefícios devido ao seu efeito multi-alvo por causa de seus vários constituintes. Ainda, os extratos já são utilizados por vários anos apresentando uma segurança para o uso (BRUSOTTI et al., 2014).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial antioxidante das plantas do gênero *Eugenia*. Um estudo desenvolvido por Falcão e colaboradores (2018) demonstrou que tanto o extrato completo quanto as frações aquosa e orgânica das folhas de *Eugenia Uniflora* apresentam efeito antioxidante (FALCAO et al.,

2018) . O extrato etanólico de *Eugenia uniflora* também apresentou propriedades antioxidantes em células sanguíneas, hepáticas e cerebrais (DA CUNHA et al., 2016). Corroborando estes dados, a administração do suco de *Eugenia uvalha* em ratos que receberam dieta hiperlipídica promoveu aumento da atividade da catalase, aumento os níveis de glutathiona oxidada, bem como reduziu a relação glutathiona/glutathiona oxidada, indicando um aumento das defesas antioxidantes (LOPES et al., 2018).

Em sistemas aeróbicos, o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante é essencial para a homeostase. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O_2 (ROSS , 1991). Para sua proteção a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSHPx, entre outros. Com exceção da vitamina E (α - tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ROSS , 1991). Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante. As lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino são prevenidas por SOD, catalase ou allopurinol, sendo este último um bloqueador da produção de O_2^- . pela via da xantina-oxidase (HEBBEL, 1986).

O desequilíbrio entre as enzimas antioxidantes e a produção excessiva de ROS durante o processo de lesão isquêmica estão envolvidos na lesão oxidativa renal (MCCORD; EDEAS, 2005). Sendo assim, buscamos avaliar as vias de produção de ROS e da capacidade antioxidante. Diante dos nossos achados observamos que o extrato de *Eugenia uniflora* foi capaz de aumentar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, e a glutathiona peroxidase, enzimas que reduzem as taxas de oxidação no organismo e, por conseguinte, interrompem a progressão da lesão na I/R. Os dados da literatura demonstram que o uso de

produtos naturais, tais como extratos de plantas, possuem um potencial terapêutico sob a I/R devido a presença de flavonoides, polifenóis e saponinas os quais estão envolvidos na redução do estresse oxidativo por mecanismos semelhantes, como por exemplo o aumento da atividade da SOD, catalase, glutathione peroxidase (PALIPOCH; THAMMARAT, 2013) e diminuição dos fatores inflamatórios (YANG et al., 2016). Corroborando estes dados, Erbogga e colaboradores demonstraram que o uso de quercetina, um flavonoide presente em vários extratos de plantas, foi capaz de aumentar a expressão proteica da SOD e catalase e dessa forma impedindo a progressão da lesão renal (ERBOGA et al., 2015). Ainda, o extrato de *Hypericum organifolium* foi capaz de realizar uma proteção renal nos animais com isquemia e reperfusão sendo atribuído essa ação ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes e com redução do estresse oxidativo (SENTURK et al., 2013). Em outro estudo observou que produtos naturais, oriundos da medicina tradicional chinesa, possuem o efeito de diminuir os danos causados pela isquemia e reperfusão devido ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes (DONG et al., 2016).

Estudos tem evidenciado a existência de um sistema de regulação de transcrição de genes antioxidantes chamado de Nrf2/Keap1 (Fator nuclear fator eritróide 2 relacionado com proteína Kelch-like ECH associada 1). Esse sistema funciona da seguinte forma: em condições normais a proteína Keap 1, presente no citosol, sequestra a Nrf2 e encaminha a mesma para ubiquitinação, processo de marcação com a proteína ubiquitina. Uma vez marcada com a ubiquitina o complexo formado Nrf2/ubiquitina é degradado por um complexo multiproteico denominado proteassoma. Em condições de estresse oxidativo os resíduos de cisteínas presentes na Keap1 são modificados promovendo mudanças conformacionais levando à liberação de Nrf2 e à ativação transcricional de uma série de genes portadores de elementos de respostas antioxidantes, que codificam enzimas desintoxicantes, enzimas de remoção de ROS (CHOI; KANG; KWAK, 2014; SHELTON; KEVIN PARK; COPPLE, 2013).

Dados da literatura demonstram que os flavonoides possuem propriedades de interferir nessa via de transcrição. Qiu e colaboradores demonstraram que os flavonoides possuem propriedades de ativação da via Nrf2 promovendo uma melhora do estresses oxidativo (QIU et al., 2017). Segundo Wakabayashi e

colaboradores substâncias como os triterpenoides possuem a propriedade de modificar os resíduos de cisteínas da Keap1 levando a ativação da via Nrf2 promovendo um aumento codificação de enzimas antioxidantes como SOD, catalase e glutathione peroxidase (WAKABAYASHI et al., 2004). Assim, podemos especular este seja um possível mecanismo pelo qual o extrato de *Eugenia uniflora* aumente a expressão das enzimas antioxidantes e previna o aumento do estresse oxidativo na LRA induzida pela isquemia reperusão.

Também é conhecido que a isquemia/reperusão renal leva ao aumento da atividade de enzimas oxidantes, como NADPH oxidase e xantina oxidase, que geram espécies reativas de oxigênio e induzem metaloproteinases da matriz (TSUDA et al., 2012; WU et al., 2009), corroborando com os achados da literatura os nossos resultados apresentaram um aumento da atividade das enzimas oxidantes nos animais com isquemia reperusão. Entretanto, o tratamento com o extrato não reduziu a atividade dessas enzimas. Sendo assim, sugerimos que o principal mecanismo de ação do extrato de *Eugenia uniflora* é via aumento da atividade da via antioxidante.

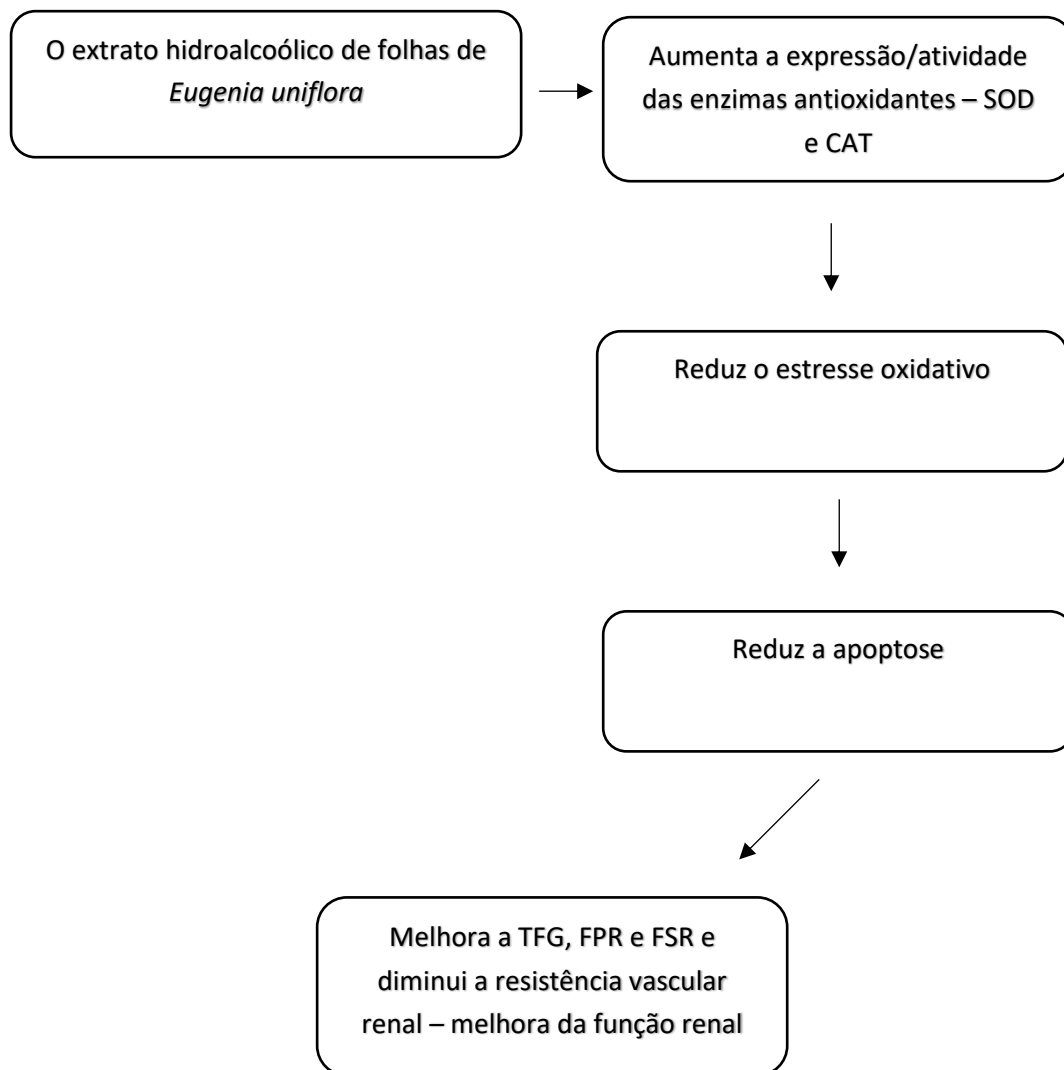
Sabendo que a lesão renal por isquemia e reperusão é resultante de eventual morte de células renais devido a uma combinação de apoptose e necrose, avaliamos por citometria de fluxo o rim dos ratos I/R, os quais apresentaram células apoptóticas, corroborando com outros estudos no mesmo modelo experimental de LRA, tanto em ratos (SI et al., 2014), quanto em camundongos (KUMAR et al., 2009). Nosso estudo é o primeiro a avaliar os efeitos do extrato de *Eugenia uniflora* na apoptose in vivo quando administrada por via oral, e observamos que o tratamento com o extrato foi capaz de reduzir a apoptose nos ratos isquêmicos até os níveis do Sham.

Outros extratos hidroalcoólico de plantas como *Eugenia dysenterica*, possuem efeito de redução de apoptose renal como demonstrado por Ávila e colaboradores em que o tratamento promoveu uma proteção renal por diminuição da apoptose e do estresse oxidativo (ÁVILA et al., 2016). Entretanto, em um outro estudo Denardin e colaboradores demonstram que o extrato da pitanga roxa induziu a apoptose por ativação do mecanismo de autofagia celular, porém de acordo com o próprio autor esse mecanismo ativado pelo extrato de pitanga roxa precisa ser melhor esclarecido (DENARDIN et al., 2017).

A melhora da apoptose no grupo I/R tratado com extrato de *Eugenia uniflora* pode estar associada com a diminuição de espécies de oxigênio neste grupo, uma vez que está bem estabelecido que a produção de espécies reativas de oxigênio são capazes de iniciar morte celular nas formas de necrose ou apoptose (LI; JACKSON, 2002). Sendo assim, os nossos resultados de correlação corroboram com a literatura pois, demonstramos que existe uma correlação positiva entre a produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose e a mesma desaparece quando ocorre uma diminuição das ROS. Dessa forma, o aumento de ROS está diretamente associada ao aumento da apoptose nos rins colaborando para a progressão da lesão renal.

6) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados acima apresentados, podemos formular a seguinte hipótese sobre os efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia uniflora* sobre a LRA induzida pela isquemia reperfusão renal:



7) CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o extrato das folhas de *Eugenia uniflora* possui efeitos benéficos na lesão renal aguda induzida pela técnica de isquemia/reperfusão renal. Esta melhora da função renal parece estar ligada à redução do estresse oxidativo e da apoptose. Estes achados sugerem que o extrato da *Eugenia uniflora* possui potencial para utilização como terapia coadjuvante para prevenção da lesão renal aguda.

8) REFERÊNCIAS

AGARWAL, N. et al. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Revista Multiciência**2, v. 61, n. 1, p. 1359–1369, 2009.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. São Paulo: [s.n.].

ALICE, C. B. et al. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 165–71, dez. 1991.

AMAT, A. G.; VAJIA, M. E. Plantas medicinales y etnofarmacología en la provincia de Misiones (Argentina). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 1991.

ANDREOLI, S. P. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 5, n. 6, p. 733–742, nov. 1991.

ARAI, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 68, n. 1–3, p. 307–314, dez. 1999.

AUGUSTI, P. R. et al. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 1, p. 212–219, jan. 2008.

AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76–81, 2007.

ÁVILA, R. I. DE et al. *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage *in vitro* and *in vivo*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2652–2663, 30 nov. 2016.

BAGUL, A.; FROST, J. H.; DRAGE, M. In-Depth Topic Review Stem Cells and Their Role in Renal Ischaemia Reperfusion Injury. **Am J Nephrol**, v. 37, p. 16–29, 2013.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from medicinal plants**. Life Sciences. **Anais...2005** Disponível em: <http://webpace.pugetsound.edu/facultypages/bdasher/Chem361/Review_Arti

cles_files/Drugs from Plants.pdf>. Acesso em: 19 set. 2017

BANDONI, A. L. et al. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. **Lloydia**, v. 35, n. 1, p. 69–80, mar. 1972.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 358–367, 4 abr. 2014.

BARROS, E. **Medicina Interna na Prática Clínica**. Porto Alegre - RS: Artmed: [s.n.].

BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 257–267, nov. 2014.

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

BELTOWSKI, J. Hypoxia in the Renal Medulla: Implications for Hydrogen Sulfide Signaling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 2, p. 358 LP-363, 16 jul. 2010.

BETZ, B. et al. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. **PPAR Res**, v. 2012, p. 219319, 2012a.

BETZ, B. et al. Rosiglitazone Affects Nitric Oxide Synthases and Improves Renal Outcome in a Rat Model of Severe Ischemia/Reperfusion Injury. **PPAR Research**, v. 2012, p. 1–12, 2012b.

BEZERRA, M. F.; COSTA, D. **ESTUDO DO EFEITO NEFROPROTETOR DO EXTRATO ALCOÓLICO DE Própolis vermelha EM UM MODELO DE LESÃO RENAL AGUDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RATOS**. [s.l: s.n.].

BOOZARI, M.; HOSSEINZADEH, H. Natural medicines for acute renal failure: A review. **Phytotherapy Research**, 13 out. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL, P. B. **SUS tem fitoterápicos para doenças simples — Portal Brasil**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 19 set. 2017.

BRASIL DATASUS. **Mortalidade por insuficiência renal aguda**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 18 set. 2017.

BRUSOTTI, G. et al. **Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Elsevier, , 18 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708513001179?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 fev. 2018

CAMPAGNARO, B. P. et al. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. **International Journal of Hypertension**, p. ID 305302, jan. 2013.

CHATTERJEE, P. K. et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. **Kidney international**, v. 58, n. 2, p. 658–673, ago. 2000.

CHIAZZA, F. et al. A nitric oxide-donor furoxan moiety improves the efficacy of edaravone against early renal dysfunction and injury evoked by ischemia/reperfusion. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

CHOI, B. H.; KANG, K. S.; KWAK, M. K. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12727–12759, 2014.

COHEN, M. L. Radionuclide clearance techniques. **Seminars in nuclear medicine**, v. 4, n. 1, p. 23–38, jan. 1974.

DA CUNHA, F. A. B. et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic

extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 84, p. 614–621, dez. 2016.

DE ALMEIDA, L. S. et al. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. **Human & experimental toxicology**, jan. 2016.

DE SOUZA PINTO, R. et al. Inhibition of Macrophage Oxidative Stress Prevents the Reduction of ABCA-1 Transporter Induced by Advanced Glycated Albumin. **Lipids**, v. 47, n. 5, p. 443–450, 21 maio 2012.

DENARDIN, C. C. et al. Autophagy induced by purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract triggered a cooperative effect on inducing the hepatic stellate cell death. **Cell Biology and Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 197–206, 2017.

DIAS, A. T. et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of translational medicine**, v. 12, p. 35, 6 fev. 2014.

DONG, Q. et al. The protective effect of herbal polysaccharides on ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 431–440, 1 nov. 2016.

DRÖSE, S.; BRANDT, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 748, p. 145–169, 2012.

DUARTE, J.; FRANCISCO, V.; PEREZ-VIZCAINO, F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. **Food Funct.**, v. 5, n. 8, p. 1653–1668, 2014.

DUMAY, A. et al. The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. **Free radical biology & medicine**, v. 40, n. 8, p. 1377–1390, abr. 2006.

EL-SHENAWY, S. M. A. Evaluation of some pharmacological activities of ethanol extracts of seeds, pericarp and leaves of *Eugenia Jamolana* in rats. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 85–92, abr. 2009.

ERBOGA, M. et al. Renal Failure Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. **Ren Fail**, v. 37, n. 9, p. 1525–6049, 2015.

FALCAO, T. R. et al. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 84, mar. 2018.

FEHLBERG, I. **Terpenos e Fenilpropanoides de *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE)**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. RADICAIS LIVRES: CONCEITOS E MECANISMO DE LESÃO Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61–8, 1997.

FERRO, E. et al. EUGENIA UNIBZORA LEAF EXTRACT AND LIPID METABOLISM IN CEI?US APELLA MONKEYS. **Journal of Ethnopharmncology**, v. 24, p. 321–325, 1988.

FIUZA, T. . et al. Caracterização farmacognóstica das folhas de. v. V, n. 2, p. 1–11, 2008.

FOLKMANN, J. K.; LOFT, S.; MØLLER, P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE À/À and wild-type mice. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 105–110, 2007.

FORTES, G. A. C. et al. Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoid Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 2, p. 251–256, abr. 2015.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 4, p. 449–457, ago. 2009.

FREITAS, F. P. et al. Dioclea violacea lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in an experimental model of acute kidney injury. **American journal of translational research**, v. 7, n. 12, p. 2573–88, 2015.

FUHR, J.; KACZMARCZYK, J.; KRUTTGEN, C. D. [A simple colorimetric method

of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics]. **Klinische Wochenschrift**, v. 33, n. 29–30, p. 729–730, ago. 1955.

GARCIA MDEL, C.; GODOY, Y. C.; CELUCH, S. M. Impaired hypotensive responses induced by intrathecally injected drugs in fructose-fed rats. **Eur J Pharmacol**, v. 706, n. 1–3, p. 17–24, 2013.

GELSÅ, H. The renal clearance of inulin, creatinine, trimethoprim and sulphadoxine in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 2, n. 4, p. 257–264, 1 dez. 1979.

GHOSH, A. et al. Antiapoptotic efficacy of seed of *Eugenia jambolana* on testicular germ cell in experimental diabetic rat: A genomic study. **Andrologia**, v. 48, n. 3, p. 282–292, abr. 2016.

GOLIGORSKY, M. S.; BRODSKY, S. V.; NOIRI, E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. **Kidney International**, v. 61, n. 3, p. 855–861, mar. 2002.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. et al. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 245–260, 2011.

GUTTERIDGE, J. M. C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 91, p. 133–140, 1994.

HAGAR, H. H.; ABD EL TAWAB, R. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **J Surg Res**, v. 178, n. 1, p. e25-34, 2012a.

HAGAR, H. H.; ABD EL TAWAB, R. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **J Surg Res**, v. 178, n. 1, p. e25-34, nov. 2012b.

HASHEMI, K. et al. Turkish Journal of Biology Pomegranate (*Punica granatum* L.) reduces endoplasmic reticulum stress induced by renal ischemia/reperfusion injury in rat. **Turk J Biol**, v. 37, p. 464–471, 2013.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **The**

Journal of laboratory and clinical medicine, v. 107, n. 5, p. 401–4, maio 1986.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 263–268, 2009.

HUANG, L. et al. Overexpression of stanniocalcin-1 inhibits reactive oxygen species and renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Kidney international**, v. 82, n. 8, p. 867–877, 13 out. 2012.

JOSINO SOARES, D. et al. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. **Food Funct.**, v. 5, n. 11, p. 2981–2988, 17 set. 2014.

KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury. **Official Journal of the International Society of Nephrology - Kidney International Supplements**, v. 2, n. 1, p. 124–138, 2012.

KELLUM, J. A et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Kidney international supplements**, v. 2, n. 1, p. 1–138, 2012.

KELLUM, J. A.; LAMEIRE, N. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). **Critical Care**, v. 17, n. 1, p. 204, 4 fev. 2013.

KHAZDAIR, M. R. **The Protective Effects of Nigella sativa and Its Constituents on Induced Neurotoxicity** *Journal of Toxicology* Hindawi, , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26604923>>. Acesso em: 17 out. 2017

KOHEN, R.; NYSKA, A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620–650, out. 2002.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. **Canadian Journal of Surgery**, v. 56, n. 1, p. 6–14, fev. 2013.

KUMAR, S. et al. Dexamethasone Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 20, n. 11, p.

2412–2425, 19 nov. 2009.

LE CLEF, N. et al. Unilateral renal ischemia-reperfusion as a robust model for acute to chronic kidney injury in mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016.

LEE, M. H. et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343–1349, 1 abr. 1997.

LI, C.; JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 282, n. 2, p. C227-41, fev. 2002.

LI, P. K. T.; BURDMANN, E. A.; MEHTA, R. L. Acute kidney injury: global health alert. **Kidney International**, v. 83, n. 3, p. 372–376, 1 mar. 2013.

LIMA, T. et al. ischemic-reperfusion acute kidney injury. v. 23, p. 1843–1852, 2016.

LOMBARDI, R. et al. Epidemiology of Acute Kidney Injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 320–329, 1 jul. 2008.

LOPES, J. M. M. et al. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 105, p. 563–569, mar. 2018.

MAKRIS, K.; SPANOU, L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 37, n. 2, p. 85–98, 2016.

MALEK, M.; NEMATBAKHS, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of renal injury prevention**, v. 4, n. 2, p. 20–7, 2015.

MAMMADOV, E. et al. Protective effects of phosphodiesterase-4-specific inhibitor rolipram on acute ischemia-reperfusion injury in rat kidney. **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1390.e1-6, dez. 2012.

MARIANI, N. A. P. **EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**,

2016.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998–1006, 1 jan. 2011.

MASZTALERZ, M. et al. Superoxide anion as a marker of ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. **Transplantation proceedings**, v. 38, n. 1, p. 46–48, 2006.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. [s.l.] Edições UFC, 2009.

MCCORD, J. M.; EDEAS, M. A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, n. 4, p. 139–142, maio 2005.

MCNALLY, J. S. et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 285, n. 6, p. H2290–H2297, dez. 2003.

MILENE ANGELO, P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

MILORADOVIC, Z. et al. Comparative effects of L-arginine and vitamin C pretreatment in SHR with induced postischemic acute renal failure. **General physiology and biophysics**, v. 28 Spec No, p. 105–111, 2009.

MONGA, J. et al. Growth inhibition and apoptosis induction by (+)-cyanidan-3-ol in hepatocellular carcinoma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68710, 2013.

MONTEIRO, J. M. et al. **Taninos: Uma abordagem da química à ecologia** *Quimica Nova*, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n5/25920.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2017

NASH, K.; HAFEEZ, A.; HOU, S. Hospital-acquired renal insufficiency. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, n. 5, p. 930–936, 1 maio 2002.

NOIRI, E. et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 281, n. 5, p. F948 LP-F957, 1 nov. 2001.

OHKITA, M. et al. Preventive effect of flavangenol on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. **BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 28, n. 9, p. 1655–1657, 2005.

OKOH-ESENE et al. Proximate and phytochemical analysis of leaf , stem and root of *Eugenia uniflora* (Surinam or Pitanga cherry). **Journal of Natural Product and Plant Resource**, v. 1, n. 4, p. 1–4, 2011.

PALIPOCH, S.; THAMMARAT, N. S. Palipoch Afr J Tradit Complement Altern Med . (2013) 10 (4): 88-93. v. 10, p. 88–93, 2013.

PATEL, N. S. A. et al. Endogenous Interleukin-6 Enhances the Renal Injury, Dysfunction, and Inflammation Caused by Ischemia/Reperfusion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 1170–1178, 1 dez. 2004.

PIO CORRÊA, M.; PENA, L. DE A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas (e-book, 1984) [WorldCat.org]**. 1. ed. Rio de Janeiro : [s.n.].

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PRICE, P. M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. The cell cycle and acute kidney injury. **Kidney international**, v. 76, n. 6, p. 604–613, set. 2009.

QIU, Y. et al. Total Flavonoid Extract from *Abelmoschus manihot* (L.) Medic Flowers Attenuates <sc>d</sc>-Galactose-Induced Oxidative Stress in Mouse Liver Through the Nrf2 Pathway. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 6, p. 557–567, 2017.

RATERA, E.E., RATERA, M. O. **Plantas de la Flora Argentina empleadas en Medicina Popular**. [s.l: s.n.].

REWA, O.; BAGSHAW, S. M. Acute kidney injury—epidemiology, outcomes and

- economics. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, n. 4, p. 193–207, 21 jan. 2014.
- RICCI, Z.; RONCO, C. New insights in acute kidney failure in the critically ill. **Swiss Med Wkly**, v. 142, p. w13662, jan. 2012.
- ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.
- ROSS D, M. P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C. In: **Membrane lipid oxidation**. 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 151–70.
- SABBAHY, M. EL; VAIDYA, V. S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 3, n. 5, p. 606–618, set. 2011.
- SAMY, M. et al. **Bioactive compounds from the leaves of Eugenia uniflora**. [s.l: s.n.]. v. 7
- SANTOS, R. . et al. Seasonal variation in the phenol content of Eugenia uniflora L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 85–89, 2011.
- SCHACHNIK, N. C. et al. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. **J Immunol Methods**, v. 343, n. 2, p. 103–111, 2009.
- SCHAPOVAL, E. E. et al. Evaluation of some pharmacological activities of Eugenia uniflora L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 137–142, dez. 1994.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on Eugenia uniflora leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183–186, nov. 1987.
- SECCO, L. M. DAL; CASTILHO, V. Expenditure survey on continued veno-venous hemodialysis procedure in the intensive care unit. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 6, p. 1138–1143, 2007.
- SEHAJPAL, J. et al. Role of progesterone in melatonin-mediated protection

against acute kidney injury. **The Journal of surgical research**, v. 191, n. 2, p. 441–447, out. 2014.

SENTURK, H. et al. The protective effect of *Hypericum origanifolium* in experimental renal ischemia/reperfusion injury in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 33, p. 2306–2312, 2013.

SETSUKINAI, K. et al. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **J Biol Chem**, v. 278, n. 5, p. 3170–3175, 2003.

SHELTON, L. M.; KEVIN PARK, B.; COPPLE, I. M. Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury. **Kidney International**, v. 84, n. 6, p. 1090–1095, 2013.

SI, Y.-N. et al. Dexmedetomidine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidney. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 18, n. 13, p. 1843–1851, jul. 2014.

SIMÕES, C. M. O. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. [s.l.] Editora da Universidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

SINGH, A. P. et al. Animal models of acute renal failure. **Pharmacological reports : PR**, v. 64, n. 1, p. 31–44, 2012.

SIVARAJAH, A. ET AL. Agonists of Peroxisome-Proliferator Activated ReceptorGamma Reduce Renal Ischemia/Reperfusion Injury. **American Journal of Nephrology**, v. 23, n. 4, p. 267–276, 2003.

STAR, R. A. Treatment of acute renal failure. **Kidney Int**, v. 54, n. 6, p. 1817–1831, 1998.

TONINI, C. L. et al. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 3325–3342, 2013.

TSUDA, H. et al. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 427, n. 2, p. 266–272, out. 2012.

TUCCI JR., S. et al. Calcium channel blocker and renal mitochondrial function in warm renal ischemia. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 31, n. 4, p. 384–389, 2005.

UCHINO, S. et al. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients*. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 7, p. 1913–1917, jul. 2006.

UEDA, M. et al. Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. **FEMS microbiology letters**, v. 219, n. 1, p. 93–98, fev. 2003.

VINHOLE, J.; VIZZOTTO, M. Synergisms in Alpha-glucosidase Inhibition and Antioxidant Activity of *Camellia sinensis* L. Kuntze and *Eugenia uniflora* L. Ethanolic Extracts. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 1, p. 101–107, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: [s.n.].

WAKABAYASHI, N. et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2040–2045, 2004.

WEINBERG, J. M. The cell biology of ischemic renal injury. **Kidney international**, v. 39, n. 3, p. 476–500, 1991.

WOOLFSON, R. G.; NEILD, G. H. The true clinical significance of renography in nephro-urology. **European journal of nuclear medicine**, v. 24, n. 5, p. 557–70, maio 1997.

WU, H.-H. et al. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, n. 1, p. 19, 2009.

YADAV, Y. C.; SRIVASTAVA, D. N. Nephroprotective and curative effects of *Ficus religiosa* latex extract against cisplatin-induced acute renal failure. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 11, p. 1480–1485, 22 nov. 2013.

YANG, Y. et al. Renoprotective approaches and strategies in acute kidney injury.

Pharmacology & Therapeutics, v. 163, p. 58–73, 2016.

ZAHRAN, M. H. et al. Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **Int Urol Nephrol**, v. 47, n. 11, p. 1907–1915, 2015a.

ZAHRAN, M. H. et al. Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **Int Urol Nephrol**, v. 47, n. 11, p. 1907–1915, 16 nov. 2015b.

ZHAO, L. et al. Protective Effect of the Total Flavonoids from Rosa laevigata Michx Fruit on Renal Ischemia-Reperfusion Injury through Suppression of Oxidative Stress and Inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 952, 2016.

ZOU, C. et al. Pioglitazone protects against renal ischemia-reperfusion injury by enhancing antioxidant capacity. **The Journal of surgical research**, v. 184, n. 2, p. 1092–1095, out. 2013.