

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LECTINA WSM_oL SOBRE ALTERAÇÕES NO
TRANSPORTE DE Na⁺ E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDA POR ISQUEMIA-
REPERFUSÃO EM CÉLULAS LLC-PK1**

MANOEL MARCELINO DE LIMA FILHO

ORIENTADOR: LEUCIO DUARTE VIEIRA FILHO

**RECIFE
2020**

MANOEL MARCELINO DE LIMA FILHO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LECTINA WSM_oL SOBRE ALTERAÇÕES NO
TRANSPORTE DE Na⁺ E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDA POR ISQUEMIA-
REPERFUSÃO EM CÉLULAS LLC-PK1**

Dissertação apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

Coorientadora: Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

**RECIFE
2020**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Lima Filho, Manoel Marcelino de

Avaliação dos efeitos da lectina WSMoL sobre alterações no transporte de Na⁺ e estresse oxidativo induzida por isquemia-reperfusão em células LLC-PK1 / Manoel Marcelino de Lima Filho. – 2020.

53 f. : il.

Orientador: Dr. Leucio Duarte Vieira Filho.

Coorientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Rins - Doenças. 2. Células. 3. Lectinas. I. Vieira Filho, Leucio Duarte (orientador). II. Paiva, Patrícia Maria (coorientadora). III. Título.

616.614

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-147

MANOEL MARCELINO DE LIMA FILHO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LECTINA WSMoL SOBRE ALTERAÇÕES NO TRANSPORTE DE Na⁺ E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CÉLULAS LLC-PK1

Dissertação apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora

Prof^o Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr. Thiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Karina Perrelli Randau
Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Belmira Lara Silveira Andrade da Costa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Juliane S. Farias
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Pernambuco

Data: 17/02/2020

Dedico este trabalho a minha mãe Zilma (in memoriam), meu marido Victor Hugo e a toda minha família, a todos os meus amigos, aos membros do Laboratório de Fisiologia Renal e todos da Universidade Federal de Pernambuco que contribuíram nesta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus e todas as energias boas do universo, pelo dom da vida e por todas as vitórias, força, perseverança, persistência, paciência e sabedoria durante esses 2 anos de mestrado.

À minha mãe Zilma Severina (*in memoriam*) que foi a inspiração e estimuladora na busca dos meus sonhos e educação, meu pai Manoel Marcelino e minhas irmãs Maryanna Cristine e Manuely Cristine e meu sobrinho João Lucas.

Ao meu marido, Victor Hugo, que é meu companheiro, apoiador, confidente e que me apoio em todas as etapas fáceis e difíceis, alegres e tristes neste mestrado, foi fundamental na minha trajetória.

À Universidade Federal de Pernambuco que mesmo tendo me exigido muitos esforços, abdições e dedicação, me proporcionou momentos únicos, conhecer pessoas inesquecíveis, conhecimentos, experiências e maturidade que sem dúvida levarei por toda minha vida pessoal e profissional.

À Leucio Duarte, por toda a dedicação, confiança, ensinamentos, orientação e ajuda durante todos esses anos de vida acadêmica, em especial nestes últimos 2 anos de mestrado que não foram fáceis, que mesmo nas minhas dificuldades e limitações, não hesitou em me ajudar. Sou eternamente grato pela orientação desde a iniciação científica e o admiro muito pela pessoa, amigo e orientador extraordinário que é.

À todos os integrantes do Laboratório de Laboratório de Fisiopatologia Renal que me ajudaram durante esses 2 anos nas lutas diárias, são uma família pra mim e sou extremamente grato a tudo que vi, ensinamentos, ajuda e apoio, tenho certeza que levarei sempre comigo a amizade e o carinho de cada um.

Aos membros da banca examinadora, meu orientador Prof^o Dr. Leucio Duarte, co-orientadora Prof^a Dra. Patrícia Paiva, Prof. Dr. Thiago Henrique, Prof^a Dra. Gardenia Carmen, Prof^a Dra. Karina Perrelli, Prof^a Belmira Lara e Dra. Juliane Farias pela disponibilidade de contribuir neste trabalho.

À todos que compõem o Departamento de Fisiologia e Farmacologia e Departamento de Bioquímica – CB – UFPE, funcionários, professores, colegas e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento e fortalecimento pessoal e profissional.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.”

Paulo Freire

RESUMO

A lesão renal aguda caracteriza-se pela perda funcional dos rins e está relacionada com eventos como infecção bacteriana, sepse ou processos de isquemia-reperfusão. A produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) desempenha um papel-central nos mecanismos fisiopatológicos da LRA, e por isso, o estresse oxidativo representa um importante-alvo terapêutico. O prejuízo da função renal na LRA ocorre, em parte, porque a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ é sensível às EROs. A WSMoL é uma lectina com ação antioxidante que é obtida do extrato aquoso de sementes *Moringa oleifera*. O objetivo deste trabalho foi investigar os potenciais efeitos terapêuticos da lectina WSMoL sobre as alterações funcionais induzidas pelo processo de hipóxia-reoxigenação em uma linhagem celular do túbulo proximal renal. As células LLC-PK1, que representam uma linhagem de células do túbulo proximal foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) sob condições ideais (37°C; 95% de ar, 5% de CO_2). A hipóxia foi induzida pela troca do meio de cultura suplementado com 10% de SBF por um meio de cultura sem SBF contendo rotenona (20 μM). A reoxigenação foi efetuada pela troca desse meio por meio 199 fresco contendo glicose e 10% de SBF. Na condição de hipóxia-reoxigenação foi observado diminuição da viabilidade celular, elevação da produção de EROs, aumento da atividade da NADPH oxidase e diminuição da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. O tratamento das células com a WSMoL preveniu todas essas alterações induzidas pelo processo de hipóxia-reoxigenação. Os mesmos efeitos foram observados na presença da inibição da NADPH oxidase induzida pelo tratamento celular com apocinina. Esses achados demonstram que a WSMoL apresenta efeitos citoprotetores sobre células LLC-PK1 submetidas a hipóxia-reoxigenação. Esses efeitos são mediados por ações antioxidantes que envolvem a inibição da NADPH oxidase.

Palavras-chave: Células LLC-PK1; Estresse oxidativo; Hipóxia-reoxigenação; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$; WSMoL

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is characterized by loss of renal function, frequently due to events such as bacterial infection, sepsis or ischemia-reperfusion processes. Reactive oxygen species (ROS) plays a central role in the pathophysiological mechanisms of AKI, and for this reason, oxidative stress represents an important therapeutic target. The impairment of renal function in AKI occurs, in part, because $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ is sensitive to ROS. WSMoL is a lectin with antioxidant action that is obtained from the aqueous extract of *Moringa oleifera* seeds. The aim of this work was to investigate the potential therapeutic effects of WSMoL on the changes induced by the hypoxia-reoxygenation injury using renal proximal tubule cell lineage. LLC-PK1 cells, which represent a cell line from the proximal tubule, were maintained in medium 199 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U / mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) under ideal conditions (37°C; 95% air, 5% CO_2). Hypoxia was induced by exchanging the culture medium supplemented with 10% FBS for a culture medium without FBS but containing rotenone (20 μM). Reoxygenation was performed by exchanging this medium with 199 fresh medium containing glucose and 10% FBS. In the condition of hypoxia-reoxygenation, it was observed decreased cell viability, increased ROS production, increased NADPH oxidase activity and decreased $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity. The treatment of cells with WSMoL prevented these alterations induced by the hypoxia-reoxygenation process. The same effects were observed in the presence of NADPH oxidase inhibition induced by apocynin. These findings demonstrate that WSMoL has cytoprotective effects on LLC-PK1 cells submitted to hypoxia-reoxygenation. These effects are mediated by antioxidant actions that involve the inhibition of NADPH oxidase.

Keywords: Hypoxia-reoxygenation injury; LLC-PK1 cells; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$; Oxidative stress; WSMoL

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. ESQUEMA DOS SEGMENTOS DO NÉFRON, ENVOLVIDOS NA FILTRAÇÃO GLOMERULAR, SECREÇÃO TUBULAR, REABSORÇÃO TUBULAR E EXCREÇÃO URINÁRIA	16
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DO APORTE TOTAL E CONSUMO DE OXIGÊNIO	18
FIGURA 3. CÉLULA DO TÚBULO CONTORCIDO PROXIMAL QUE MOSTRA A ENZIMA (NA ⁺ +K ⁺)-ATPASE NA MEMBRANA BASAL	21
FIGURA 4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ATIVAÇÃO DA ENZIMA NAPH OXIDASE	23
FIGURA 5. MECANISMO DE PRODUÇÃO DE EROS DURANTE O PROCESSO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO	25
FIGURA 6. VIAS ENZIMÁTICAS ENVOLVIDAS DA FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	25

LISTA DE ABREVIATURAS

ISN – *International Society of Nephrology*
DCR – Doença Renal Crônica
SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia
LRA – Lesão Renal Aguda
IR – Isquemia-Reperfusão
Ang II – Angiotensina II
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
EROs – Espécies reativas de oxigênio
WSMoL – *water-soluble M. oleifera lectin*
ATP – Adenosina trifosfato
NTA – Necrose tubular aguda
DNA – Ácido desoxirribonucleico
SOD – Superóxido dismutase
NOS – Óxido nítrico sintase
MTT – 3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
DMSO – Dimetilsulfóxido
AT₁R – Receptor de angiotensina do tipo I
DHE – Dihidroetídeo
SDS – Dodecil sulfato de sódio
BSA – Bovine Serum Albumin

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 TÚBULO PROXIMAL	15
2.2 ISQUEMIA-REPERFUSÃO RENAL	16
2.3 TRANSPORTE DE SÓDIO	19
2.3.1 Transporte de Sódio e Isquemia-Reperfusão	21
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO	22
2.4.1 NADPH oxidase	22
2.4.2 Estresse Oxidativo e Isquemia-Reperfusão	23
2.4.3 Estresse Oxidativo e Transporte de Sódio	25
2.5 <i>MORINGA OLEIFERA</i> E LECTINA WSMOL	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 ARTIGO 1: A LECTINA WSMoL, ISOLADA DE SEMENTES DE <i>Moringa oleifera</i>, PROTEGE CÉLULAS LLC-PK1 DA LESÃO INDUZIDA POR HIPÓXIA-REOXIGENAÇÃO ATRAVÉS DE MECANISMOS ANTIOXIDANTES	28
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Os rins desempenham diversas funções importantes no organismo, como balanço hidroeletrolítico, equilíbrio ácido-base, eliminação de fármacos e outros xenobióticos, filtração, reabsorção, homeostase, funções metabólicas e endócrinas. O balanço hidroeletrolítico e a excreção de resíduos metabólicos são dependentes da filtração glomerular e da reabsorção e secreção tubular, processos amplamente regulados que ocorrem na unidade funcional do rim, o néfron (COSTA et al., 2003).

A doença renal é responsável por diversos prejuízos socioeconômicos ao paciente e é considerada um importante problema de saúde pública mundial. Dados da *International Society of Nephrology* (ISN), mostram que dez por cento da população mundial é afetada pela Doença Renal Crônica (DRC) (BELLO et al., 2017). De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), estimasse que no Brasil cerca de dez milhões de pessoas apresentam alguma disfunção renal, mesmo com a escassez de dados sobre a prevalência de doença renal. A mortalidade resultante de doença renal é a 8ª causa de morte no mundo (MURPHY et al., 2012).

Diversas patologias podem levar a doença renal e esta é geralmente classificada em aguda ou crônica. A DRC está associada com complicações diabéticas, hipertensão, obesidade e de causas autoimunes (IMIG & RYAN, 2013). Os eventos iniciais de ambas são normalmente diferentes, se não for tratada adequadamente, a LRA pode levar ao A lesão renal aguda (LRA) caracteriza-se pela perda funcional dos rins e está relacionada com infecção bacteriana, sepse ou injúria por isquemia-reperfusão (IR). estabelecimento de DRC, e ambas podem evoluir para o estágio terminal da doença renal (LAFRANCE & MILLER, 2010).

Os segmentos tubulares do néfron apresentam mecanismos moleculares que permitem que as diversas substâncias filtradas possam ser reabsorvidas ou secretadas ao fluido para compor a urina. O túbulo proximal é o principal local de reabsorção de água e solutos (Na^+ , K^+ e outros), em condições de hidropenia ou de expansão do volume extracelular, tem a capacidade de reabsorver 60 a 70% da água filtrada, do sódio, do cloro e do potássio. Desta forma, independente das variações da filtração glomerular, a relação da reabsorção e filtração do íon permanece constante, mecanismo denominado de balanço glomerotubular (BARROS et al., 2007). Os principais transportadores são as ATPases transportadoras de Na^+ , $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$ sensível à ouabaína e $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$

sensível a furosemida, que sofrem importantes influências regulatórias hormonais, tendo a principal via de estimulação a angiotensina II (Ang II) (WANG et al., 2009).

Acontece nas fases iniciais da LRA um downregulation das bombas de transporte de Na^+ , como a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ (MORRELL et al., 2014). Os túbulos proximais são vulneráveis ao dano isquêmico na LRA, perturbando o citoesqueleto de actina que ancora a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ na membrana basolateral e lhe redistribuindo sobre a membrana luminal, prejudicando o transporte normal de íons sódio (KUNIN et al., 2012). As causas para alterações no transporte de Na^+ no paciente com LRA podem ser o intenso processo inflamatório e estresse oxidativo que leva a inibição das ATPases com inibição da cadeia transportadora de elétrons e posterior diminuição da oferta de ATP. (BERTORELLO e KARTZ, 1995). Contudo, levando-se em conta à complexidade da regulação dessas ATPases, o conhecimento sobre o impacto da LRA ainda é escasso.

A elevação do estresse oxidativo desempenha um papel-central nos mecanismos fisiopatológicos da LRA (QUOILIN et al., 2014). O estresse oxidativo é resultado da descompensação entre as defesas antioxidantes e a geração de espécies reativas de oxigênio (SHOJI & KOLETZKO, 2007). A NADPH oxidase é a principal fonte de produção de EROs em diversos tipos celulares não-fagocíticos, incluindo diversos tipos celulares do rim (KITADA et al., 2003). A Ang II é um eficiente estimulador da NADPH oxidase e pode induzir repercussões sobre o crescimento celular, apoptose, migração celular, produção de fatores inflamatórios e matriz extracelular (SACHSE e WOLF, 2007). A $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ é sensível ao estresse oxidativo e tem sua atividade inibida, alterando o transporte de sódio no túbulo proximal. Porém, ainda não está claro a ação do estresse oxidativo sobre Na^+ -ATPase (KURELLA et al., 1997). Além disso, a elevação do estresse oxidativo também tem sido associada a alterações da reabsorção de sódio no túbulo proximal (VIEIRA-FILHO et al., 2011).

Embora haja abordagens terapêuticas direcionada ao tratamento das repercussões da lesão renal, elas ainda são escassas e ineficientes (MAGRO et al., 2009). Dessa forma, é de grande importância a busca por novas intervenções terapêuticas que atuem pelo menos de forma adjuvante a terapia convencional, sobretudo que sejam voltadas para a proteção antioxidante, devido ao seu papel-chave na fisiopatologia da lesão renal. *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) é uma planta com inúmeras propriedades descritas e presente na dieta de grande parte da

população do sul da Índia. O extrato aquoso da *Moringa oleifera* apresenta importantes efeito antioxidante (VERMA et al., 2009; PANDA et al., 2012) e protetores do sistema cardiovascular (NANDAVE et al., 2009; ABROGOUA et al., 2012).

A WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) é uma lectina que é isolada a partir do extrato aquoso das sementes de moringa através de extração de proteínas em água destilada, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de quitina (COELHO et al., 2009). Nosso grupo de pesquisa, já demonstrou que a lectina apresenta um potencial efeito antioxidante *in vivo* (VERAS et al., 2017).

Muitos estudos utilizam modelos de cultura de células *in vitro* para o estudo da IR em células tubulares, mesmo não imitando todas as características que o meio *in vivo*, esses modelos fornecem dados confiáveis e autênticos, que permitem um maior aprofundamento nas vias de sinalização relacionadas a fisiopatologia e a ação de substâncias exógenas. Um dos modelos que pode ser utilizado é a linhagem de células epiteliais renais de túbulo proximal de porco, chamada células LLC-PK1 (KURIAN & PEMAIH, 2014).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TÚBULO PROXIMAL

Os rins são responsáveis por várias funções, dentre elas, o balanço hidroeletrolítico, equilíbrio ácido-base, eliminação de fármacos e outros xenobióticos, filtração, reabsorção, homeostase, funções metabólicas e endócrinas, contribuindo para o bom funcionamento do organismo. A unidade funcional do rim é o néfron e cada rim apresenta em média 800.000 a 1.000.000 de néfrons. Cada néfron é composto pela cápsula de Bowman, glomérulo, túbulo proximal, alça de Henle, túbulo coletor cortical, túbulo distal e ducto coletor, cada porção é modificada de acordo com as funções que desempenha, assim desempenham os processos de filtração glomerular, reabsorção tubular, secreção tubular e excreção, regulados de acordo com as necessidades do organismo, como mostra a Figura 1 (COSTA et al., 2003; HALL, 2011).

O túbulo proximal tem a capacidade de reabsorver aproximadamente 67% da água e sódio que foram filtrados (Figura 1). Essa sua importante capacidade de reabsorção é devido algumas de suas características celulares, como epitélio simples cúbico com borda em escova e um sistema complexo de prolongamentos celulares laterais entrelaçados e interdigitantes, grande número de mitocôndrias que fortalecem os transportes ativos dependentes de ATP e extensa borda em escova e canais intercelulares e basais que proporcionam transportes rápidos. Além disso, tem a capacidade de secreção de substâncias, como ácidos e bases orgânicas, fármacos e toxinas, que devem ser eliminados do organismo (GARTNER & HIATT, 2007; HALL, 2011; SOARES, 2015).

As células LLC-PK1 são um tipo celular correspondente a região do túbulo proximal de porcos e é largamente utilizada em estudos *in-vitro* de lesões, doenças e nefrotoxicidade que acometem em uma das principais porções do néfron, o túbulo proximal (TIONG et al., 2014). As células do túbulo proximal são os maiores alvos de lesões, uma vez que suas funções envolvem a concentração e reabsorção do filtrado glomerular expondo essas células a várias injurias (NAUGHTON, 2008).

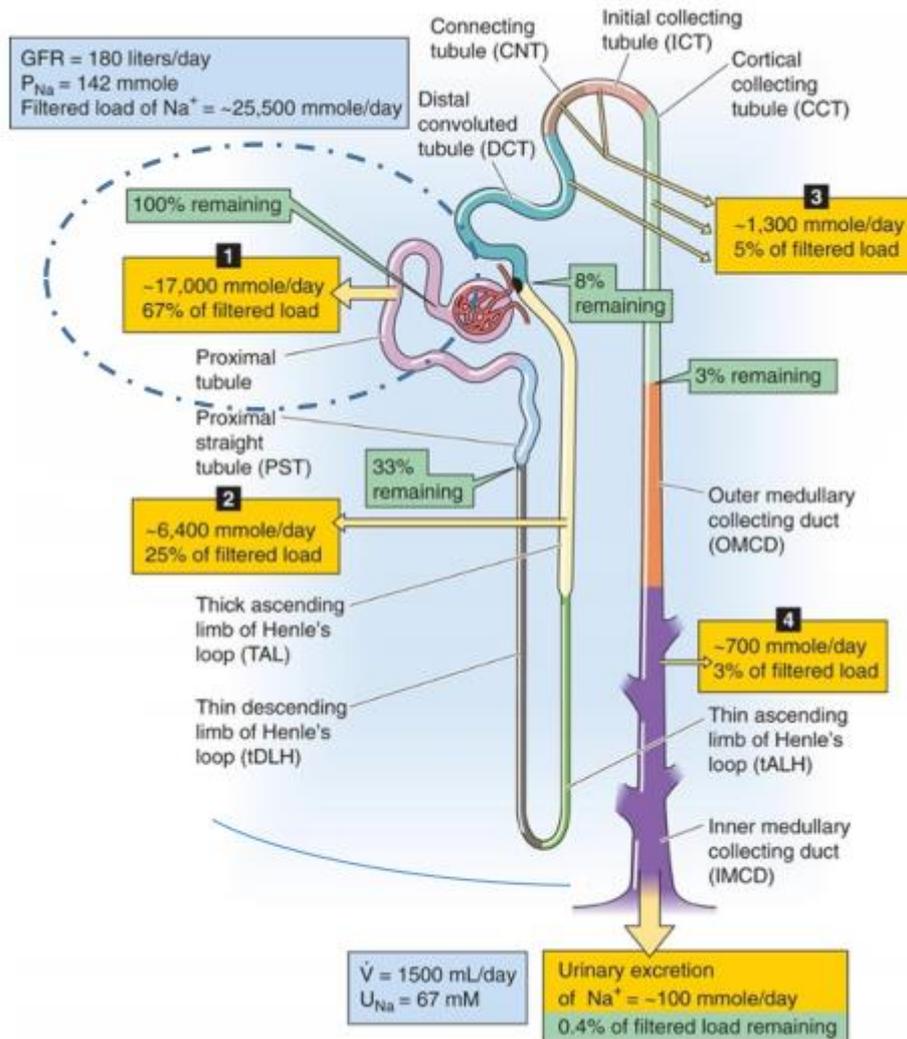


Figura 1. Esquema dos segmentos do néfron, envolvidos na filtração glomerular, secreção tubular, reabsorção tubular e excreção urinária. Fisiologia, BERNE & LEVY, 2009.

2.2 ISQUEMIA-REPERFUSÃO RENAL

A isquemia renal acontece quando há uma diminuição sistêmica ou local do fluxo sanguíneo (aporte de oxigênio e nutrientes) para o tecido renal, somado com uma defasagem na remoção de resíduos do metabolismo. A isquemia renal é uma das principais causas de LRA, sendo o rim muito susceptível a esta situação, devido ao seu grande aporte de oxigênio. Caso, o aporte de oxigênio e nutrientes não sejam reestabelecidos (reperfusão) em um curto intervalo de tempo, é possível o desenvolvimento de DRC. Mesmo a reperfusão acontecendo, o rim não fica livre de injúrias, pois o reestabelecimento do oxigênio ao tecido pode levar à aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando estresse oxidativo tecidual (LAMEIRE, 2004; LE DORZE et al., 2009, MALAGRINO, 2014).

O processo de isquemia-reperfusão (IR) não é totalmente compreendido, como a severidade e tempo necessário para levar à lesão renal em humanos, mas é necessário o retorno do fluxo sanguíneo mais rápido possível, assim terá mais chances da área afetada ser restaurada. Estudos já relatam que o processo de IR provoca uma diminuição da geração de ATP mitocondrial, perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares, diminuição da homeostase iônica celular (aumento de sódio e cálcio), ativação de hidrolases, inflamação e alteração da resposta vascular (DEVARAJAN, 2006).

No rim, a isquemia ou hipóxia, é determinada através do quanto de energia a célula necessita, sua capacidade glicolítica e a gravidade da hipóxia à qual a célula será submetida. As células que apresentam mais atividade glicolítica geralmente tendem a serem menos sensíveis à escassez de oxigênio do que as células que precisam predominantemente ou exclusivamente da respiração mitocondrial. Diante dessas características, e que cada segmento do néfron apresenta um tipo de oxigenação, as porções que ficam na parte externa da medula renal, formada pelos túbulos proximais e o ramo espesso da alça de Henle, são os segmentos mais propensos e críticos do rim, pois consomem mais de 80% do aporte de oxigênio renal, superando cérebro e miocárdio, sendo o rim um órgão que recebe mais oxigênio que o necessário (Figura 2) (LAMEIRE, 2004; REDFORS et al., 2010; MALAGRINO, 2014).

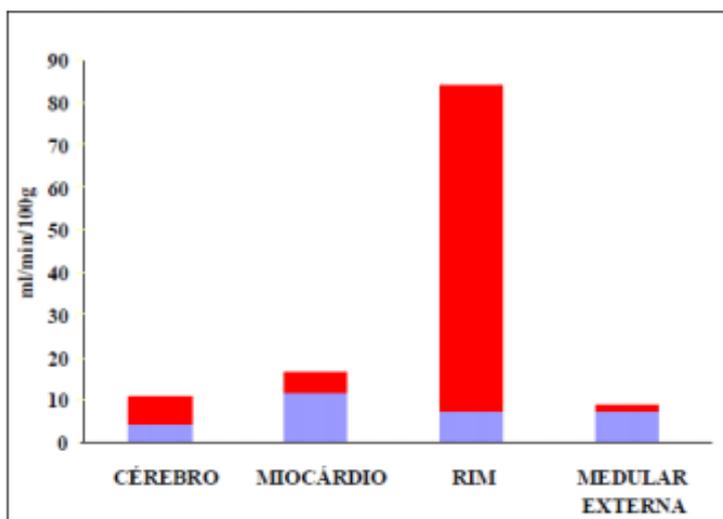


Figura 2. Representação do aporte total e consumo de oxigênio. A porção azul da barra representa o consumo de oxigênio, enquanto a altura total da mesma representa o aporte total de oxigênio ao tecido (MALAGRINO, 2014).

A isquemia também pode induzir a morte celular, principalmente as células tubulares, conhecido como necrose tubular aguda (NTA), porém não acontece apenas necrose nesta situação, as células tubulares também são acometidas pela apoptose. A morte celular por necrose e apoptose depende da intensidade e do evento que levou ao quadro de isquemia. A necrose acontece quando a lesão celular é mais grave, isquemias mais longas e maiores reduções de ATP, que leva ao aumento do influxo de cálcio e aumento de EROs e enzimas proteolíticas. Por outro lado, a apoptose ocorre quando um mínimo de energia para a condensação de cromatina, desintegração do DNA e de mitocôndria e redução do tamanho da célula acontece.

Uma forma de induzir isquemia em células (*in vitro*) é através da aplicação de substâncias que levam a inibição da cadeia transportadora de elétrons, formação de ATP, atividade mitocondrial e etc., como, por exemplo, a rotenona. A rotenona é um composto lipofílico extraído das raízes e caules de algumas espécies de plantas, *Derris* e *Lonchocarpus*, e é usado como um pesticida de amplo espectro. Estudos relatam que a rotenona consegue atravessar a barreira hematoencefálica e membranas celulares sem a necessidade de transportadores (EMMRICH et al., 2013; GIORDANO et al., 2012; WU et al., 2013; XIONG et al., 2012). Entrando na célula, a rotenona é capaz de bloquear o complexo I da cadeia transportadoras de elétrons prejudicando a formação de ATP, impede a função mitocondrial e leva a um estresse oxidativo intracelular, esse ambiente leva a um quadro de isquemia celular (ZHOU et al., 2014).

2.3 TRANSPORTE DE SÓDIO

O que se achava até a década de 30, que a membrana celular era impermeável ao Na^+ , foram demonstradas evidências contrárias. Hevesy, em 1938 demonstrou em suas pesquisas que a membrana celular é permeável aos íons sódio e potássio, através de um modelo utilizando isótopos radioativos de Na^+ e K^+ (SKOU e ESMANN, 1992) assim foi derrubada a ideia que a membrana celular era impermeável ao Na^+ . Já em 1941, Dean apresentou dados demonstrando que essa permeabilidade da membrana celular é devido a presença de uma bomba capaz de translocar Na^+ e K^+ (DEAN, 1941).

Em 1957, Skou relatou em suas pesquisas que a capacidade de transportar sódio e potássio acontecia contra seus gradientes de concentração devido a uma proteína de membrana com funções catalíticas (ATPase), utilizando como fonte de energia a adenosina trifosfato (ATP) para ser possível o transporte contra o gradiente de concentração, assim descobrindo a existência da enzima (Na⁺-K⁺)-ATPase, responsável pelo transporte dos íons Na⁺ e K⁺ e com função vital na manutenção da viabilidade celular (SKOU, 1957) atuando no transporte de Na⁺ do citosol para o interstício, dependente de K⁺ e da hidrólise do ATP, e sendo sensível à ouabaína (FERRAILLE & DOUCET, 2001).

Em 1965, Whittembury denominou uma nova bomba de transporte de Na⁺, “a segunda bomba de Na⁺”, uma bomba ATP-dependente encontrada em tecido renal que transportava Na⁺, mas diferentemente da (Na⁺-K⁺)-ATPase, é independente de potássio, insensível à ouabaína e sensível a furosemida, denominada bomba de Na⁺-ATPase (WITTEMBURY, 1965) que foi considerada a bomba responsável pelo ajuste fino do gradiente de Na⁺ lúmen/citosol (ROCAFULL et al., 2010).

Os segmentos tubulares do néfron apresentam mecanismos moleculares que possibilitam que várias substâncias filtradas consigam ser reabsorvidas ou secretadas ao fluido e fazer parte da composição da urina. O túbulo renal é formado por células epiteliais polarizadas, sendo compostas por uma porção apical que está diretamente em contato com o filtrado e uma porção basal que está em contato com o capilar peritubular. Todas as células tubulares renais tem a presença, na sua membrana basal, da enzima (Na⁺-K⁺)-ATPase, que é responsável pela polarização das células tubulares renais (BARROS et al., 2007).

O principal local de reabsorção de água e solutos (como Na⁺, K⁺ e outros) é o túbulo proximal, acontece de forma isotônica, através de forças de vetores que se opõem, o gradiente químico e a pressão oncótica no capilar peritubular. O túbulo proximal, em condições de hidropenia ou de expansão do volume extracelular, tem a capacidade de reabsorver 60 a 70% da água filtrada, sódio, cloro e potássio. Assim, independente das variações da filtração glomerular, a relação da reabsorção e filtração do íon permanece constante, sendo denominado este mecanismo de balanço glomerotubular (BARROS et al., 2007).

A reabsorção tubular proximal de sódio está relacionada com o volume plasmático e níveis pressóricos, em modelos animais e indivíduos hipertensos é observado um aumento da reabsorção, devido ao sódio ser o principal íon do líquido

extracelular (ROOS et al., 1984; BURNIER et al., 1994). As ATPases transportadoras de Na^+ , $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, tem importantes regulações hormonais, sendo a Ang II a principal via de estimulação (WANG et al., 2009). No túbulo proximal, o balanço de solutos está ligado ao transporte de água, tendo uma alta permeabilidade água devido a presença de aquoporina-1 nas membranas apical e basolateral do túbulo proximal, tendo difusão de água pela membrana lipídica ou pelas junções celulares. Desta forma, o percentual de água reabsorvido e dos outros solutos é praticamente igual (EATON e POOLER, 2004; MOUNT e YU, 2008).

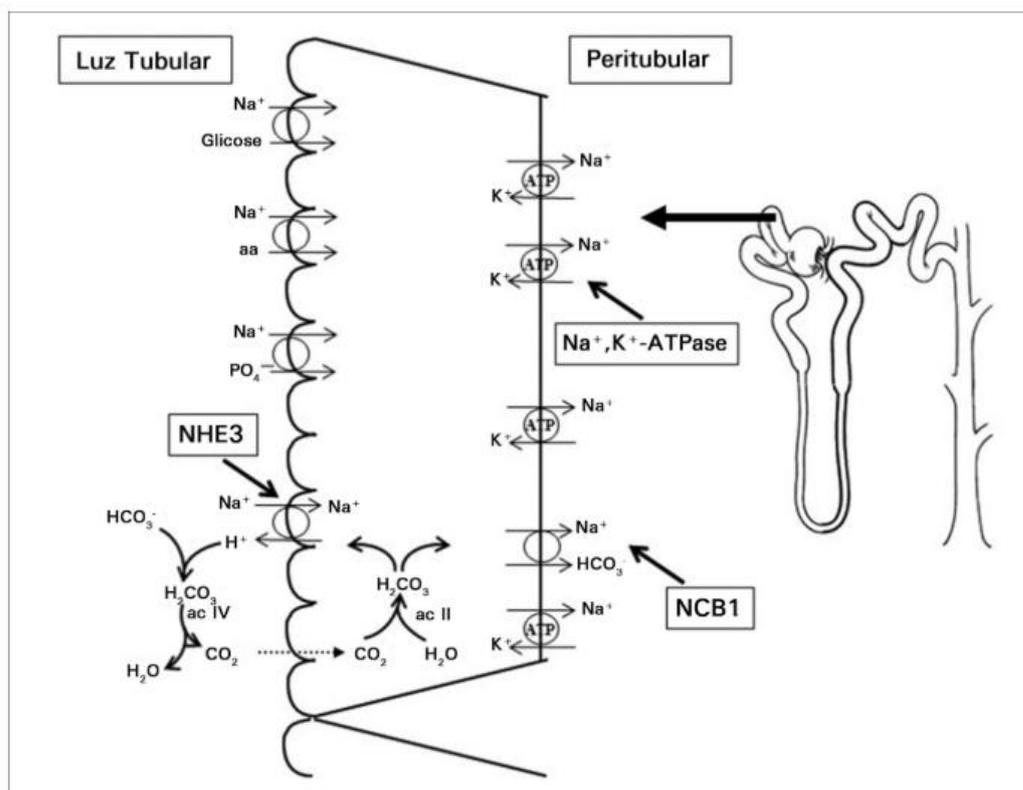


Figura 3. Célula do túbulo contorcido proximal que mostra a enzima $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ na membrana basal. (SOEIRO & HELOU, 2015).

2.3.1 Transporte de Sódio e Isquemia-Reperfusão

O processo inflamatório na lesão renal aguda induzida por isquemia pode prejudicar gravemente os mecanismos tubulares de transporte de sódio. Nas fases iniciais da lesão renal aguda, acontece downregulation das bombas de transporte de sódio, como a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (MORRELL et al., 2014). Os túbulos proximais são vulneráveis ao dano isquêmico na lesão renal aguda, perturbando o citoesqueleto de

actina que ancora a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase na membrana basolateral e lhe redistribuindo sobre a membrana luminal, prejudicando o transporte normal de íons sódio (KUNIN et al., 2012).

Os mecanismos exatos de como os mediadores e células inflamatórias durante a LRA induzida por isquemia-reperfusão prejudicam o transporte de sódio não é completamente esclarecido, necessitando de mais pesquisas para elucidar esses mecanismos. Porém, algumas explicações para alterações no transporte de sódio no paciente com LRA são o intenso processo inflamatório, estresse oxidativo que leva a inibição das ATPases devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inibição da cadeia transportadora de elétrons, diminuição do ATP etc. Esses mecanismos são pouco conhecidos pois a regulação das ATPases transportadoras de sódio é muito complexa e mediada por vários fatores (BERTORELLO e KARTZ, 1995).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é provocado por uma descompensação entre a geração de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio e as defesas antioxidantes do organismo. Vários mecanismos são capazes de produzir EROs como, através do metabolismo de ácidos graxos, ativação através do processo de isquemia-reperfusão, metabolismo das prostaglandinas, ativação de macrófagos e neutrófilos e etc., todos esses mecanismos são suficientes para podem provocar lesões celulares devido a reatividade das EROs com os lipídios, proteínas, polissacarídeos e DNA das células. O termo “espécies reativas” é usado como uma forma de designar radicais livres derivados do oxigênio (superóxido, hidroxil) e também, não radicais derivados do oxigênio (peróxido de hidrogênio) e derivados do nitrogênio (SHOJI & KOLETZKO, 2007). Estudos já correlacionam a elevação do estresse oxidativo com a ativação de vias inflamatórias, redução da filtração glomerular e elevação dos níveis pressóricos (VIEIRA-FILHO et al., 2014) e está relacionado com a patogênese de diversas doenças, como hipertensão (FRANCO et al., 2007) e diabetes (HORIE et al., 1997).

As EROs podem induzir peroxidação lipídica, levando a alterações na membrana celular e este processo é de grande importância na compreensão da lesão celular, este ambiente provoca danos irreversíveis quando os mecanismos antioxidantes estão defasados (KAROWICZ-BILINSKA et al., 2002). Esses

mecanismos antioxidantes são compostos por enzimas endógenas antioxidantes que tem a função de proteger o organismo dos ataques oxidantes e manter um equilíbrio redox, como a glutatona peroxidase, catalase e a superóxido dismutase (BIRI et al., 2007).

2.4.1 NADPH oxidase

A NADPH oxidase é a principal via de produção de EROs em muitas células não-fagocíticas, como diversos tipos celulares do rim, como as células mesangiais glomerulares (KITADA et al., 2003). A NADPH oxidase é um complexo protéico multimérico que apresenta componentes no citoplasma e na membrana, e sua atividade é regulada por diversos hormônios, citocinas e forças mecânicas, que estimulam uma maior produção de superóxido (CAI et al., 2003; RABÊLO et al., 2010). Em sítios de fibrose renal tem sido co-localizada aumento da expressão/atividade da NADPH oxidase (ZHAO et al., 2008). É composta por várias subunidades, porém estudos mostram que as subunidades p47^{phox}, p67^{phox} e gp91^{phox} são as principais subunidades que compõem a NADPH oxidase. Em células fagocíticas, o superóxido produzido pela NADPH oxidase tem importante função de defesa do hospedeiro contra patógenos (LI et al., 2009).

A Ang II é um eficiente estimulador da NADPH oxidase, e através dessa via pode induzir uma série de repercussões sobre o crescimento celular, apoptose, migração celular, produção de fatores inflamatórios e matriz extracelular (SACHSE e WOLF, 2007). Além disso, a ativação da NADPH oxidase pela Ang II pode ocorrer em células musculares lisas vasculares, sendo um fator de patogênese na maioria das desordens cardiovasculares, incluindo alterações da hemodinâmicas renal (DUSTING et al., 2004; LIMA-FILHO et al., 2014).

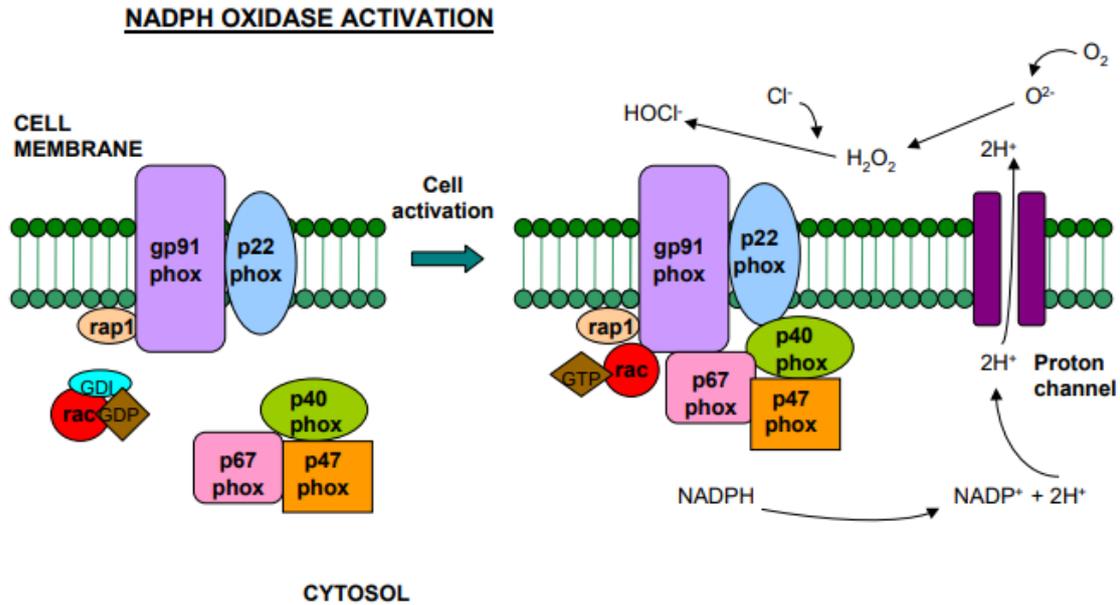


Figura 4. Esquema representativo da ativação da enzima NADPH oxidase. (ASSARI, 2006)

2.4.2 Estresse Oxidativo e Isquemia-Reperfusão

Estudos demonstram que a elevação do estresse oxidativo também desempenha papel central nos mecanismos fisiopatológicos da LRA (QUOILIN et al., 2014), contudo, as informações sobre a participação da NADPH oxidase, principal complexo enzimático de produção de EROs, nesse processo são conflituosas. Na literatura, podemos encontrar grupos de pesquisadores que endereçam parte dos danos induzidos pela LRA ao superóxido produzido pela NADPH oxidase (QUOILIN et al., 2014), enquanto outros trabalhos sugerem que ela tem um papel protetor (BABELOVA et al., 2012).

Vários estudos responsabilizam as EROs como mediadores dos danos sofridos pelos tecidos durante o período de I/R e cada tecido responde de uma forma diferente frente à esses agentes danosos, explicando assim a susceptibilidade maior de alguns tecidos a sofrerem lesões mediadas pelos radicais livres. Durante o período da isquemia, que apresenta déficit de oxigênio e nutrientes para o tecido, são produzidas substâncias precursoras das vias oxidativas. O reestabelecimento do fluxo sanguíneo durante a reperfusão, e conseqüentemente de oxigênio e nutrientes, a princípio parece ser apenas benéfico, porém fazem com quem precursores oxidativos produzidos durante a isquemia sejam ativados, levando a formação de EROs, principalmente ânions superóxidos. As principais vias oxidativas ativadas durante a reperfusão são a xantina oxidase, SOD, catalase (Figura 3) NOS e, uma

das principais, a NADPH oxidase (Figura 4), assim exacerbando o estresse oxidativo durante a reperfusão (MIRANDA et al., 2004).

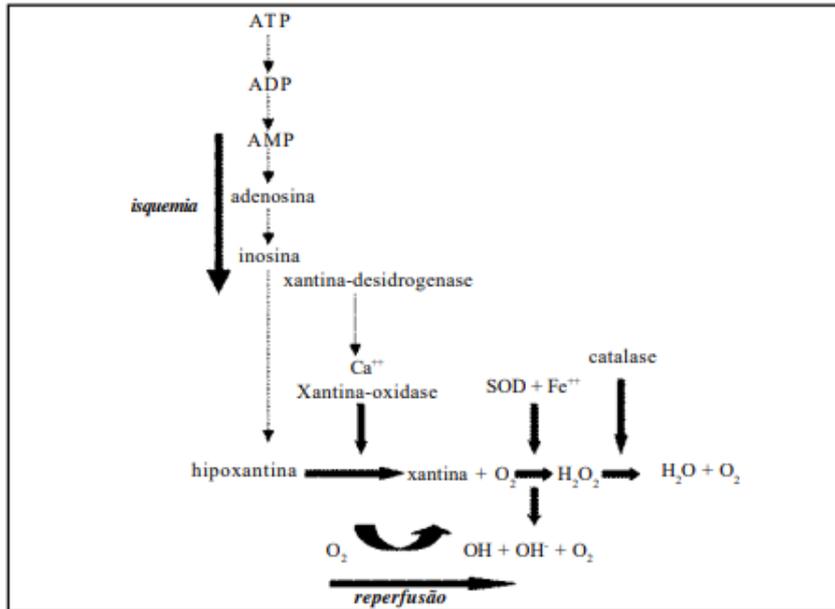


Figura 5. Mecanismo de produção de EROs durante o processo de isquemia/reperfusão. Durante o processo de isquemia/reperfusão vias oxidativas, como xantina oxidase, SOD e catalase, são ativadas levando ao estresse oxidativo (MIRANDA et al., 2004).

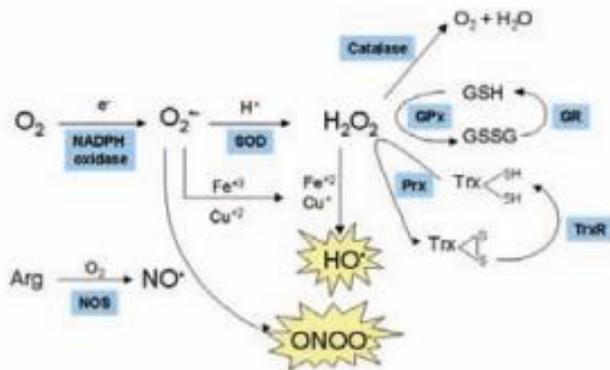


Figura 6. Vias enzimáticas envolvidas da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase, NOS – NO sintase, SOD – superóxido desmutase, GPx – glutathiona peroxidase, Prx – peroxirredoxinas, GR – glutathiona redutase, TrxR – tiorredoxina redutase, Trx – tiorredoxina, GSH – glutathiona redutase, GSSG – glutathiona oxidada (dímero) (BARBOSA et al., 2006).

2.4.3 Estresse Oxidativo e Transporte de Sódio

O estresse oxidativo tem participação fundamental no desenvolvimento da isquemia, a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase é sensível a ação das EROs e tem sua atividade inibida, alterando o transporte de sódio no túbulo proximal. Contudo, ainda não foram descritas quais alterações que ocorrem na atividade da Na^+ -ATPase insensível à ouabaína, nem está clara se há participação do estresse oxidativo mediado pela NADPH oxidase nas disfunções do transporte desse segmento tubular (KURELLA et al., 1997). Além disso, a elevação do estresse oxidativo também tem sido associada a alterações da reabsorção de sódio no túbulo proximal (VIEIRA-FILHO et al., 2011).

2.5 MORINGA OLEIFERA E LECTINA WSMOL

A *Moringa oleifera* Lam é uma planta que pertence à família *Moringaceae*. Planta de origem tropical, nativa do norte da Índia, bastante cultivada nas regiões dos trópicos e presente em muitos países da África, Ásia e América do Sul. As folhas da *Moringa oleifera* são utilizadas em alguns países como alimentos, apresentam importante quantidade de vitamina A (23.000 UI) e já foram relatadas seu uso no tratamento de doenças infecciosas da pele, mucosa e trato respiratório. Além das folhas, praticamente todas as partes da árvore de *Moringa oleifera* são utilizadas. Os estudos com os frutos mostraram ação hipolipidêmica, anti-aterosclerótica e redução do peso corpóreo em coelhos. Já as sementes são compostas por 40% de óleos que são utilizadas para cozinhar, na indústria de sabão e como base na produção de cosméticos, também são equivalentes ao azeite de oliva e apresentam grande quantidade de tocoferóis, estudos detectaram uma proteína nos extratos aquosos das sementes com atividade lectínica, a WSMoL, que demonstrou atividade antioxidante (ROLIM, 2007).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, representam uma classe heterogênea de proteínas e o termo lectina é derivado do latim *legere*, que significa reconhecer, escolher. Para ser uma lectina tem que possuir pelo menos um sítio não-catalítico com a capacidade de se ligar reversivelmente a mono e oligossacarídeos específicos. São de origem não-imune e sua característica em se ligar de forma reversível a carboidratos leva a aglutinação de células e/ou precipitam glicoconjugados, podendo se ligar aos oligossacarídeos das membranas celulares e participar de vários processos celulares. Essa ligação acontece através de pontes de

hidrogênio, interações de Van Der Waals e interações hidrofóbicas (LIS & SHARON, 1998).

As lectinas são amplamente encontradas na natureza, como em microorganismos, animais e plantas. São importantes na detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados (LIMA et al., 1997), na histoquímica de células e tecidos (BELTRÃO et al., 2003), na avaliação de alterações que ocorrem na superfície celular em processos fisiológicos e patológicos da diferenciação celular até o câncer (MAZUMDAR et al., 1993), no controle de pragas através dos efeitos inseticidas como a lectina BmoLL das folhas de *Bauhinia monandra* (MACEDO et al., 2006), na atividade contra bactérias Gram positiva apresentada pela lectina da esponja marinha *cliona varians* (MOURA et al., 2006) e muito mais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os potenciais efeitos terapêuticos da lectina WSMoL sobre as alterações funcionais induzidas pelo processo de hipóxia-reoxigenação *in vitro* em uma linhagem celular do túbulo proximal renal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em células LLC-PK1 submetidas a isquemia-reperfusão e tratamento com lectina WSMoL:

- i) Citotoxicidade celular;
- ii) Produção de espécies reativas do oxigênio;
- iii) Produção de ânions superóxido;
- iv) Atividade da NADPH oxidase;
- v) Atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase sensível a ouabaína;
- vi) Expressão do receptor AT₁ para angiotensina (AT₁R)

4 ARTIGO 1

A LECTINA WSM_oL, ISOLADA DE SEMENTES DE *Moringa oleífera*, PROTEGE CÉLULAS LLC-PK1 DA LESÃO INDUZIDA POR HIPÓXIA-REOXIGENAÇÃO ATRAVÉS DE MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Manoel M. Lima-Filho¹; Natália K. S. Lima¹; Jeoadã K. Silva¹; Fernanda P. B. Ribeiro¹; Thiago H. Napoleão²; Patrícia M.G. Paiva²; Leucio D. Vieira¹

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

RESUMO

A lesão renal aguda caracteriza-se pela perda funcional dos rins e está relacionada com eventos como infecção bacteriana, sepse ou processos de isquemia-reperfusão. A produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) desempenha um papel-central nos mecanismos fisiopatológicos da LRA, e por isso, o estresse oxidativo representa um importante-alvo terapêutico. O prejuízo da função renal na LRA ocorre, em parte, porque a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ é sensível às EROs. A WSMoL é uma lectina com ação antioxidante que é obtida do extrato aquoso de sementes *Moringa oleifera*. O objetivo deste trabalho foi investigar os potenciais efeitos terapêuticos da lectina WSMoL sobre as alterações funcionais induzidas pelo processo de hipóxia-reoxigenação em uma linhagem celular do túbulo proximal renal. As células LLC-PK1, que representam uma linhagem de células do túbulo proximal foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) sob condições ideais (37°C; 95% de ar, 5% de CO_2). A hipóxia foi induzida pela troca do meio de cultura suplementado com 10% de SBF por um meio de cultura sem SBF contendo rotenona (20 μM). A reoxigenação foi efetuada pela troca desse meio por meio 199 fresco contendo glicose e 10% de SBF. Na condição de hipóxia-reoxigenação foi observado diminuição da viabilidade celular, elevação da produção de EROs, aumento da atividade da NADPH oxidase e diminuição da atividade da $(\text{Na}^{++}\text{K}^+)\text{ATPase}$. O tratamento das células com a WSMoL preveniu todas essas alterações induzidas pelo processo de hipóxia-reoxigenação. Os mesmos efeitos foram observados na presença da inibição da NADPH oxidase induzida pelo tratamento celular com apocinina. Esses achados demonstram que a WSMoL apresenta efeitos citoprotetores sobre células LLC-PK1 submetidas a hipóxia-reoxigenação. Esses efeitos são mediados por ações antioxidantes que envolvem a inibição da NADPH oxidase.

Palavras-chave: células LLC-PK1; estresse oxidativo; hipóxia-reoxigenação; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$; WSMoL

INTRODUÇÃO

A doença renal é responsável por diversos prejuízos socioeconômicos ao paciente e é considerada um importante problema de saúde pública mundial. Dados da *International Society of Nephrology* (ISN), mostram que dez por cento da população mundial é afetada pela Doença Renal Crônica (DRC) (BELLO et al., 2017). A mortalidade resultante de doença renal é a 8ª causa de morte no mundo (MURPHY et al., 2012). Além da DRC, o rim pode sofrer impacto agudo, gerando o quadro conhecido como lesão renal aguda (LRA). Os eventos iniciais de ambas são normalmente diferentes, contudo, se a LRA não for tratada adequadamente, ela pode levar ao estabelecimento de DRC (LAFRANCE & MILLER, 2010). Além disso, o histórico de LRA é um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão (WU et al., 2014).

A elevação do estresse oxidativo desempenha um papel central nos mecanismos fisiopatológicos da LRA e da DRC (QUOILIN et al., 2014), sendo a NADPH oxidase considerada a principal fonte de produção de EROs em diversos tipos celulares do rim (KITADA et al., 2003). Por outro lado, o túbulo proximal é um dos principais segmentos afetados pelo estresse oxidativo renal (MALAGRINO, 2014). Sua função é altamente dependente da ATPase transportadora de Na⁺ e K⁺ sensível a ouabaína, a (Na⁺+K⁺)ATPase, que tem sua atividade afetada por EROs de diferentes maneiras (VIEIRA-FILHO et al., 2011). Por sua vez, o prejuízo na regulação do transporte de Na⁺ no túbulo proximal é um mecanismo subjacente a etiologia de alterações dos níveis pressóricos arteriais e de outras disfunções renais (LIMA-FILHO, 2014).

Embora existam abordagens terapêuticas direcionadas ao tratamento das repercussões da lesão renal, elas ainda são escassas e ineficientes (MAGRO et al., 2009). A *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) é uma planta com inúmeras propriedades descritas e presente na dieta de grande parte da população do sul da Índia. O extrato aquoso da *Moringa oleifera* apresenta importantes efeitos antioxidantes (VERMA et al., 2009; PANDA et al., 2012) e protetores do sistema cardiovascular (NANDAVE et al., 2009; ABROGOUA et al., 2012). Além disso, de sua semente pode ser isolada a WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*), uma lectina de baixa citotoxicidade que apresenta ações antioxidantes e imunomodulatórias (VERAS et al., 2017).

Com base nos efeitos antioxidantes da WSMoL, é plausível que essa lectina seja uma ferramenta terapêutica eficaz na prevenção das alterações do transporte tubular de Na⁺ observadas na LRA. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos protetores da WSMoL sobre o estresse oxidativo e alterações do transporte de Na⁺ dependente de ATP em uma linhagem de células do túbulo proximal submetidas a lesão por hipóxia-reoxigenação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

A rotenona, a apocinina, o dihidroetídio, a lucigenina, o NADPH, o meio 199, 3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e a ouabaína foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os anticorpos primários anti-AT1 (sc-57036) e anti-β-actina (sc-47778) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology. O anticorpo secundário anti-mouse conjugado a peroxidase (BA1050) foi comprado da Boster. Todos os demais reagentes utilizados foram da mais alta pureza disponível.

Extrato aquoso das sementes de *Moringa oleifera*

O extrato aquoso das sementes de *Moringa oleifera* foi obtido através da secura a 28° e pulverizadas com misturador (COELHO et al., 2009). O pó (10 g) foi homogeneizado com água destilada (100 ml) sob agitação constante por 16 horas a 25°C e, posteriormente, filtrado e centrifugado (3.000 g, 15 min, 4°C). O sobrenadante obtido correspondeu ao extrato aquoso das sementes de *Moringa oleifera* (EASMO).

Purificação de Lectina WSMoL

A Lectina WSMoL foi isolada de acordo com protocolo estabelecido por Coelho et al. (2009). O EASMO foi filtrado com sulfato de amônio a 60% de saturação por 4 horas a 28°C, e a fração precipitada foi coletada por centrifugação (3.000 g, 15 min, 4°C), ressuspensa e dialisada com água destilada (4 H) e NaCl 0,15 M (4 h). A fração dialisada (50 mg de proteínas) foi então carregada numa coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm) previamente equilibrada (0,3 mL/min) com NaCl 0,15 M. A Lectina WSMoL foi eluída com ácido acético 1,0 M e dialisada contra água destilada para remoção do eluente, proporcionado um rendimento de 3,4 mg por

coluna. A determinação quantitativa de proteínas foi efetuada de acordo com Lowry et al.(1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

Cultivo celular

As células LLC-PK1, que representam uma linhagem de células do túbulo proximal, foram obtidas da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA), e gentilmente cedidas pela Profa. Jennifer Lowe (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ). As células foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) sob condições ideais (37°C; 95% de ar, 5% de CO₂), com troca de meio por duas vezes na semana. A confluência foi acompanhada até a formação de uma monocamada celular correspondente a 70–80% da área de cultivo.

Indução do processo de hipóxia-reoxigenação *in vitro*

Células LLC-PK1 foram submetidas a um modelo *in vitro* de isquemia-reperfusão, ou seja de hipóxia-reoxigenação celular, na presença e ausência de tratamento com lectina WsMoL e apocinina (inibidor da NADPH oxidase). No momento do experimento, as células foram cultivadas em placas até atingir semi-confluência (2×10^4 células/cm²). A hipóxia foi induzida pela troca do meio de cultura suplementado com SBF por um meio de cultura sem SBF contendo Rotenona (1-20 µM) (KURIAN & PEMAIH, 2014). A rotenona é um inibidor da cadeia transportadora de elétrons que atua no complexo I mitocondrial. A reoxigenação foi efetuada pela troca desse meio por meio 199 fresco contendo glicose e 10% de SBF. A escolha da dose de Rotenona para induzir a hipóxia e o melhor tempo de isquemia-reperfusão foi determinada através da investigação da curva dose-resposta e da curva tempo-resposta da viabilidade celular.

Após a padronização do processo de hipóxia-reoxigenação, as células LLC-PK1 foram submetidas a essa situação na presença de suplementação do meio de cultivo com a lectina WSMoL (50–500 ng/mL) ou com apocinina (100–500 µM). Todos os ensaios foram realizados em 3-5 momentos distintos, com 3 repetições para cada grupo.

Após o período da reoxigenação, as células LLC-PK1 foram lavadas (Meio 199 sem SBF), descoladas (tripsina 0,25%) e homogeneizadas em solução contendo coquetel inibidor de protease para os experimentos de NADPH oxidase,

(Na⁺+K⁺)ATPase e Western Blotting. Nos demais procedimentos experimentais, as células foram cultivadas e tratadas diretamente na placa para o respectivo procedimento experimental.

Avaliação da citotoxicidade celular

A investigação da citotoxicidade celular foi realizada pelo teste de MTT. As células LLC-PK1 foram semeadas em placa de 96 poços e encubadas em condições ideais (37°C e 5% CO₂) durante 24 horas. Parte das células não passaram pela H/R, outra foi submetida ao processo de H/R sem tratamento e, por fim, outra parte foi submetida a H/R com 1 hora previa dos tratamentos com lectina WSMoL e apocinina que perduraram durante a hipóxia e a reoxigenação até o fim. O MTT foi adicionado com meio 3 horas antes do encerramento da H/R. Ao fim dos tratamentos e as 3 horas do MTT, o meio foi descartado e as células foram solubilizadas com DMSO. A técnica leva a uma redução do MTT, ou seja, as células com metabolismo ativo o reagente MTT (amarelo) em uma produção de coloração roxa, que é quantificada por espectrofotometria em 540 nm.

Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio

Uma das formas de avaliar o estresse oxidativo celular foi realizada através da mensuração de espécies reativas do oxigênio por dihidroetídeo (DHE). As células, após o protocolo experimental, foram incubadas em DHE (5µM) por 20 minutos, a 37°C e protegido da luz. A técnica de DHE baseia-se na adição do reagente DHE na amostra e este em contato com o O₂⁻ oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência. A fluorescência foi mensurada no comprimento de onda de 500/580 nm através de leitor multimodular.

Produção basal de superóxido e atividade da NADPH oxidase

A avaliação da atividade da NADPH oxidase foi realizada através da quantificação de superóxido produzido na presença de NADPH (100 µM). A produção de superóxido foi mensurada através da quimioluminescência derivada da lucigenina. Amostras do lisado celular (2,5 mg/mL) foram adicionadas a um meio de reação contendo lucigenina 10 µM e NADPH 100 µM, e a luminescência foi mensurada através de um luminômetro (Varioskan Flash, ThermoScientific). O

resultado foi expresso em unidade relativa de luz por minuto e corrigido pela quantidade de proteína na amostra. A liberação de superóxido também foi avaliada na ausência de NADPH, e representa a produção basal de superóxido.

Atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase do túbulo proximal

A atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase sensível à ouabaína foi avaliada sob condições basais. A atividade (Na⁺+K⁺)ATPase nas amostras (0,1 mg/mL) foi calculada a partir da diferença de fosfato inorgânico (Pi) liberado na ausência e presença de ouabaína 2 mM, em um meio de reação composto de 50 mM Bis-Tris-Propano, pH 7,4, 0,2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ e 120 mM NaCl. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de ATP (5 mM) e KCl (24 mM), e parada após 10 min pela adição de carvão ativado por HCl 0,1 M. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de ATP (5 mM) e parada após 10 min pela adição carvão ativado por HCl 0,1 M. O Pi liberado foi mensurado espectrofotometricamente (620 nm) numa alíquota de 0,2 mL do sobrenadante obtido após centrifugação da suspensão de carvão, a 1.500 g por 5 min.

SDS-PAGE e Western Blotting

A imunodeteção do AT₁R foi realizada através de Western Blotting. As proteínas (20 µg) do lisado celular foram separadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), e transferidas a uma membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio de sítios de ligação não-específica através da incubação em solução contendo 5% de albumina sérica bovina, as membranas de nitrocelulose foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário anti-AT₁R (diluição 1:500). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (1:10.000) conjugado a peroxidase. Os blots foram visualizados através de quimioluminescência captada com o auxílio de um sistema fotodocumentador de Western Blotting. O conteúdo proteico da proteína-alvo foi corrigido de acordo com a imunoquantificação da β-actina.

Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média (SEM). Os dados foram submetidos a avaliação da normalidade através do teste de Shappiro-

Wilk. Considerando a inexistência de grandes variações da distribuição Gaussiana, as médias dos grupos foram comparadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey. As análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas com $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rotenona diminui a viabilidade celular de maneira tempo-dependente e dose-dependente

A isquemia-reperfusão é uma situação clínica de alto risco para o desenvolvimento de LRA e risco de mortalidade (IMIG & RYAN, 2013). A utilização de ensaios celulares *in vitro* apresentam um importante papel para o estudo de mecanismos fisiopatológicos da isquemia-reperfusão, bem como, para investigação de abordagens de tratamento. A depleção de oxigênio e ATP são aspectos característicos da isquemia que são considerados no desenvolvimento de modelos celulares de isquemia. Apesar da rotenona ser classicamente utilizada em modelos celulares de desordens neurodegenerativas (OLIVEIRA et al., 2009), essa substância pode ser utilizada como um modelo química de hipóxia celular por inibir a produção de ATP através da inibição da respiração mitocondrial (KURIAN & PEMAIH, 2014).

Dessa forma, com a finalidade de padronizar o protocolo de hipóxia-reoxigenação para posterior investigação do efeito citoprotetor da WSMoL, as células LLC-PK1 foram incubadas em meio de reação contendo rotenona em doses crescentes (1–50 μM) pelo período de 3 horas, para indução da hipóxia. Em seguida, a reoxigenação foi simulada pela substituição do meio de cultivo por um livre de rotenona por mais 3 horas (Figura 1). Na sequência, as células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular.

Apesar das células expostas a concentração de rotenona de 1 μM terem apresentado viabilidade celular inferior a situação Controle, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 1). A partir da concentração de 5 μM , a foi observado que a simulação da hipóxia-reoxigenação diminuiu a viabilidade celular de maneira dose-dependente. A maior concentração de rotenona estudada, 20 μM ,

provocou uma diminuição de aproximadamente 30% na viabilidade celular em relação a situação Controle (ausência de rotenona). Além disso, a viabilidade celular na concentração de 20 μM foi estatisticamente inferior a concentração de 1 μM . Por isso, os demais experimentos foram realizados com essa concentração de rotenona.

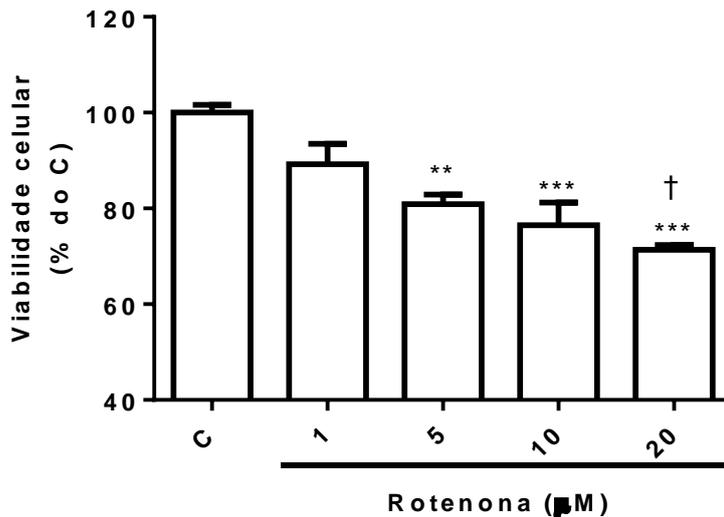


Figura 1. A hipóxia induzida pela rotenona induz uma diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente em células LLC-PK1. As células foram expostas às diferentes concentrações de rotenona pelo período de 1 hora, seguida da troca de meio de cultura suplementado com soro bovino fetal. A viabilidade celular foi determinada 3 horas depois da troca do meio pelo teste de MTT. Na situação Controle (C), as células não foram expostas a rotenona. A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. C; e † $P < 0,05$ vs. rotenona 1 μM .

O tempo de exposição das células a rotenona e o tempo de recuperação podem influenciar de maneira importante o processo de lesão celular (KURIAN & PEMAIH, 2014). Tempos maiores de hipóxia e reoxigenação podem permitir o desenvolvimento de respostas compensatórias que mascarem os efeitos protetores induzidos pela WSMoL. Dessa forma, testamos diferentes tempos de exposição a rotenona (hipóxia) e de recuperação (reoxigenação) (Figura 2). Observamos que todos os diferentes tempos de exposição a rotenona, 1, 3 e 6 horas, diminuíram a viabilidade celular independentemente do tempo de reoxigenação. Apesar disso, foi nas condições em que o período de reoxigenação foi de 3 horas em que houveram maiores prejuízos na viabilidade celular, com reduções de mais de 50% ($P < 0,001$) em relação a situação Controle. Em virtude da diminuição da viabilidade celular já

ser observada claramente na situação de 1 h de hipóxia e-3 h de reoxigenação, essa condição foi utilizada nos demais protocolos para investigação dos efeitos da WSMoL.

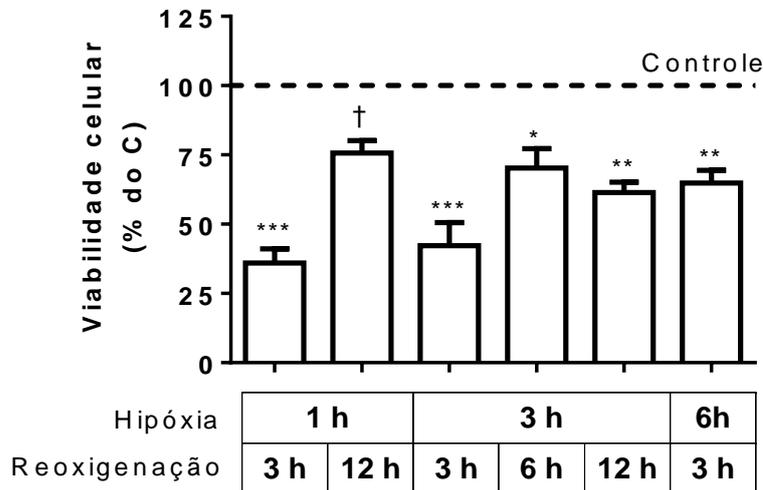


Figura 2. A diminuição da viabilidade celular induzida pela hipóxia é dependente do tempo de exposição a rotenona e do tempo de reoxigenação. A linha tracejada representa a viabilidade celular observada em situações Controle, onde as células não foram expostas a rotenona. Na abscissa é apresentado os tempos de exposição a rotenona (hipóxia) e os tempos de reoxigenação. A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. C; e † $P < 0,05$ vs. 1h hipóxia:3 h reoxigenação.

A WSMoL previne a diminuição da viabilidade celular induzida pela hipóxia-reoxigenação por exposição a rotenona

Para avaliar se a WSMoL apresenta efeitos citoprotetoras, as células LLC-PK1 foram submetidas ao procedimento de hipóxia-reoxigenação na presença de concentrações da lectina de 50, 100 e 500 ng/mL (Figura 3). Foi observado que a WSMoL inibiu a redução da viabilidade celular induzida pela exposição a rotenona de maneira dose-dependente. Ensaios bioquímicos *in vitro* indicam que a WSMoL apresenta uma proeminente ação antioxidante (SANTOS et al., 2005), e a produção de EROs representa um importante papel no mecanismo de citotoxicidade induzida pela hipóxia-reoxigenação (KURIAN & PEMAIH, 2014).

Em virtude das características apresentadas pela WSMoL e pelo modelo de hipóxia-reoxigenação, utilizamos a apocinina como controle-positivo da inibição da

citotoxicidade mediada pela exposição a rotenona. Observamos que o inibidor da NADPH oxidase na concentração de 500 μM também apresentou efeitos protetores sobre a citotoxicidade do modelo de hipóxia-reoxigenação. Apesar da apocinina em concentração menor (100 μM) não ter prevenido a redução de viabilidade celular induzida pela rotenona, o tratamento utilizando essa mesma concentração é capaz de prevenir a apoptose celular induzida pelo CoCl_2 em células de feocromocitoma PC12 (LIU et al., 2018).

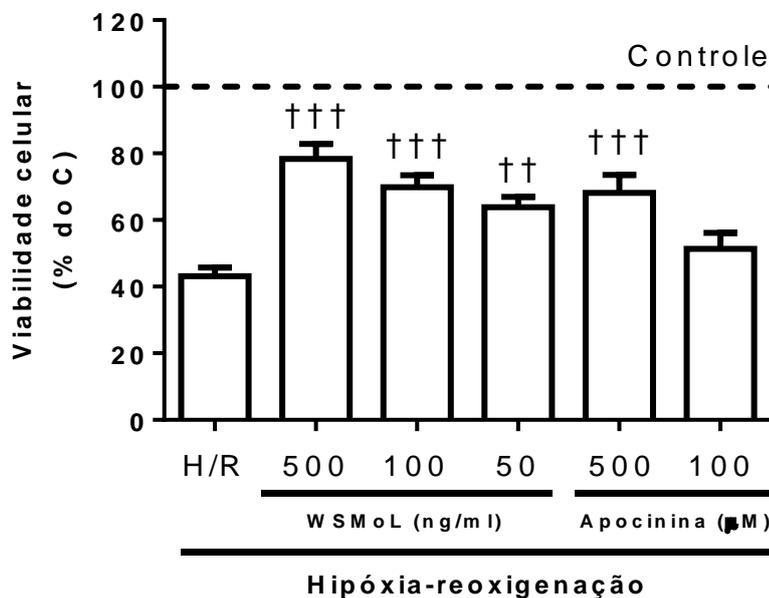


Figura 3. A WSMoL preveniu a citotoxicidade mediada pela exposição a rotenona de maneira concentração-dependente. A incubação das células LLC-PK1 com a WSMoL iniciou 1 hora antes da rotenona e perdurou até o fim do experimento. A viabilidade celular foi determinada através do teste de MTT e medida em porcentagem da condição Controle livre de rotenona. A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. †† $P < 0,01$ e ††† $P < 0,001$ vs. H/R. Todas as condições apresentaram menor viabilidade celular do que a situação Controle (linha tracejada).

A WSMoL previne a formação de EROs induzida pelo processo de hipóxia-reoxigenação

Para avaliar se o efeito citoprotetor apresentado pela WSMoL ocorre por mecanismos antioxidantes, foi avaliado se a lectina impede a formação de EROs induzida pela hipóxia-reoxigenação (Figura 4 e 5). Pode ser observado que o processo de hipóxia-reoxigenação induziu a elevação de cerca de 40% dos níveis de

EROs, mensurados a partir da fluorescência emitida a partir da oxidação do DHE (Figura 4). O mesmo efeito foi observado na produção de ânions superóxido (Figura 5) A incubação das células com a WSMoL preveniu a elevação dos níveis de EROs e de ânions superóxido, sendo esse mesmo efeito observado na presença de tratamento das células com apocinina. O aumento da produção de EROs podem induzir a morte celular por indução de danos no DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos (ALLEN & TRESINI, 2000).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* já demonstraram que os componentes da *Moringa oleifera* apresentam importante efeitos antioxidantes (SANTOS et al., 2005; VERMA et al., 2009; PANDA et al., 2012). Além disso, nosso grupo já demonstrou que tanto o extrato aquoso de sementes da *Moringa oleifera*, como também a WSMoL, previnem o estresse oxidativo tecidual induzida pela administração de LPS (dados não-publicados). Os presentes dados demonstram que a ação citoprotetora da WSMoL pode ser justificada por sua ação antioxidante, conforme discutido anteriormente.

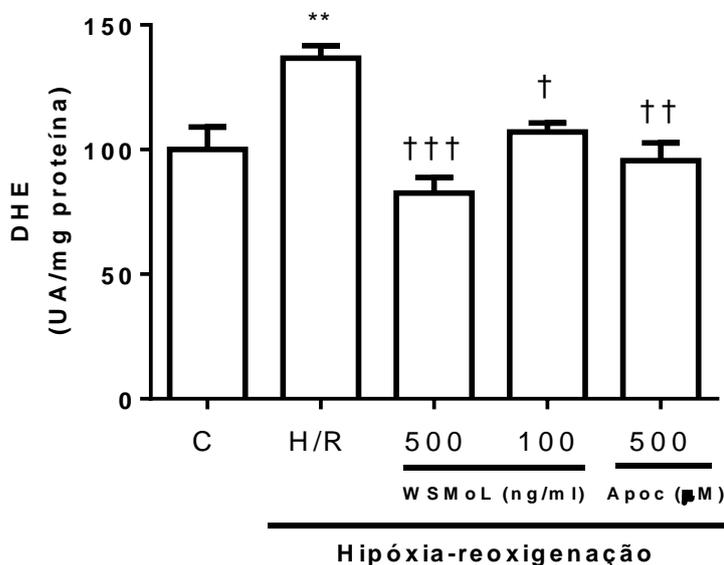


Figura 4. A WSMoL inibiu a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) induzida pela hipóxia-reoxigenação. A incubação das células LLC-PK1 com a WSMoL iniciou 1 hora antes da rotenona e perdurou até o fim do experimento. A produção de EROs foi determinada através da fluorescência emitida pela oxidação da sonda dihidroetídio (DHE). A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ** $P < 0,01$ vs. C; e † $P < 0,05$; †† $P < 0,01$ e ††† $P < 0,001$ vs. H/R.

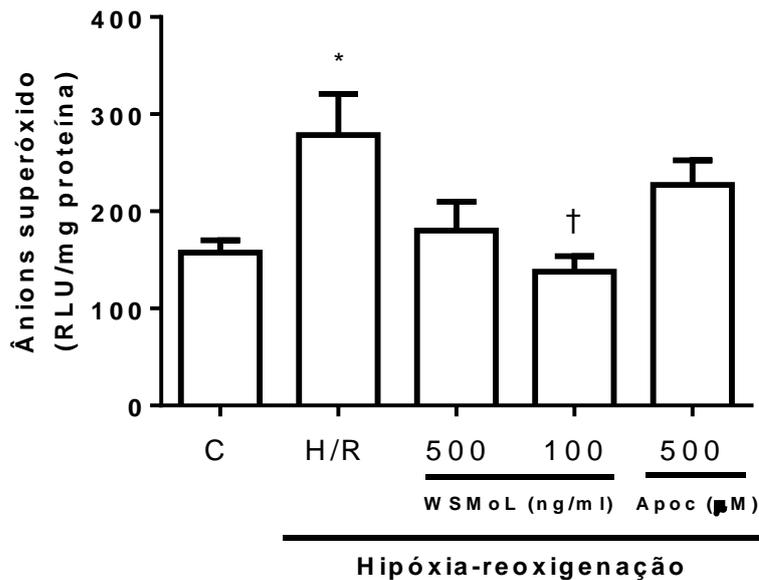


Figura 5. A WSMoL inibiu a produção basal de ânions superóxido na condição de hipóxia-reoxigenação. A incubação das células LLC-PK1 com a WSMoL iniciou 1 hora antes da rotenona e perdurou até o fim do experimento. A determinação dos níveis de ânions superóxido ocorreu pela mensuração da quimioluminescência derivada da oxidação da lucigenina. RLU: *relative light units*. A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. * $P < 0,001$ vs. C; † $P < 0,05$ vs. H/R.

A WSMoL previne a ativação da NADPH oxidase mediada pela rotenona

A incubação das células com 500 mg/mL de WSMoL e 500 microM de apocinina apresentaram impactos semelhantes na citotoxicidade mediada pela rotenona, bem como na diminuição dos níveis de EROs. É possível que ambos os tratamentos atuem por mecanismos semelhantes, ou seja, através da inibição da NADPH oxidase.

Identificamos que no modelo de hipóxia-reoxigenação mediada pela rotenona há estimulação da atividade da NADPH oxidase (Figura 6). Por outro lado, a WSMoL preveniu as alterações da NADPH oxidase induzidas pela hipóxia-reoxigenação. Esse efeito foi observado na mesma grandeza na presença de inibição direta da NADPH oxidase através da incubação das células com apocinina.

Os efeitos da WSMoL na atividade da NADPH oxidase indicam que o efeito antioxidante da lectina em células LLC-PK1, é mediado pela inibição dessa via pró-oxidativa. A NADPH oxidase é um importante mecanismo de base para a formação de EROs em células renais (KITADA et al., 2003), incluído as células do túbulo proximal. Em ratos, a administração de apocinina previne as alterações dos

marcadores de função renal induzidas pela isquemia-reperfusão renal (BASILE et al., 2012). Além disso, a NADPH oxidase participa de mecanismos de fibrose renal, alteração de reatividade vascular e da regulação de transportadores tubulares (SACHSE & WOLF, 2007).

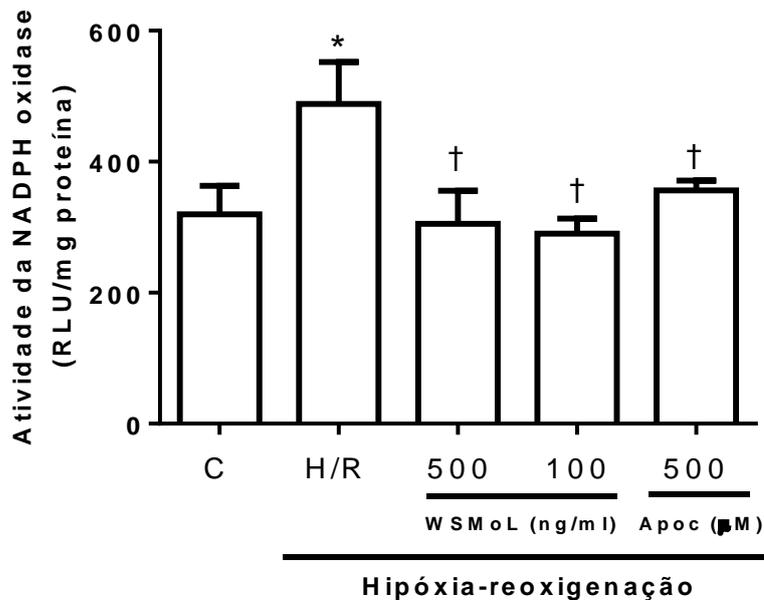


Figura 6. A WSMoL preveniu o aumento da atividade da NADPH oxidase induzido pela hipóxia-reoxigenação. A determinação da atividade da NADPH oxidase ocorreu pela mensuração da quimioluminescência derivada da oxidação da lucigenin na presença de NADPH. RLU: *relative light units*. A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. *P<0,05 vs. C; e †P<0,05 vs. H/R.

A inibição da atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase induzida pela rotenona é prevenida pelo tratamento com WSMoL

No túbulo proximal especificamente, a produção de ânions superóxido mediada pela NADPH oxidase tem sido relacionada com a inibição da atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase. Em células tubulares proximais in vitro, a inibição da bomba de Na⁺/K⁺ envolve a endocitose da proteína (LIU et al., 2015). Por outro lado, a (Na⁺+K⁺)ATPase tem sua atividade diretamente inibida pelo peroxinitrito e pelo H₂O₂ (KIM & ROBISON, 1996), bem como pode sofrer inibição pela glutatiónização dos resíduos de cisteína das subunidades α1 e β1 (YAN et al., 2016). Na hipóxia-reoxigenação, alterações na função mitocondrial que diminui drasticamente a produção de ATP, pode levar a célula a um processo de necrose que interfere

diretamente no funcionamento das bombas responsáveis pelo transporte de Na^+ e K^+ .

Observamos, no presente trabalho, que houve inibição da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ na condição de hipóxia-reoxigenação (Figura 7), de maneira paralela a diminuição da viabilidade celular (Figura 3) e aumento da produção de ROS (Figura 4 e 5) e da atividade da NADPH oxidase (Figura 6). Nas condições de hipóxia-reoxigenação em que houve tratamento das células com WSMoL ou apocinina, não foi observada alteração da atividade da bomba de Na^+/K^+ em relação a situação controle. Dessa forma, os efeitos protetores antioxidantes da WSMoL também foram transferidos para manutenção da função transportadora celular.

A prevenção da inibição da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ pela WSMoL pode ter um proeminente impacto *in vivo*. A diminuição da atividade transportadora do túbulo proximal faz parte da hipótese de origem tubular da lesão renal aguda (FATTAH & VALLON, 2018). De acordo com essa hipótese, a diminuição da reabsorção tubular proximal de fluido pode aumentar o fluxo de fluido tubular distal, o que ativaria a retroalimentação tubuloglomerular e promoveria uma vasoconstrição da arteríola aferente. Nesse quadro, haveria diminuição da intensidade do ritmo de filtração glomerular, que, conseqüentemente, poderia gerar retenção de compostos nitrogenados.

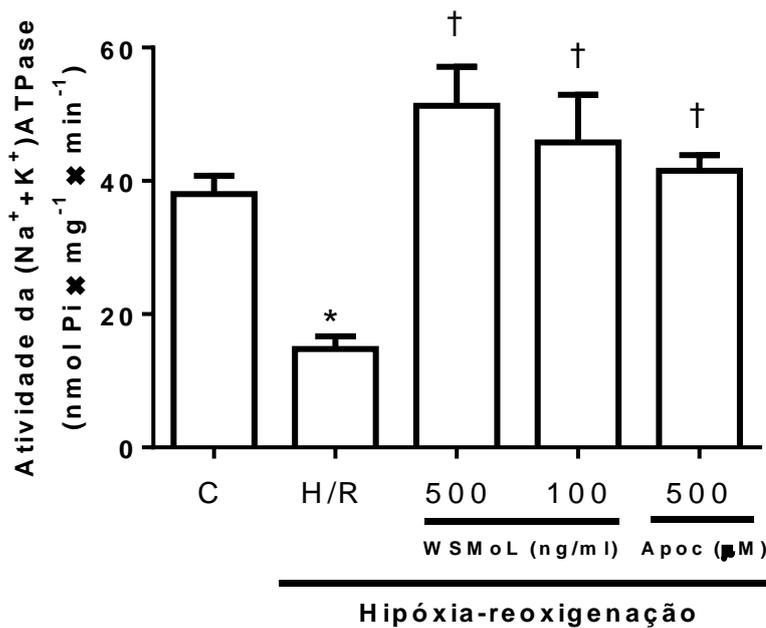


Figura 7. A inibição da atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase induzida pela hipóxia-reoxigenação é prevenida pelo tratamento das células com WSMoL. A determinação da atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase ocorreu pela mensuração da hidrólise de ATP sensível a ouabaína. A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. *P<0,05 vs. C; e †P<0,05 vs. H/R.

Além de avaliarmos a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase, também avaliamos o conteúdo proteico celular do receptor AT1 (AT1R) da angiotensina II (Figura 8). O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é o principal modulador da função tubular proximal, e dentre seus alvos, estão inclusas a NADPH oxidase e a (Na⁺+K⁺)ATPase (SACHSE e WOLF, 2007; WANG et al., 2009).

Observamos que a exposição das células a rotenona induziu um aumento no conteúdo proteico celular do AT1R. Apesar de ser bem conhecido que a angiotensina II é um importante estimulador da NADPH oxidase (SACHSE e WOLF, 2007), dados da literatura também indicam que o estresse oxidativo induz *upregulation* dos componentes do SRA, incluindo o AT1R (LUO et al., 2015). A WSMoL não preveniu a elevação do conteúdo celular de AT1R induzida pela hipóxia-reoxigenação, contudo os valores também não foram diferentes da situação Controle, o que indica um efeito protetor parcial. Por outro lado, os efeitos da apocinina nesse parâmetro foram mais proeminentes, uma vez que o conteúdo de AT1R mensurado na presença do inibidor da NADPH oxidase é estatisticamente menor do que na hipóxia-reoxigenação.

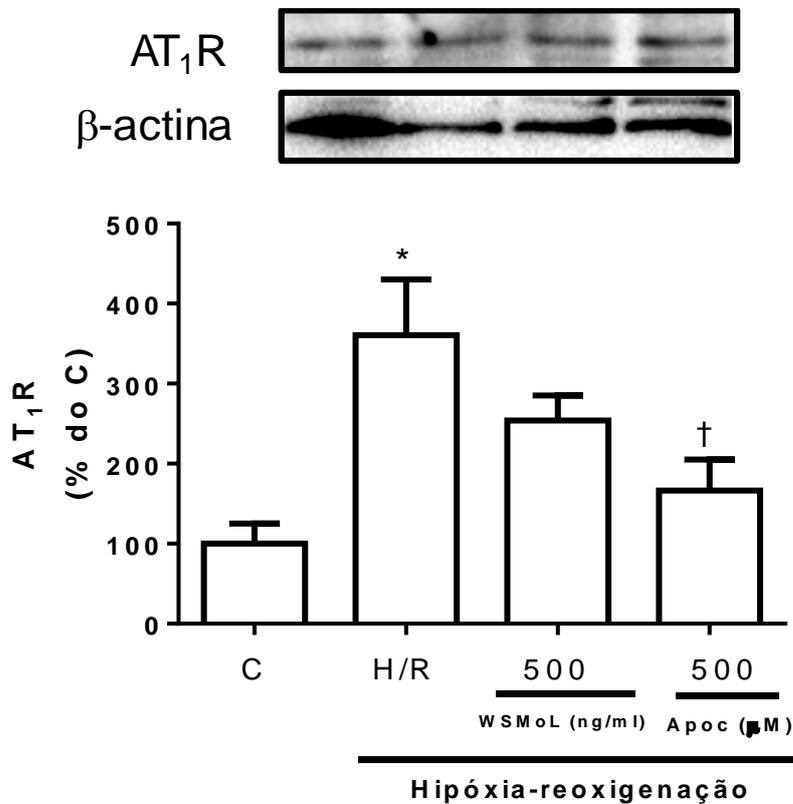


Figura 8. Expressão proteica do receptor do tipo 1 de angiotensina II (AT₁R). A determinação da atividade da expressão proteica do AT₁R ocorreu pelo teste de Western Blotting. A diferença entre as médias apresentadas em cada condição foi comparada utilizando a ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. *P<0,05 vs. C; e †P<0,05 vs. H/R.

CONCLUSÕES

Concluimos que a WSMoL apresenta efeitos citoprotetores em um modelo de lesão celular induzida por hipóxia-reoxigenação, mediados por mecanismos antioxidantes que envolvem a inibição da NADPH oxidase. Dessa forma, a lectina garante uma maior viabilidade celular, bem como, a manutenção de funções celulares fundamentais, como o transporte de Na⁺ dependente de ATP. Esses dados indicam que a WSMoL pode apresentar um impacto terapêutico in vivo em condições de LRA induzida por isquemia-reperfusão.

REFERÊNCIAS

- ABROGOUA, D. P. et al. Effect on blood pressure of a dietary supplement containing traditional medicinal plants of Côte d'Ivoire. *J of Ethnopharmacol.* 2012. 141 (3):840–847.
- ALBELDA, S. M. et al. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994. 8:504-512.
- ALLEN R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med.* 2000. 28:463-499.
- BARROS, E. et al. Fisiologia Renal. In: *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento.* 2007. Porto Alegre: Artmed, 3ª edição, 21-23.
- BASILE, D.P. et al. Persistent oxidative stress following renal ischemia-reperfusion injury increases ANG II hemodynamic and fibrotic activity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012. 302(11): F1494-F1502.
- BELLO, A. K. et al. Global Kidney Health Atlas: A report by the International Society of Nephrology on the current state of organization and structures for kidney care across the globe. *Int Soc of Nephrol.* 2017. Brussels, Belgium.
- COELHO, J. S. et al. Effect of Moringa oleifera lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere.* 2009. 77:934–938.
- FATTAH, H.; VALLON, V. Tubular Recovery after Acute Kidney Injury. *Nephron.* 2018. 140(2): 140-143.
- GONÇALVES, P. A. M. Ação citotóxica e antioxidante da beta lapachona em células endoteliais. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.
- IMIG, J. D.; RYAN, M. J. Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol.* 2013. 3(2):957-76.
- IMIG, J.D.; RYAN, M.J. Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol.* 2013. 2: 957-976.
- KIM, K.J.; ROBISON, T. Enhancement of airway epithelial Na⁺,K⁺-ATPase activity by NO₂ and protective role of nordihydroguaiaretic acid. *Am J Physiol.* 1996. 270: 266-272.
- KITADA, M. et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2003. 52:2603–2614.
- KURELLA, E. et al. Kinetic parameters of Na⁺,K⁺-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. *Annals of New York Academy of Sciences.* 1997. 834:661–665.

- KURIAN, G. A; PEMAIH, B. Standardization of *in vitro* Cell-based Model for Renal Ischemia and Reperfusion Injury. *Indian J Pharm Sci.* 2014. 76(4):348-353.
- LAFRANCE, J. P.; MILLER, D. R. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *J Am Soc Nephrol.* 2010. 21:345–352.
- LIMA-FILHO, M. M. et al. A inflamação materna induz hipertensão e hiperresponsividade renal à Angiotensina II em ratos adultos: Papel do estresse oxidativo e da NADPH oxidase. In: XXIX Reunião Anual da FeSBE, 2014, Caxambú, Minas Gerais. São Paulo: ICB, 29, 61-61, 2014.
- LIU, C. et al. Involvement of NOX in the regulation of renal tubular expression of Na/K-ATPase in acute unilateral ureteral obstruction rats. *Experimental Nephrology and Genetics.* 2015. 30: 66–76.
- LIU, J. et al. Apocynin Attenuates Cobalt Chloride-Induced Pheochromocytoma Cell Apoptosis by Inhibiting P38-MAPK/Caspase-3 Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018. 48(1): 208-214.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951. 193:265-275.
- LUO, H. et al. Oxidative stress causes imbalance of renal renin angiotensin system (RAS) components and hypertension in obese Zucker rats. *J Am Heart Assoc.* 2015. 4(2): pii: e001559.
- MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters.* 1998. 99:157-168.
- MIGUEL, M. P. et al. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do Pequi (*Caryocar brasiliense*). *Enciclop Biosf.* 2012. 8(15):1960-1976.
- MURPHY, S. L. et al. Deaths: Preliminary Data for 2010. *Natl Vital Stat Rep.* 2012. 60:1-69.
- NANDAVE, M. et al. Moringa oleifera leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence for an antioxidant, antiperoxidative, and cardioprotective intervention. *J Medic Food.* 2009. 12(1):47–55.
- OLIVEIRA, D. M. et al. Cytoprotective effect of Valeriana officinalis extract on an In vitro experimental model of parkinson disease. *Neurochem Res.* 2009. 34(2):215-220.
- PANDA, S. et al. Cardioprotective potential of N,α-L-rhamnopyranosylvincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of Moringaoleifera in isoproterenol induced cardiotoxic rats: in vivo and in vitro studies. *Bioorg & Medic Chem Letters.* 2013. 23(4):959–962.
- QUOILIN, C. et al. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochim et Biophys Acta.* 2014. 1837:1790–1800.

- SACHSE, A.; WOLF, G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J of The Am Soc of Nephrol*. 2007. 18:2439–2446.
- SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*. 2005. 39(6):975-980.
- SANTOS, A.F.S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*. 2005. 39(6): 975-980.
- SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007. 10:324–328.
- VERMA, A. R. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chem Toxic*. 2009. 47(9):2196–2201.
- VIEIRA, L. D. et al. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018. 1864(12):3577-3587.
- VIEIRA-FILHO, L. D. et al. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys*. 2011. 505:91–7.
- WANG, X. et al. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009. 18:412–420.
- WU, V.C. et al. Long-term risk of coronary events after AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014. 25(3): 595-605.
- YAN, Y. et al. Protein Carbonylation of an Amino Acid Residue of the Na/K-ATPase α 1 Subunit Determines Na/K-ATPase Signaling and Sodium Transport in Renal Proximal Tubular Cells. *Journal of the American Heart Association*. 2016. 5: 1-11.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo concluímos que a rotenona é um eficiente modelo de indução de hipóxia-reoxigenação e provocou diminuição da viabilidade celular nas células LLC-PK1, aumentou o estresse oxidativo e a expressão proteica do AT1R e inibiu a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ prejudicando o transporte de Na^+ . Nossos resultados sugerem que essas alterações são dependentes do estresse oxidativo via NADPH oxidase. O tratamento com a lectina WSMoL e os seus resultados semelhantes ao da apocinina (inibidor seletivo da NADPH oxidase) possibilitou conhecer melhor seus efeitos, onde nesse modelo apresentou efeito antioxidante, impactando positivamente na viabilidade celular e transporte de Na^+ através da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, provavelmente via inibição da NADPH oxidase. Porém, a lectina WSMoL não foi capaz de reverter as alterações no AT1R.

Os resultados também mostraram que a lectina WSMoL tem efeitos superiores ao da apocinina no DHE e produção basal de ânions superóxidos. Assim, são necessários outros estudos para compreender melhor o efeito antioxidante da lectina WSMoL e seu impacto em outras vias de produção de EROs neste modelo.

REFERÊNCIAS

- ABROGOUA, D. P. et al. Effect on blood pressure of a dietary supplement containing traditional medicinal plants of Côte d'Ivoire. **J of Ethnopharmacol**, v. 141, n. 3, p. 840–847, 2012.
- BABELOVA, A. et al. Role of Nox4 in murine models of kidney disease. **Free Radical Biol and Med**, v. 53, p. 842–853, 2012.
- BARROS, E. et al. **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- BELLO, A. K. et al. Global Kidney Health Atlas: A report by the International Society of Nephrology on the current state of organization and structures for kidney care across the globe. **Int Soc of Nephrol**, Brussels, Belgium, 2017.
- BELTRÃO, E. I. C. et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. **Europ J of Histochem**, v. 47, p. 139-142, 2003.
- BERTORELLO, A. M; KARTZ A. I. Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase pump activity: pathways between receptors and effectors. **NIPS**, v. 10, p. 253-259, 1995.
- BIRI, A. et al. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. **Gynecol Obstet Invest**, v. 64, p. 187–192, 2007.
- BURNIER, M. et al. Renal sodium handling in patients with untreated hypertension and white coat hypertension. **Hypertens**, v. 23, p. 496–502, 1994.
- CAI, H. et al. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, p. 471-8, 2003.
- COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934–938, 2009.
- COSTA, J. A. C. et al. **Insuficiência renal aguda**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 36, p. 307-324, 2003.
- DEAN, R. B. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. **Biologica Symposia**, v. 3, p. 331-348, 1941.
- DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 6, p. 1503-1520, 2006.
- DUSTING, G. J. et al. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 97-103, 2004.
- EATON, D.C.; POOLER, J. P. **Vander's Renal Physiology**. 6. ed. Boston: The McGraw-Hill, 2004.

EMMRICH, J. V. et al. Rotenone induces neuronal death by microglial phagocytosis of neurons. **FEBS J**, v. 280, 5030–5038, 2013.

FERRAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. **Physiol Rev**, v. 81, p. 345–418, 2001.

FRANCO, M. C. P. et al. Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: implications of oxidative stress. **Life Sci**, v. 80, p. 709–715, 2007.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GIORDANO, S. et al. Distinct effects of rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell death. **PLoS One**, v. 7, 9, p. 1–27, 2012.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HORIE, K. et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **J Clin Invest**, v. 100, p. 2995–3004, 1997.

IMIG, J. D.; RYAN, M. J. Immune and inflammatory role in renal disease. **Compr Physiol**, v. 3, n. 2, p. 957-76, 2013.

KAROWICZ-BILINSKA, A. et al. Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with intrauterine growth retardation. **Med Sci Monit**, v. 83, p. 211–216, 2002.

KITADA, M. et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 52, p. 2603–2614, 2003.

KUNIN, M. et al. Urinary organic anion transporter protein profiles in AKI. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, p. 1387-1395, 2012.

KURELLA, E. et al. Kinetic parameters of Na⁺,K⁺-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.834, p. 661–665, 1997.

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

LAFRANCE, J. P.; MILLER, D. R. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, p. 345–352, 2010.

LAMEIRE, N. H. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 1, p. 21-36, 2004.

LE DORZE, M. et al. The role of the microcirculation in acute kidney injury. **Curr Opin Crit Care**, v. 15, n. 6, p. 503-508, 2009.

LI, X. J. A fluorescently tagged C-terminal fragment of p47^{phox} detects NADPH oxidase dynamics during phagocytosis. **Molecul Biol of the Cell**, v. 20, p. 1520-1532, 2009.

LIMA-FILHO, M. M. et al. **A inflamação materna induz hipertensão e hiperresponsividade renal à Angiotensina II em ratos adultos: Papel do estresse oxidativo e da NADPH oxidase.** XXIX Reunião Anual da FeSBE, 2014, Caxambú, Minas Gerais. São Paulo: ICB, 29, 61-61, 2014.

LIMA, V. L. M. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potencial matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydr Polymers**, v. 33, p. 27-32, 1997.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem Revs**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p. 265-275, 1951.

MACEDO, M. L. R. et al. Insecticidal actino of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchide). **Comparat Biochem and Phisiol**, Part. A, p. 13-25, 2006.

MALAGRINO, P. A. **Alterações no perfil metabólico em resposta a isquemia/reperfusão renal em modelo suíno de lesão renal aguda.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MIRANDA, L. E. C. et al. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. **Acta Cirurg Bras**, v. 19, n. 1, p. 3-12, 2004.

MORRELL, E. D. et al. Epithelial transport during septic acute kidney injury. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, p. 1312-1319, 2014.

BRENNER, M.B. **The Kidney**. 8. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.

MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Clione varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. **Comparat Biochem and Phisiol**, Part A, doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.028 in press, 2006.

MURPHY, S. L. et al. Deaths: Preliminary Data for 2010. **Natl Vital Stat Rep**, v. 60, p. 1-69, 2012.

NANDAVE, M. et al. Moringa oleifera leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence for an antioxidant, antiperoxidative, and cardioprotective intervention. **J Medic Food**, v. 12, n. 1, p. 47–55, 2009.

NAUGHTON, C. A. Drug-induced nephrotoxicity. **American Family Physician**, v. 78, n. 6, p. 743-750, 2008.

PANDA, S. et al. Cardioprotective potential of N, α -L-rhamnopyranosylvinicosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of Moringaoleifera in isoproterenol induced cardiotoxic rats: in vivo and in vitro studies. **Bioorg & Medic Chem Letters**, v. 23, n. 4, p. 959–962, 2013.

QUOILIN, C. et al. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. **Biochim et Biophys Acta**, v. 1837, p. 1790–1800, 2014.

RABÊLO, L. A. et al. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 5, p. 684-693, 2010.

ROCAFULL, M. A. et al. Differential expression of P-type ATPases in intestinal epithelial cells: identification of putative new atp1a1splice-variant. **Biochem Biophys Res Commum**, v. 391, p. 152-158, 2010.

ROLIM, L. A. D. M. M. **Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação da genotoxicidade**. 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

ROOS, J. C. et al. Differential effect of salt loading on sodium and lithium clearance in Dahl salt-resistant and sensitive rats. **Hypertens**, v. 6, p. 420–424, 1984.

SACHSE, A.; WOLF, G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. **J of The Am Soc of Nephrol**, v. 18, p. 2439–2446, 2007.

SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, p. 324–328, 2007.

SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim and Biophys Acta**, v. 23, p. 394-401. 1957.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na⁺,K⁺-ATPase. **J of Bioenerg and Biomemb**, v. 24, p. 249-261, 1992.

SOARES, S. **Avaliação in vitro de potenciais biomarcadores de nefrotoxicidade através de expressão gênica diferencial utilizando cisplatina**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

TIONG, H. Y. et al. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. **Molec Pharmac**, v. 11, n. 7, p. 1933-1948, 2014.

VERAS, A. C. C. **Extresse oxidativo placentário e fetal: ação antioxidante da *Moringa oleifera* e de uma de suas lectinas, a WSMoL**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

VERMA, A. R. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringaoleifera* leaves. **Food and Chemic Toxic**, v. 47, n. 9, p.2196–2201, 2009.

VIEIRA-FILHO, L. D. et al. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. **Arch Biochem Biophys**, v. 505, p. 91–7, 2011.

VIEIRA-FILHO, L. D. et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **British J of Nutrit**, v. 1, p. 1-13, 2014.

WANG, X. et al. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 18, p. 412–420, 2009.

WHITTEMBURY, G. Sodium extrusion and potassium uptake in guinea pig cortex slices. **J Gen Physiol**, v. 48, p. 699–717, 1965.

WU, F. et al. p38 (MAPK)/p53-Mediated Bax induction contributes to neurons degeneration in rotenone-induced cellular and rat models of Parkinson's disease. **Neurochem. Int**, v.63, p. 133–140, 2013.

XIONG, N. et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. **Crit Rev Toxicol**, v. 42, p. 613-632, 2012.

ZHAO, L. et al. Reactive Oxygen Species Contribute to Lipopolysaccharide-Induced teratogenesis in mice. **Toxicolog Scienc**, v. 103, 149–157, 2008.

ZHOU, Q. et al. Rotenone induction of hydrogen peroxide inhibits mTOR-mediated S6K and 4E-BP1/eIF4E pathways, leading to neuronal apoptosis. **Toxicol Sci**, v. 143, n. 1, p. 81-96, 2015.