

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO TONHOLI DAL LIN

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENOPROTETORES DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO EM
MODELOS ANIMAL DE NEFRECTOMIA 5/6 E DOS EFEITOS DO INDOXIL
SULFATO EM CÉLULAS MESANGIAIS

CURITIBA
2015

FERNANDO TONHOLI DAL LIN

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENOPROTETORES DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO EM
MODELOS ANIMAL DE NEFRECTOMIA 5/6 E DOS EFEITOS DO INDOXIL
SULFATO EM CÉLULAS MESANGIAIS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA
2015

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Dal Lin, Fernando Tonholi.

Avaliação dos efeitos renoprotetores do ácido alfa-lipoico em modelo animal de nefrectomia 5/6 e dos efeitos do indoxil sulfato em células mesangiais. / Fernando Tonholi Dal Lin. – Curitiba, 2015.

64 f. : il.

Orientadora: Lia Sumie Nakao.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Nefrologia 2. Doença renal. 3. Insuficiência renal crônica. 4. Ácido lipoico. I. Título. II. Nakao, Lia Sumie. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20.ed.) 612.463



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENOPROTETORES DO ÁCIDO
ALFA-LIPOICO EM MODELO ANIMAL DE NEFRECTOMIA 5/6 E
DOS EFEITOS DO INDOXIL SULFATO EM CÉLULAS
MESANGIAIS"**

por

FERNANDO TONHOLI DAL LIN

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof^ª. Dr^ª. Lia Sumie Nakao (presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Joice Maria da Cunha
Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez

Curitiba, 26 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente minha orientadora a Profa Dra Lia Sumie Nakao, por todo por ser todo meu alicerce durante o início da longa caminhada até aqui, conhecimento transmitido, e principalmente pelas críticas, porque foram tais por críticas que tornaram possível aprender com os erros cometidos durante a jornada e, dando assim uma grande oportunidade de evoluir como pesquisador.

Ao professores Drs. Silvio Zanata e Professora Adriana Mercadante por todo suporte dado através do Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox.

A todos amigos e colegas, alunos e ex-alunos de laboratório Neurobiologia e Patologia Redox, mas especial Letícia, Sze, Carla, Fernanda, Luciana e Guilherme, Susan, Junior pela amizade e grande auxílio nas cirurgias e outros experimentos, assim como a Profa Dra Aline Hauser e Silvia Rodrigues pelos ensinamentos cirúrgicos fundamentais para que esse projeto fosse iniciado.

De modo especial, agradeço minha esposa Eliane, que me acalmava com toda a serenidade do mundo nos dias em que meus experimentos não davam certo, com palavras de conforto e incentivo.

Por sim, agradeço a todos as pessoas aqui não citadas, mas que participaram e contribuíram de algum modo no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia, estima-se que existam cerca de 10 milhões de brasileiros com alguma disfunção renal, sendo cerca de 100 mil dessas pessoas estão em tratamento dialítico. O estresse oxidativo participa de vários eventos da patogenia, progressão e complicações da doença renal crônica (DRC). Resultados de nosso grupo de pesquisa e de estudos em literatura publicada demonstraram que o ácido alfa-lipoico (α -LA) melhora diversos parâmetros que retardam a progressão da doença renal crônica em ratos nefrectomizados, indicando um possível efeito renoprotetor (YU *et al.*, 2012). O α -LA pode ser absorvido da dieta, ou de suplementação nutricional, e neste contexto, suas funções e efeitos antioxidantes na DRC ainda não estão completamente estabelecidos. Portanto, neste projeto, pretendeu-se entender os mecanismos antioxidantes da ação renoprotetora do α -LA no modelo experimental de nefrectomia de 5/6 em ratos. Ratos Wistar machos adultos jovens passaram pela nefrectomia de 5/6, sendo separados em 3 grupos: nefrectomizados sem tratamento, nefrectomizados com tratamento oral com α -LA e grupo *sham* laparatomizado. O tratamento oral de α -LA por 8 semanas na dosagem de 100mg/Kg/dia foi administrado do 7º ao 60º dia após a nefrectomia. A nefrectomia de 5/6 foi realizada independentemente em 3 lotes de animais, e os parâmetros analisados foram: níveis de ureia e creatinina plasmática, proteinúria, grau de glomerulosclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular e estresse oxidativo plasmático, utilizando $p > 0,05$. Os resultados mostraram que devido a variabilidade do modelo de nefrectomia de 5/6 na indução da DRC, não foi possível demonstrar o efeito renoprotetor do α -LA.

Como não foi possível obter resultados com o modelo de nefrectomia de 5/6, foi decidido estudar, em modelo *in vivo*, outros impactos ainda não descritos da DRC, mas que já estão caracterizados em outras doenças. Como por exemplo de estudos que já demonstraram a inibição da autofagia e alteração na dinâmica mitocondrial em doenças como falência renal por idade avançada (HARTLEBEN *et al.*, 2010), em falência cardíaca (KASSIOTIS *et al.*, 2009), nefropatia diabética (TOWNS *et al.*, 2005). Vários trabalhos já demonstraram que estresse oxidativo que ocorre no tecido renal e que o danifica (KIM & VAZIRI, 2010; VAZIRI *et al.*, 2002), sendo uma das maneiras que isso ocorre é a via mitocondrial, como pela mitofagia e fissão mitocondrial tanto na DRC e outras doenças como hiperglicemia, um dos principais fatores de risco para a DRC (BROWNLEE, 2001; YU *et al.*, 2006; QUIJANO *et al.*, 2007). Para realizar o estudo de tais processos utilizou-se um modelo *in vitro* de DRC com uma cultura de células mesangiais de rim humano (CM), em contato com soro urêmico de pacientes DRC (SU) e toxina urêmica isoladamente, o indoxil sulfato (IS). Foi demonstrado que tal célula participa da progressão da DRC (SCINDIA *et al.*, 2010) e que o IS acelera a progressão da DRC (NIWA, 2010). Nos resultados obtidos foi observado na um aumento da geração de espécies oxidantes intracelular, pela exposição ao IS e SU, e qualitativamente um aumento da fissão mitocondrial induzida por IS.

Palavras-chave: Nefrologia. Doença renal. Insuficiência renal crônica. Ácido lipoico.

ABSTRACT

According to the Brazilian Society of Nephrology, it is estimated that there are about 10 million Brazilians with some renal dysfunction, and about 100,000 of these people are on dialysis. Oxidative stress participates on various events of the pathogenesis, progression and complications of chronic kidney disease (CKD). Results of our research group and published literature have shown that alpha-lipoic acid (α -LA) improves various parameters that slow the progression of CKD in nephrectomized rats, indicating a possible renoprotective effect (YU et al., 2012). The α -LA may be absorbed from the diet or from dietary supplementation, in this context, its functions and antioxidant effects in CKD are not yet fully established. Therefore, in this project, we sought to understand the mechanisms of antioxidant action of α -LA in the experimental model of 5/6 nephrectomy in rats. Young adult male Wistar rats 5/6 were nephrectomized, and separated into three groups: untreated nephrectomized, nephrectomized oral treatment with α -LA and sham. Oral treatment with α -LA for 8 weeks at a dose of 100mg / kg / day was administered from the 7th to 60th day after nephrectomy. The 5/6 nephrectomy was performed independently in three groups of animals, and parameter were analyzed: urea and serum creatinine levels, proteinuria, glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and tubular atrophy indexes and plasma oxidative stress using $p > 0.05$. The results showed that the 5/6 nephrectomy model produces highly variable CKD induction. Therefore, we could not show the renoprotective effect of α -La.

Since it was not possible to obtain results with the 5/6 nephrectomy, it was decided to study in vivo model, other impacts which have not been previously described in CKD, but which are already featured in other diseases. For example inhibition of autophagy and change in mitochondrial dynamics in diseases such as kidney failure by age (HARTLEBEN et al., 2010) in heart failure (KASSIOTIS et al., 2009), diabetic nephropathy (TOWNS et al., 2005). Several studies have shown that oxidative stress that occurs in renal tissue and the damage (KIM & VAZIRI, 2010; VAZIRI et al, 2002), mitochondrial fission and mitophagy in CKD as well as and other diseases such as hyperglycemia, one of the main risk factors for CKD (BROWNLEE, 2001; YU et al., 2006; QUIJANO et al., 2007). For the study of such processes, we incubated mesangial cells with with serum from uremic patients (SU) or isolated uremic toxin indoxyl sulfate (IS). It has been demonstrated that such cells participates of CKD progression (SCINDIA et al, 2010) and that IS has a role in this process (NIWA, 2010). Our results showed an increase in the intracellular generation of oxidizing species by exposure of CM to IS and SU, and a qualitative increase in mitochondrial fission induced by IS.

Keywords: Nephrology. Kidney disease. Chronic renal failure. Lipoic acid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA BÁSICA RENAL.....	13
FIGURA 2 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ENDOTÉLIO DO CAPILAR GLOMERULAR COM DETALHE AUMENTADO DOS POROS OU FENESTRAS	14
FIGURA 3 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ENDOTÉLIO DO CAPILAR GLOMERULAR COM DETALHE AUMENTADO DOS POROS OU FENESTRAS	15
FIGURA 4 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO EPITÉLIO VISCERAL PODOCITÁRIO DO CAPILAR GLOMERULAR COM DETALHE AUMENTADO DOS PROLONGAMENTOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIO	15
FIGURA 5 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ÁCIDO DIHIDROLIPÓICO (DHLLA) E DO ÁCIDO α -LIPÓICO (α -LA).....	22
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESANGIAIS.....	26
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DAS RAMIFICAÇÕES DA ARTÉRIA RENAL OCLUÍDAS DO RIM ESQUERDO DO ANIMAL	30
FIGURA 8 – DINÂMICA MITOCONDRIAL DA CÉLULA MESANGIAL FRENTE A EXPOSIÇÃO AO INDOXIL SULFATO POR 24 HORAS	53
FIGURA 9 – CÉLULAS DA ÁREA CENTRAL FORAM AUMENTADAS EM DETALHE	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	17
--	----

LISTA DE SIGLAS

α -LA – Ácido Alfa-Lipoico

ARE – Do inglês, *antioxidant response elements*

BSA – Albumina Sérica Bovina

CM – Célula Mesangial

CMC – carboximetilcelulose

Eh_{Cyss/2Cys} – Potencial de redução do par cistina/cisteína

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio.

EUTox – Do inglês, *European Uremic Toxin*

DRC – Doença Renal Crônica

Gpx- Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione Reduzida

IS – Indoxil Sulfato

Keap-1 – Do inglês, *Kelch-like ECH-associated protein 1*

OAT- Transportador Orgânico de Ânions

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

Nrf2- Do inglês, *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor*

MDA - Malondialdeído

MEC – Matrix Extracelular

PBS - Solução Salina – Fosfato Tamponada

RPM – Rotações por minuto

SOD - Superóxido Dismutase

SFB – Soro Fetal Bovino

SN – Soro Normal

SU – Soro Urêmico

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1.	AVALIAÇÃO DO EFEITOS ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO EM MODELOS ANIMAL DE NEFRECTOMIA 5/6	12
1.1.1.	Fisiologia renal	12
1.1.2.	Doença Renal Crônica	16
1.1.3.	Doença Renal Crônica e Estresse Oxidativo	19
1.1.4.	Terapia antioxidante	21
1.2.	EFEITOS DO INDOXIL SULFATO EM CÉLULAS MESANGIAIS	23
1.2.1.	Toxinas Urêmicas	23
1.2.2.	Indoxil Sulfato	24
1.2.3.	Células Mesangiais	25
1.2.4.	Dinâmica mitocondrial	27
2.	METODOLOGIA	29
2.1.	ABORDAGEM EXPERIMENTAL	29
2.1.	INDUÇÃO DA UREMIA EXPERIMENTAL PELO MODELO DE ABLAÇÃO RENAL DE 5/6.	29
2.2.	TRATAMENTO COM ÁCIDO ALFA LIPOICO.	30
2.3.	COLETA DE AMOSTRAS.	31
2.4.	DETERMINAÇÃO DE URÉIA PLASMÁTICA	32
2.5.	DETERMINAÇÃO DE CREATININA PLASMÁTICA	32
2.6.	DETERMINAÇÃO DE PROTEINÚRIA	33
2.7.	PREPADO DE AMOSTRAS PARA SECÇÕES HISTOLÓGICAS E COLORAÇÃO PAS	34
2.8.	ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DE GLOMERUSOESCLEROSE, FIBROSE INTESTICIAL E ATROFIA TUBULAR.	35
2.9.	DETECÇÃO DE DO PAR REDOX PLASMÁTICO CISTINA/CISTEÍNA	35
2.10.	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR SONDA FLUORESCENTE DE DICLOROFLUORESCÉINA.	37
2.11.	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE FISSÃO/FUSÃO MITOCONDRIAL	38
2.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. PRIMEIRO LOTE DE ANIMAIS NEFRECTOMIZADOS.....	40
3.2. SEGUNDO LOTE DE ANIMAIS NEFRECTOMIZADOS	42
3.3. TERCEIRO LOTE DE ANIMAIS NEFRECTOMIZADOS.....	45
3.4. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR SONDA FLUORESCENTE DICLOROFLUORESCÉINA.....	48
3.5. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE FISSÃO/FUSÃO MITOCONDRIAL.....	52
4. CONCLUSÃO	55
5. REFERÊNCIAS	56
6. ANEXOS	64
6.1. ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1. AVALIAÇÃO DO EFEITOS ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO EM MODELOS ANIMAL DE NEFRECTOMIA 5/6

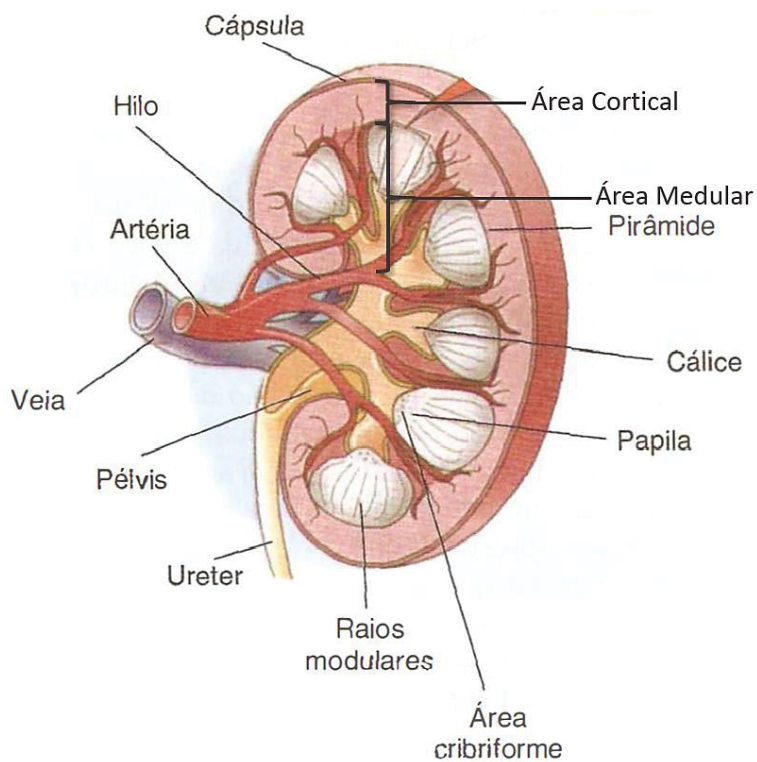
1.1.1. Fisiologia renal

Os rins são órgãos responsáveis pela importante função de contribuir para a manutenção do metabolismo corporal, por exemplo a regulação dos seguintes processos: homeostase eletrolítica, equilíbrio ácido básico, produção hormonal de eritropoietina e renina, e excreção de produtos da degradação metabólica e substâncias químicas exógenas ao organismo. Dentre alguns dos produtos de degradação metabólica estão a creatinina (da creatina muscular), a ureia (do metabolismo de aminoácidos), ácido úrico (dos ácidos nucleicos) e derivados da hemoglobina (bilirrubina). Nos humanos, os dois rins são localizados na região retroperitoneal, ligados funcionalmente ao organismo pelo hilo, local por onde passam os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e o ureter. Os rins recebem, em condições normais, cerca de 20% do débito cardíaco, que são filtrados devido à pressão hidrostática do sangue nos capilares glomerulares. Os 80% de plasma restante, que não foram filtrados, circulam ao longo dos capilares glomerulares dirigindo para a circulação capilar peritubular (GUYTON, 2012; AIRES, 2008).

A morfologia do rim exhibe uma borda convexa e outra côncava, onde encontra-se o hilo, região que contém os vasos sanguíneos, nervos e cálices renais. Uma cápsula de tecido conjuntivo denso, resistente e inextensível, frouxamente ligada ao parênquima renal, recobre todo o órgão. A Figura 1 ilustra a morfologia do rim. É dividido em duas zonas, a cortical e medular. Na zona cortical encontram-se as unidades filtrantes do rim, os néfrons. Na região medular, estão as pirâmides de Malpighi, em número de entre 10 a 18 estruturas, sendo que as bases e lados estão em contato com a zona cortical, e a região mais afastada da base formam saliências em direção aos cálices renais. Estas saliências com formato cônico no interior dos cálices são denominadas papilas renais. Essas apresentam em seu ápice a área cribiforme, que possui de 18 a 24 pequenos orifícios onde desembocam os ductos coletores. Cada papila é envolta por uma membrana, formando diversos cálices onde todos desembocam na pélvis renal, que em sua continuidade é formado o ureter.

Uma musculatura lisa está presente envolvendo os cálices, pélvis e ureteres, impulsionando a urina em ondas peristálticas em direção à bexiga (GUYTON, 2012; AIRES, 2008).

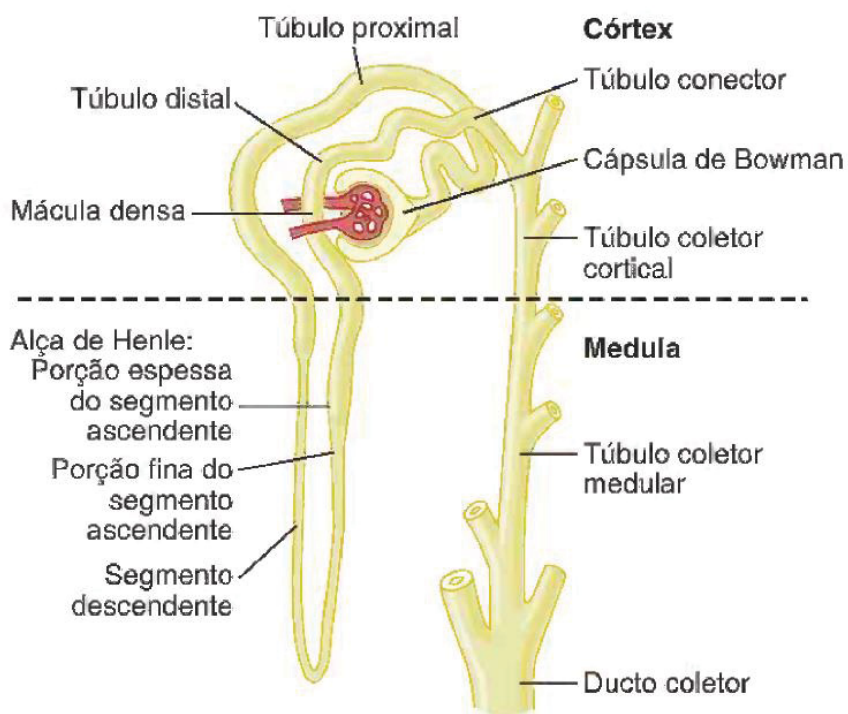
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA BÁSICA RENAL



FONTE: Adaptado de AIRES (2008).

A unidade filtrante do rim é denominada néfron, o qual desempenha as funções anteriormente citadas e que está presente em número entre 800.000 a 1 milhão por rim. O rim não possui capacidade regenerativa, portanto, com alguma lesão renal, ou envelhecimento, ocorre a diminuição gradual do número total de néfrons funcionais.

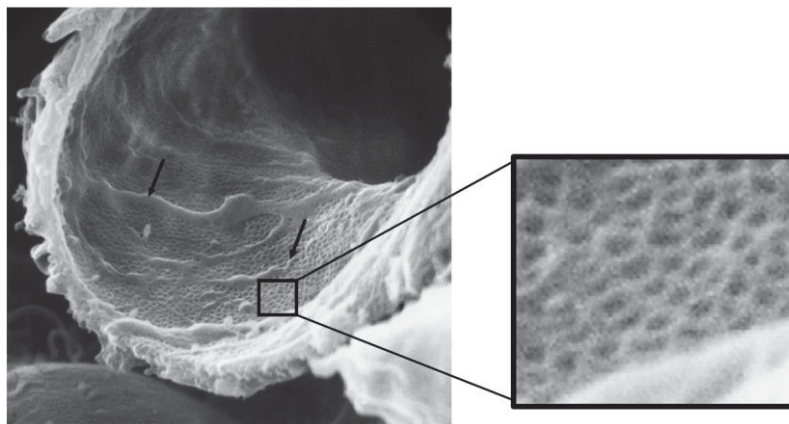
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA BÁSICA DO NÉFRON



FONTE: Adaptado de Guyton (2012).

Cada néfron (FIGURA 2) é formado por um corpúsculo renal, o glomérulo, e uma estrutura tubular. O glomérulo é formado por um emaranhado de capilares glomerulares fenestrados, com poros de diâmetro entre 70 a 100nm nos humanos (FIGURA 3), nesses capilares o sangue sofre o processo de filtração devido à alta pressão hidrostática (60 mmHg) e a carga negativa da presença de um revestimento de superfície ou glicocálice, rica em glicosaminoglicanos polianiónicos e glicoproteínas que são sintetizados pelas células endoteliais.

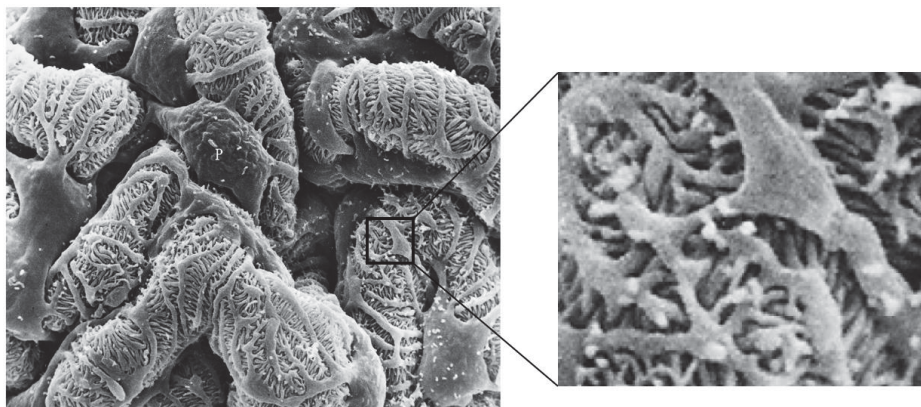
FIGURA 3 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ENDOTÉLIO DO CAPILAR GLOMERULAR COM DETALHE AUMENTADO DOS POROS OU FENESTRAS



FONTE: Adaptado de Brenner (2012).

Recobrendo estes capilares estão células epiteliais denominadas de podócitos. Essas células são formadas por um corpo celular de onde se originam vários prolongamentos chamados prolongamentos primários, que por sua vez se dividem formando os prolongamentos secundários. Essas células estão aderidas aos capilares glomerulares. Os prolongamentos secundários entrelaçam entre si de forma a deixar um pequeno espaço entre eles chamado fenda de filtração (FIGURA 4).

FIGURA 4 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO EPITÉLIO VISCERAL PODOCITÁRIO DO CAPILAR GLOMERULAR COM DETALHE AUMENTADO DOS PROLONGAMENTOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIO.



FONTE: Adaptado de Brenner (2012).

Recobrando a fenda de filtração existe uma fina membrana em forma de rede com permeabilidade seletiva, formada por diversas proteínas, denominada fenda do diafragma podocitário. A principal função dos podócitos é restringir a passagem de proteínas do sangue para a urina. Uma cápsula formada por dois folhetos, recobre a estrutura glomerular, sendo denominada cápsula de Bowman (BRENNER, 2012).

A estrutura tubular é formada por quatro porções em sequência que são o túbulo proximal, alça néfrica, túbulo distal, e ducto coletor. A função desta estrutura tubular é realizar a reabsorção de nutrientes e água do líquido filtrado. Substâncias pequenas que passam pela rede filtrante como água, sais, glicose, vitaminas, aminoácidos e hormônios são reabsorvidas por essa estrutura em uma taxa de 98%, sendo devolvida aos capilares renal seguido até a veia renal. (BRENNER, 2012; GUYTON, 2012).

1.1.2. Doença Renal Crônica

Com a queda progressiva da taxa de filtração glomerular (TFG), observada na doença renal crônica, conseqüente ocorre a perda das funções regulatórias, excretórias e endócrinas dos rins, comprometendo o funcionamento de todos os outros órgãos do organismo. Quando a queda da TFG atinge valores muito baixos, geralmente inferiores a $15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, estabelece-se o que tradicionalmente se chamava de “insuficiência renal crônica” (IRC), ou seja, o estágio mais avançado de perda funcional progressiva observado na DRC, denominação que tem sido adotada mais recentemente associada à especificação de que se trata do estágio 5 da DRC (TABELA 1).

TABELA 1 – DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Estágio	Descrição	TFG mL/min/1,73 m ²
1	Lesão renal com TFG normal ou aumentada	≥90
2	Lesão renal com TFG levemente diminuída	60-89
3A	Lesão renal com TFG moderadamente diminuída	45-59
3B		30-44
4	Lesão renal com TFG severamente diminuída	15-29
5	IRC estando ou não em TRS	<15

FONTE: Adaptado de K/DOQI 2002.

Os rins possuem uma grande capacidade adaptativa, em que mesmo depois da perda de cerca de 70% dos néfrons pode não ser possível diagnosticar a insuficiência renal clinicamente pelos testes de função renal de rotina como dosagem dos níveis de ureia e creatinina plasmáticas. Isso ocorre devido a uma modificação anatômica e funcional dos néfrons remanescentes, aumentando sua taxa de filtração e hipertrofiando-se de modo a manter o funcionamento normal do rim. Esse estado de constante hiperfiltração, quando mantido por longo período, leva a danos na estrutura e diminuição gradativa da TFG, até um determinado ponto em que o doente renal crônico começa a exibir anormalidades bioquímicas, chamada de síndrome urêmica ou uremia, que ocorre devido ao acúmulo de produtos finais do metabolismo, que seria normalmente eliminadas pela urina em situação fisiológica normal. Inicia-se então uma retenção generalizada de água e solutos, levando a edema, juntamente com acidose metabólica devido a grande quantidade de ácidos gerados pelo metabolismo, assim como o acúmulo de produtos derivados da metabolização de proteínas como ureia e ácido úrico, metabolização de creatina muscular como creatinina entre outras substâncias que precisam ser excretadas do sangue (BRENNER, 2012; GUYTON, 2012).

Os principais fatores de risco para DRC são a hipertensão e a hiperglicemia (LEVEY & CORESH, 2012). Além destes, insuficiência cardíaca, tabagismo, inflamação e estresse oxidativo contribuem para o aparecimento e progressão da doença renal (KARAMOUZIS *et al.* 2008). O estresse oxidativo, particularmente, participa de vários eventos da patogenia, progressão e complicações da DRC. De fato, vários trabalhos já mostraram que o estresse oxidativo, determinado geralmente

por produtos de oxidação de biomoléculas, ocorre em pacientes de DRC, especialmente naqueles em diálise e em estágios finais (CLERMONT *et al.* 2000; LOCATELLI *et al.* 2003; AVELES *et al.*, 2010).

A utilização de modelos experimentais tem permitido a caracterização dos eventos patofisiológicos de várias doenças. O modelo experimental do rim remanescente, obtido através da nefrectomia parcial de 5/6, é o modelo mais empregado como maneira de mimetizar a DRC, pois é capaz de reproduzir o quadro patológico da DRC (LIU *et al.*, 2003). Para execução de tal modelo, faz-se uma redução da massa renal em cerca de 80%, sendo que um dos rins sofre infarto parcial interrompendo a circulação de parte dos ramos da artéria renal, de modo que aproximadamente 1/3 do órgão continue a receber circulação arterial. O outro rim então é retirado, restando aproximadamente 1/6 de massa renal funcional.

Em tentativa de manter a homeostase do organismo e compensar a perda de néfrons, o rim adapta-se aumentando a taxa de filtração glomerular nos néfrons remanescentes, levando a hiperfiltração desses glomérulos. A hiperfiltração glomerular, neste caso, consiste em manter constante uma alta pressão hidrostática dos capilares glomerulares, a qual a longo prazo levam a dano na estrutura glomerular, a qual culmina na diminuição da taxa de filtração glomerular, causando manifestações de uremia e proteinúria (HOSTETTER *et al.*, 2001). A proteinúria é a perda anormal de proteínas plasmáticas pela urina, sendo a manifestação precoce mais frequente nas lesões renais. A proteinúria é caracterizada pelo acúmulo de proteínas no fluido tubular, sendo que uma das principais causas é a constante elevação da pressão arterial, que contribui para o aumento da pressão hidrostática dos capilares glomerulares. Outra consequência da proteinúria é de promover a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas que são responsáveis por causar deposição de células leucocitárias localizadas no interstício renal, o que culmina em um processo inflamatório no tecido. (CHEVALIER, THORNHILL *et al.*, 2010). Como consequência de tal processo inflamatório, a população celular da porção tubular dos néfrons começa a ser substituída por fibroblastos intersticiais, que iniciam a produção de colágeno e matriz extracelular (MEC), obstruindo o lúmen tubular, contribuindo para o desenvolvimento da glomeruloesclerose (GE), que é a fibrose dos glomérulos. De maneira objetiva, a GE é um processo pelo qual o tecido glomerular também começa a ser substituído por MEC. Na DRC, essa deposição da MEC nos glomérulos leva a perda da filtração glomerular, juntamente seguida de

atrofia dos túbulos renais e formação de fibrose no interstício do tecido (ZATZ, 2000).

1.1.3. Doença Renal Crônica e Estresse Oxidativo

Como consequência à diminuição da TFG e uremia, sabe-se que ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) no tecido renal, associado à hipertensão e hiperfiltração glomerular, à inflamação tecidual VAZIRI, 2004; FUJIHARA *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2009; OZEKI *et al.*, 2009; VLASSARA *et al.*, 2009) e até mesmo à exposição a toxinas urêmicas que começam a acumular (GERLASCO & Raymond, 2006; OWADA *et al.*, 2009). Esses estudos indicam que o estresse oxidativo está associado a danos no tecido renal, participando assim da patogenia desta doença.

Sistemicamente, ocorre também um progressivo estresse oxidativo sistêmico (HIMMELFARB *et al.*, 2009; AVELES *et al.*, 2010). Nosso grupo adaptou um método analítico para quantificar o estresse oxidativo plasmático (JONES, 2006) na DRC, determinando o potencial de redução do par cisteína/cistina plasmático ($E_{hC_{ySS}/2C_{yS}}$) (RODRIGUES *et al.*, 2012). Nesse trabalho demonstramos que quanto menor o potencial de redução, ou seja, quanto mais oxidado o par cisteína/cistina apresentava-se, maior era o acúmulo de creatinina plasmática em pacientes com DRC.

Outros resultados também mostraram que os níveis aumentados de biomarcadores de estresse oxidativo no plasma de pacientes de DRC caíram após o transplante renal (AVELES *et al.*, 2010), e que artérias de pacientes de DRC apresentam-se mais nitradas que doadores renais, devido a nitrotirosina, que é um marcador de dano celular e estresse oxidativo (GUILGEN *et al.*, 2010). Estes dados corroboram a hipótese de que a perda da função renal tem contribuição importante na indução do estresse oxidativo sistêmico (HIMMELFARB *et al.* 2002).

A uremia, caracterizada pelo acúmulo de toxinas urêmicas e metabólitos no sangue, e por complicações em vários sistemas devido a estas toxinas (BRUNET *et al.*, 2011; RHEE & THADHANI, 2011), parece amplificar o estresse oxidativo na DRC. Já foi demonstrado que toxinas urêmicas ativam leucócitos (GALLI *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 2007), células endoteliais (SERRADELL *et al.*, 2002; DOU *et al.* 2007; Di MARCO *et al.*, 2008), células musculares lisas (MUTELIEFU *et al.*, 2009; NIWA, 2010), células tubulares (SHIMIZU *et al.*, 2012) e células mesangiais (GERLASCO &

RAYMOND, 2006). Em conjunto, estes achados associam fortemente estresse oxidativo com as complicações da uremia, como a aceleração da doença cardiovascular (LEVEY & EKNOYAN 1999).

Apesar de vários dados dispersos na literatura, muitos aspectos da patogênese, da progressão e das consequências da DRC não estão claros, particularmente quando associados a processos redox moleculares. Por exemplo, sabe-se que o estresse oxidativo que ocorre no tecido renal e que o danifica, e tem sido atribuído essencialmente ao aumento na produção do radical superóxido, decorrente da diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD), diminuição da resposta antioxidante dependente da via de Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (KIM & VAZIRI, 2010) e da ativação da NADPH oxidase, enzima responsável pela síntese de espécies reativas como o superóxido (VAZIRI *et al.*, 2002). O Nrf2 é um fator de transcrição do tipo zíper de leucina, que possui grande importância na resposta celular a estresse oxidativo. Em estado fisiológico, Nrf2 é encontrado no citoplasma ligado com uma molécula supressora, o Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1), a qual facilita sua ubiquitinação e subsequente degradação. A proteína citoplasmática Keap1 contém resíduos de aminoácidos cisteínas com grupamentos tióis reativos que atuam como sensores do estado redox da célula, pois quando ocorre uma perturbação oxidativa na célula, estas cisteínas oxidam em cistina, causando uma diminuição da afinidade de Keap1 por Nrf2, liberando Nrf2 para o núcleo (NIWA, 2010).

No núcleo, Nrf2 atua como fator de transcrição para os genes chamados elementos de resposta oxidante (ARE), essencial para defesa antioxidante da célula (NIWA, 2010). Alguns dos produtos de ARE são a NAD(P)H quinona oxidoreductase que detoxifica quinonas reativas em processos redox de estresse (VENUGOPAL *et al.*, 1996), Glutamato cisteína ligase, o qual auxilia na manutenção dos níveis normais de GSH (SOLIS *et al.*, 202) Glutathione S-Transferase, família de enzimas mitocondrial e microssomais responsáveis por catalisar a conjugação de GSH xenobióticos eletrofílicos (HAYES *et al.*, 2000), Tioredoxina redutase 1, que participa da detoxificação de peróxidos (NEUMANN, *et al.* 2009),

Porém, dependendo do nível de estresse oxidativo presente em condição de DRC, a defesa antioxidante promovida por Nrf2 pode ser prejudicada. Foi demonstrado por Kim & Vaziri (2009) que em ratos com DRC por nefrectomia 5/6 com estresse oxidativo e inflamação causados pela uremia, a via de ativação de Nrf2

estava diminuída. Consequentemente muitos dos genes ARE, e outras defesas antioxidantes (ex: SOD, Gpx) estavam com expressão diminuídos.

Já a disfunção mitocondrial com consequente produção de ROS, tem sido bastante demonstrada na hiperglicemia, condição frequentemente associada a DRC (BROWNLEE, 2001; YU *et al.*, 2006; QUIJANO *et al.*, 2007). Vários estudos têm indicado que o aumento na produção de ROS mitocondrial, a fissão mitocondrial (WESTERMANN, 2012) e apoptose são processos associados com a hiperglicemia (YOULE & KARBOWSKI, 2005; YU *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2012). Em relação a DRC, foi demonstrada a produção de ROS no rim remanescente de ratos nefrectomizados (5/6) e a detecção, por espectroscopia paramagnética eletrônica (EPR), do espécie reativa de superóxido em mitocôndrias renais estimuladas com a toxina urêmica indoxil sulfato (OWADA *et al.*, 2009).

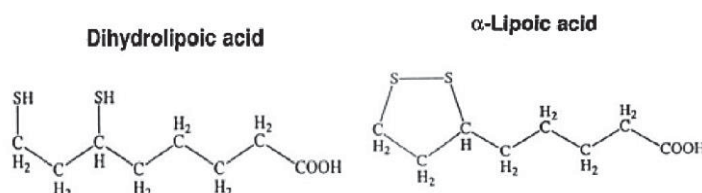
1.1.4. Terapia antioxidante

Para compensar o acúmulo de espécies oxidantes, a terapia antioxidante tem sido testada clinicamente em humanos, em modelos experimentais de DRC e em cultivo celular. Entre os antioxidantes mais frequentemente estudados estão a N-acetil-L-cisteína (NAC) e ácido alfa lipoico (α -LA). Nosso grupo demonstrou que o NAC inibiu o estresse oxidativo plasmático e o acúmulo de ureia no plasma de ratos nefrectomizados, ao mesmo tempo em que apresentou efeitos antioxidantes em células vasculares expostas ao soro urêmico (RODRIGUES, *et al.*, 2015).

O ácido alfa lipoico (ácido 1,2-ditiolano 3-pentanóico, α -LA, Figura 4) é um ácido graxo de 8 carbonos com anel tiolano com ponte dissulfeto entre os carbonos 6 e 8. Sintetizado na mitocôndria em forma de lipoamida, atua como cofator de várias α -cetoácido desidrogenases mitocondriais, e, portanto está envolvido no metabolismo energético pela descarboxilação oxidativa de α -cetoácidos como piruvato, α -cetogluturato e α -cetoácidos de cadeia ramificada na mitocôndria. Seus papéis biológicos como cofator são bem conhecidos; contudo, α -LA pode ser absorvido da dieta, ou de suplementação nutricional, a qual é absorvida até 93% pelo intestino e cerca de 20-30% escapa do metabolismo de primeira passagem no fígado. A meia vida do α -LA é aproximadamente 30 minutos, o que é considerado tempo muito curto para sua ação, porém sabe-se que seus metabólitos são capazes de exercer um efeito antioxidante a longo prazo, porém neste contexto, tais

metabólitos e suas funções e efeitos ainda não estão completamente estabelecidos (CREMER *et al.* 2006; SHAY *et al.* 2009).

FIGURA 5 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ÁCIDO DIHIDROLIPÓICO (DHHLA) E DO ÁCIDO α -LIPÓICO (α -LA).



O potencial de redução do α -LA a sua forma reduzida ácido dihidrolipóico é extremamente baixo, $-0,32V$ (PACKER *et al.* 1995), demonstrando o alto poder redutor da forma DHLA. Contudo, ambas as formas apresentam funções antioxidantes, como capacidade de quelar metais redox, como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} (este somente pela forma reduzida), capacidade de sequestrar radicais livres, como hidroxila e peroxila, e espécies reativas, como o oxigênio molecular singlete, o peroxinitrito e o ácido hipocloroso, além de regenerar antioxidantes endógenos como glutatona, ácido ascórbico e α -tocoferol (PACKER *et al.* 1995, WOLLIN SD, JONES PJH. 2003, SHAY *et al.* 2009). De fato, alguns trabalhos têm demonstrado que a administração de α -LA em humanos tem levado a consideráveis melhoras em vários parâmetros clínicos e bioquímicos associados ao seu potencial antioxidante (BILSKA and WLODEK 2005), em condições basais (MARANGON *et al.* 1999) e patológicas, como no diabetes e suas complicações (TANKOVA *et al.* 2004, ZIEGLER 2004, *et al.* 2010), câncer (BERKSON *et al.* 2009) e doenças neurodegenerativas (HAGER *et al.* 2007). Em animais experimentais, mais evidências sobre o papel antioxidante do α -LA têm sido demonstradas em situações como diabetes e suas complicações (KOYA *et al.* 2003, YI and MAEDA 2006, JOHNSEN-SORIANO *et al.* 2008, WINIARSKA *et al.* 2008), aterosclerose (Amom *et al.* 2008), intoxicação por chumbo (CAYLAK *et al.* 2008), glomerulonefrite (BUDISAVLJEVIC *et al.* 2003), infecção (GORACA and JOZEFOWICZ-OKONKWO 2007, VANASCO *et al.* 2008) e calcificação vascular (KIM *et al.*, 2011).

Apesar da reconhecida ação quelante de metais de transição e sequestradora de espécies reativas, vários trabalhos têm demonstrado que o α -LA pode atuar como

antioxidante indiretamente, estimulando vias de sinalização celular, como a ativação de Nrf2 (ELANGOVAN & HSIEH 2008, SHAY *et al.* 2009). Alternativamente, o aumento na produção de glutathione pode ser resultado da redução metabólica do α -LA a DHLA, que por sua vez é liberado pela célula. No meio extracelular, DHLA reduz cistina (Cyss) a cisteína (Cys), a qual é internalizada e utilizada pela enzima γ -glutamil cisteína ligase (HAN *et al.* 1997). Os efeitos benéficos do α -LA nas doenças pode também ser resultado da sua capacidade de inibição da via inflamatória NF- κ B (PACKER *et al.* 1995, KUNT *et al.* 1999), capaz de prevenir obesidade e de estimular a produção de monofosfato cíclico de adenosina, um agente imunomodulador (SALINTHONE *et al.* 2008).

Apesar da existência de um grande número de dados mostrando efeitos positivos do ALA, particularmente em modelos de diabetes e nefropatia diabética (VALLIANOU, *et al.* 2009), ainda há poucos relatos usando modelos experimentais de DRC. Pacientes de DRC e em hemodiálise conseguem metabolizar e excretar α -LA e seus metabólitos de forma independente do rim (TEICHERT *et al.* 2005). α -LA atenua a calcificação vascular induzida por hiperfosfatemia, preservando a função mitocondrial de células vasculares (KIM *et al.*, 2011).

Foi mostrada que a administração de α -LA até a 8ª semana, pós cirurgia de nefrectomia de 5/6 em ratos melhorou parâmetros de função renal (microalbuminúria, creatinina sérica, pressão arterial, e grau de glomeruloesclerose), assim como estado redox renal pela aumento de glutathione, vitamina E e redução da quantidade de malondialdeído no tecido renal (YU *et al.*, 2012).

1.2. EFEITOS DO INDOXIL SULFATO EM CÉLULAS MESANGIAIS

1.2.1. Toxinas Urêmicas

O indoxil sulfato é classificado como uma toxina urêmica. Tais toxinas são resíduos orgânicos que em condições fisiológicas normais são excretados pelos rins, porém na DRC ocorre o acúmulo de tais substâncias, gerando uma manifestação fisiopatológica chamado de uremia. Tais moléculas exercem efeitos danosos em tecidos do corpo (VANHOLDER, 2003; DURANTON, 2012).

Atualmente existem cerca de 152 solutos já identificados e caracterizados como toxinas urêmicas, segundo o grupo de pesquisa europeu EUTox. De acordo

com o EUTox, uma substância para ser considerada toxina urêmica deve obedecer determinados parâmetros: Os níveis plasmáticos e/ou corporais totais deverão ser mais altos do que em indivíduos não-urêmicos, deve ser quimicamente identificável e medido de forma precisa, Disfunções e/ou sintomas específicos devem estar relacionadas com as altas concentrações, e desaparecerem à medida que as concentrações são reduzidas, comprovações em estudos *ex vivo*, *in vivo* ou *in vitro* da atividade biológica desse composto nas mesmas concentrações encontradas nos fluidos corporais ou tecidos de pacientes urêmicos. Tais substâncias são divididas em três classes, de acordo com as características físico químicas. Classe de moléculas pequenas e de baixo peso molecular solúveis em água, como ureia, creatinina e ácido úrico por exemplo. Moléculas de tamanho médio com maior peso molecular, como peptídeos e hormônios, por exemplo o hormônio da paratireoide. E por fim, moléculas circulantes ligadas a proteínas plasmáticas, possuindo baixo peso molecular porém com grupos indóis e fenóis, sendo esta última classe, moléculas que não são removidas de maneira eficaz pelos métodos atuais de hemodiálise, tendo como exemplo o p-cresol e indoxil sulfato (BARRETO, *et al.* 2014; LISOWSKA-MYJAK, 2014).

1.2.2. Indoxil Sulfato

O indoxil sulfato, uma toxina urêmica de baixo peso molecular, é derivado das proteínas da dieta. O aminoácido triptofano oriundo das proteínas é metabolizado em indol pela triptofanase de bactérias intestinais como *Escherichia coli* por exemplo. Após absorção intestinal, o indol é metabolizado em indoxil sulfato no fígado por processo de sulfatação. Sua excreção é via urinária, sendo maior quantidade é via células do túbulo proximal, e em menor quantidade por filtração glomerular. O transporte é realizado por transportador aniônico orgânico 1 (OAT 1), que está presente na membrana basolateral das células tubulares proximais é responsável pela retirada do IS da circulação e eliminação pela urina. Na DRC, o clearance de IS é diminuído ao ponto de ocorrer o aumento de seus níveis no plasma sanguíneo. (NIWA, 2010; BARRETO, *et al.* 2014).

No soro, cerca de 90% do IS mostra-se ligado a albumina sérica. Sendo esse o motivo principal de a remoção dessa toxina urêmica não ser realizada

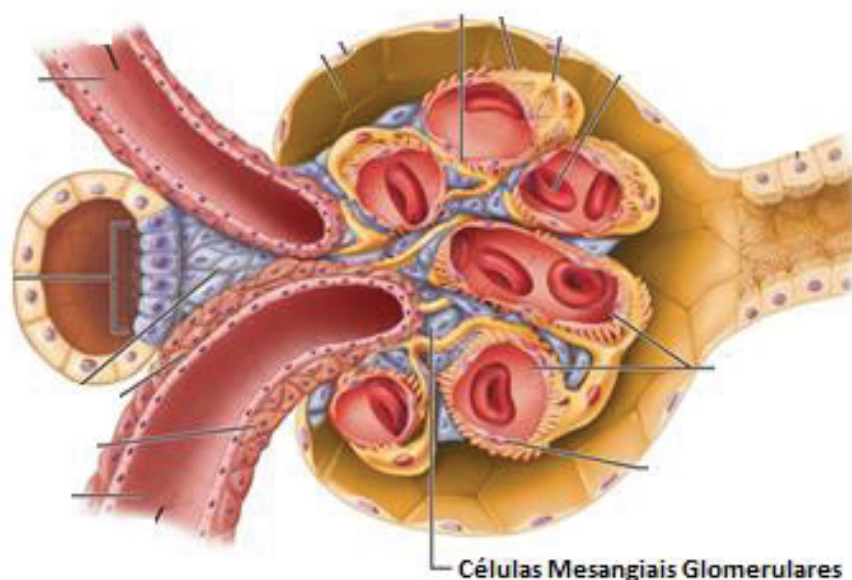
eficientemente na hemodiálise. O IS induz a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) nos néfrons remanescentes, agindo nas células tubulares renais, estimulando a fibrose tubulointersticial e glomeruloesclerose, aumentando a expressão de NF-kB, TGF- β 1, TIMP-1 e colágeno próa-1, causando uma perda ainda maior de néfrons funcionais. Por fim IS aumenta o consumo de oxigênio nos túbulos proximais, diminuindo a oxigenação renal, e conseqüentemente, induzindo uma hipóxia no tecido, diminui expressão de genes antioxidantes e é capaz de gerar peróxido de hidrogênio via NADPH oxidase (BARRETO, *et al.* 2014; DOU ET AL, 2003; GELASCO ET AL, 2006; NIWA, 2009, 2011, 2013).

Em um estudo de Dou *et al* (2007), avaliou-se o efeito do IS em modelo de disfunção endotelial *in vitro*, onde células endoteliais de veia umbilical humana que foram expostas ao IS sofreram estresse oxidativo. O IS, devido a sua atividade pró-oxidante, aumentou a atividade de NADPH oxidase, conseqüentemente aumentando a geração de EROs intracelular. Paralelamente a isso também ocorreu uma diminuição de antioxidante intracelular como a glutatona. A partir disso concluíram que o IS contribui para a disfunção endotelial presente em pacientes com DRC. Foi também demonstrado em outro estudo que o IS foi capaz de suprimir a expressão de genes mediada por Nrf2 em células HK-2 e tecido renal de ratos (BOLATI *et al* 2013).

1.2.3. Células Mesangiais

As células mesangiais, juntamente com a matriz mesangial, constituem a haste central do glomérulo e estão em continuidade com o mesângio extraglomerular e do aparelho justaglomerular, sendo de 30 a 40% do total de população celular do glomérulo.

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESANGIAIS.



FONTE: Adaptado de Brenner (2012).

Tal célula possui forma irregular, com um núcleo denso e processos citoplasmáticos alongados que podem estender em torno da luz capilar e localizando-se entre a membrana basal glomerular (MBG) e o endotélio do capilar. Em sua composição, possui uma vasta gama de filamentos de actina, α -actina e miosina, os quais a conferem características contráteis e de suporte, preenchendo a lacuna entre a MBG e o capilar, evitando assim distensão das paredes dos capilares e secundariamente mantendo a maior pressão hidrostática no lúmen capilar, deste modo, desempenhando um papel na regulação da TFG. A matriz extracelular mesangial é semelhante a MBG, e fornece o suporte necessário para a ancoragem, contração e migração das células mesangiais. Possui um ligante de integrina com função de transdução de sinal para regulação de produção de ME, assim como vários mediadores vasoativos, fatores de crescimento e citocinas. A CM também exibe propriedades fagocítica e participa do clearance de moléculas no mesângio, e por estar envolvida com produção de ME participa de várias formas na lesão glomerular (BRENNER, 2012; SCINDIA, 2010).

As CM podem guiar a lesão glomerular, exibindo comportamento anormal muito semelhante em diversos tipos de lesão. Lesões glomerulares podem ocorrer por deposições de imunoglobulinas ou imunocomplexos no mesângio, como a

presença de uma doença secundária como lúpus eritematoso, ou primariamente por nefropatia por imunoglobulina A. Deste modo, imunocomplexos podem ativar as CM por possuírem receptores de superfície Fc, as quais levam a lesão no glomérulo por produção de quimioatraentes para células inflamatórias, perda da integridade da ME com subsequente síntese excessiva de ME e expansão celular da própria CM. Outro exemplo de lesão glomerular mediada por CM é na nefropatia diabética, em que altos níveis de glicose extracelular estimulam a expressão de transportador de glicose GLUT1 pela CM. Consequentemente resulta em estresse oxidativo devido a hiperglicemia. Por fim pode-se citar em caso de hipertensão arterial a longo prazo, causa uma lesão podocitária devido à alta e constante pressão hidrostática que o glomérulo é submetido, consequentemente ativa os processos de expansão mesangial e produção excessiva de ME entre outros, pois existe um *cross-talk* de citocinas entre o podócito danificado e a CM, que acabam por induzir a ativação de mais processo de lesão glomerular, como por exemplo retração ou fusão dos pedicélios podocitários. (SCINDIA, 2010; SILVA'S, 2009).

Apesar de existir diversos estudos do efeito de toxinas urêmicas isolada sobre células renais, há escassez de estudos com células mesangiais, especificamente do efeito do IS sobre CM no estresse oxidativo.

1.2.4. Dinâmica mitocondrial

A mitocôndria está frequentemente mudando seu formato e distribuição, em que existe um equilíbrio de fissão/fusão da organela, podendo apresentar uma estrutura em forma de rede tubular contínua ou fragmentada como milhares de mitocôndria isoladas (BEREITER-HAHN, 1995). A manutenção deste equilíbrio dinâmico é crítico para a função celular, pois a função mitocondrial em um determinado momento reflete em sua estrutura e morfologia. Como por exemplo, a fissão mitocondrial facilita o transporte da organela dentro da célula, permitindo um rápido tráfego mitocondrial em regiões onde há maior demanda energética. Outro exemplo de fissão é com objetivo da reciclagem de mitocôndrias velhas ou danificadas por processos celulares de autofagia. Essa dinâmica não responde apenas a processos fisiológicos, mas também patológicos, como mostrado em estudo de Yu, *et al.* (2005) em hepatócitos incubados com altas concentrações de glicose, observou-se uma rápida fragmentação mitocondrial com consequente

produção de EROs. Para caracterizar qual era consequência de qual, foram feitas duas condições de hiperglicemia, em uma condições a fissão mitocondrial foi diminuída por mutação na proteína de fissão Drp1 (dynamin-like protein 1) e outra com superexpressão da proteína de fusão Mfn1(Mitofusin-1), com isso a formação de EROs foi significativamente diminuída nas duas condições, concluindo que tal processo de aumento de geração de EROs por hiperglicemia é dependente da fissão mitocondrial.

Outro estudo, sendo mais recente, de Zaja *et al* (2014) demonstrou que a fissão mitocondrial está intimamente relacionada com a morte de cardiomiócitos durante lesão de isquemia-reperfusão, sabe-se que tem como consequência a geração de EROs, e que ao inibir a fissão mitocondrial, reduzia-se a mortalidade dos cardiomiócitos após lesão de isquemia/reperfusão.

A partir de disso pode-se considerar a realização de um estudo da dinâmica mitocondrial da célula mesangial frente a exposição ao indoxil sulfato, pois ainda não há estudos demonstrando tal efeito. Diversas questões sobre isso podem ser levantadas como, de existir a possibilidade da geração de EROs por IS afetar a dinâmica mitocondrial CM, e se poderia haver consequências para a célula em um contexto de um organismo em, como na condição urêmica.

2. METODOLOGIA

2.1. ABORDAGEM EXPERIMENTAL

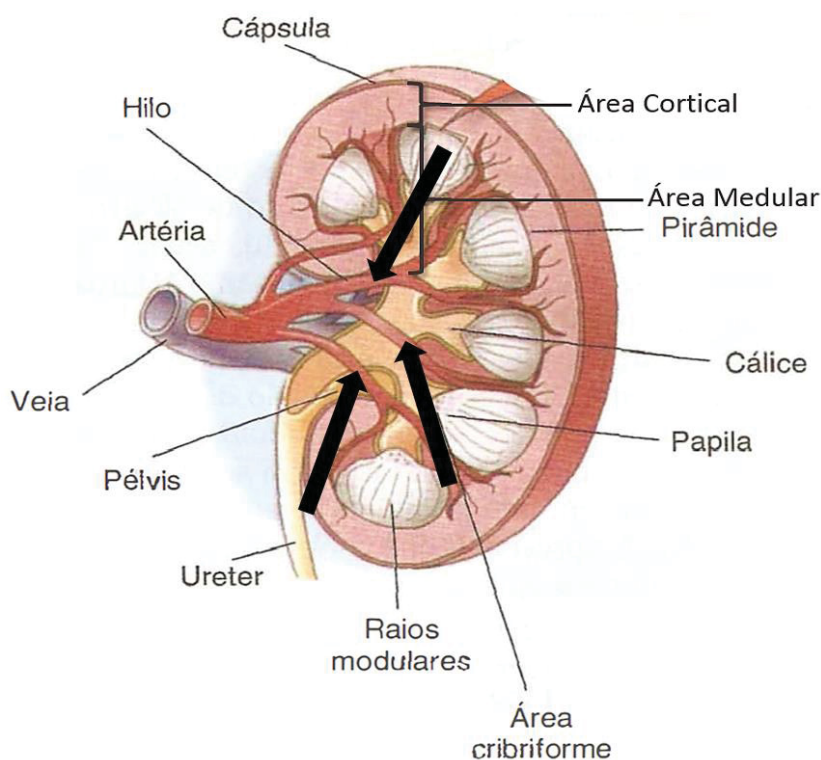
Os ratos Wistar machos do biotério da UFPR, de idade entre um a dois meses, com peso entre 200 a 300g foram divididos em 3 grupos experimentais (DRC: doente renal crônico, AAL: DRC com tratamento oral com α -LA e CRL: controle laparotomizados com *sham operation*). No sétimo dia pós-cirúrgico, o tratamento crônico com α -LA foi iniciado. O α -LA foi administrado por via oral na água de beber no 1º e 3º lote de animais na dose de 100mg/Kg/dia. No 2º lote de animais usou-se a via orogástrica por gavagem na dose de 100mg/Kg em dias alternados. O tratamento durou 53 dias, totalizando 60 dias de experimentação animal. No 60º dia, os ratos foram avaliados e eutanasiados para coleta de amostras. Avaliou-se os efeitos do α -LA no ganho de peso, e função renal, determinando níveis plasmáticos de ureia e creatinina, proteinúria e grau de glomeruloesclerose. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o número 692 (processo 23075.014112/2013-01).

2.1. INDUÇÃO DA UREMIA EXPERIMENTAL PELO MODELO DE ABLAÇÃO RENAL DE 5/6.

Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia de nefrectomia de 5/6 ou cirurgia laparoscópica como controle (FUJIHARA *et al.* 1995). Os ratos foram anestesiados com uma associação de Ketamina (50mg/kg) e Xilasina (10mg/kg). O rim esquerdo foi infartado por ligação de três dos quatro ramos da artéria renal (FIGURA 7), utilizando fio de sutura de polipropileno Prolene® 7.0 e o rim direito foi removido, sendo a artéria e veia fechadas juntamente com o ureter por fio de algodão. No 2º e 3º lote de animais foi utilizado uma solução vasoconstritora de ação local, contendo 0,01 mg/ml de adrenalina, com finalidade de impedir possíveis sangramentos no hilo renal durante a oclusão das ramificações da artéria renal, sendo aplicada de 0,1ml em cima do hilo renal. Analgesia pós-operatória foi feita com

Buscopan® Veterinário na dosagem de 0,25ml/kg. Após a cirurgia os animais receberam antibiótico, por via intramuscular, enrofloxacino 5 mg/Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas em grupos de 4 animais com livre acesso a ração e água, em ambiente climatizado e com ciclos de 12-12h de dia e noite. (SHIMIZU *et al.* 2005).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DAS RAMIFICAÇÕES DA ARTÉRIA RENAL OCLUÍDAS DO RIM ESQUERDO DO ANIMAL, INDICADAS PELAS SETAS.



FONTE: Adaptado de AIRES (2008).

2.2. TRATAMENTO COM ÁCIDO ALFA LIPOICO.

Em todos os três lote de animais o tratamento foi iniciado a partir do 7º dia pós-cirúrgico com término no 60º dia após a intervenção cirúrgica. O 1º lote de animais recebeu aproximadamente 25 mg/kg/dia de α -LA e o 3º lote 100mg/kg/dia (YU, *et al.*, 2013), em solução aquosa *ad libitum*. Esta foi preparada dissolvendo-se α -LA água potável aquecida a 40°C com agitação por 30 minutos. A concentração da solução foi calculada pela média de consumo semanal de água pelos animais, obtendo-se assim uma estimativa da média de consumo por rato, porém não

sabendo-se exatamente a dose ingerida por cada animal, e sim uma estimativa.

No 2º lote de animais, foi alterado o método de administração de antioxidante para via orogástrica por método de gavagem, com finalidade obter uma dose exata de ácido lipoico para cada animal, sendo administrada em dias alternados, ou seja a cada 48 horas. A dosagem de α -LA foi de 100mg/kg (YU, *et al.*, 2013), em suspensão aquosa de contendo 0.1% de espessante alimentar carboximetilcelulose (CMC). O espessante foi utilizado com a finalidade de evitar a precipitação do ácido lipoico, que ocorre devido sua alta concentração na solução, necessária para o pequeno volume a ser administrado para cada animal, que variou entre 300uL a 500uL de acordo com o peso semanal de cada animal. Dissolveu-se 0.1% carboximetilcelulose e α -LA 60mg/mL em água potável e homogeneizando a solução em equipamento Potter S Homogenizer Sartorius® a 1500RPM por 1 minuto. O volume de cada administração foi calculado individualmente de acordo com o peso de cada animal, obtendo-se uma dose exata de 100mg/kg. O espessante CMC é uma fibra dietética solúvel e altamente higroscópica, sendo largamente utilizado na indústria alimentar em uma gama de produtos industrializados como, sucos, sopas, embutidos entre outros. O CMC possui aprovação da ANVISA para seu uso em produtos alimentares segundo a Resolução nº 386, de 05 de agosto de 1999.

2.3. COLETA DE AMOSTRAS.

No tempo de 60 dias pós cirúrgicos, os animais foram pesados e eutanasiados com injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilasina na dose letal de 100 mg/kg cada, foi coletado 5 mL de sangue direto do coração pelo ventrículo direito em seringas de 5 mL agulha 30x7, e transferido 1,5 mL para tubo contendo 100uL de heparina sódica 5000U./mL Hepamax® para dosagens plasmáticas de ureia e creatinina. Em outro tubo contendo 150 de solução contendo 25mM Tetraborato de sódio, 100mM Ácido Bórico, 50uM L-Serina, 0,85uM BPDS, 16,1mM Ácido Iodoacético, denominada solução N°1, os dois tubos foram seguidamente centrifugado (1500 RCF, 4°C, 5 min) para isolamento do plasma (Melnik *et al.* 1999), congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C.

O tecido renal remanescente foi imediatamente removido, lavado em PBS a 4°C, e seccionado delicadamente com bisturi cirúrgico longitudinalmente e verticalmente em quatro partes. Duas partes foram acomodadas em cassetes

histológicos e deixadas em solução de formaldeído tamponado 4% por 24 horas. As outras duas partes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C.

As urinas de 24 horas foram coletados em gaiolas metabólicas individuais no 59º dia pós cirúrgico. Anotou-se o volume de urina de cada animal, coletando-se 1 mL, centrifugou-se a 1000RCF a 4°C. Coletou-se o sobrenadante descartando o pellet de *debris*. O sobrenadante foi armazenado em freezer a -20°C.

2.4. DETERMINAÇÃO DE URÉIA PLASMÁTICA

Os níveis plasmáticos de ureia foram determinados através de kit comercial Katal®, Katal Biotecnologia Indústria e Comercio Ltda. Brevemente, a ureia é hidrolisada pela enzima urease para íons amônio e gás carbônico. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra.

Para isso, em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 2µL de plasma livre de hemólise, seguidos 100uL de urease tamponada (urease 13KU/L, tampão fosfato 20 mmol/L 1,38, salicilato de sódio 62,4 mmol/L, nitroprussiato de sódio 3,36 mmol/L). Para o branco adicionou-se água no lugar da amostra, para o controle da reação foram utilizados 2µL do padrão fornecido pelo kit (ureia 70mg/dL). Cada amostra foi analisada em duplicata. As amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Após esse período foi adicionado em todas as amostras 100uL do composto oxidante (hidróxido de sódio 140mmol/L e hipoclorito de sódio 6,05 mmol/L).

Após 5 minutos de incubação a 37°C foi determinado a absorbância espectrofotometricamente a 595nm (Bio-Rad Model 680). O zero foi acertado com o branco da reação. O valor de ureia plasmática é por:

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 70$$

2.5. DETERMINAÇÃO DE CREATININA PLASMÁTICA

Para isso utilizou-se o kit comercial Creatinina Labtest® Diagnóstica SA. O método se baseia na observação de que a reação da creatinina com o picrato

alcalino é muito rápida, enquanto a reação do picrato com os cromogênios é mais lenta. A medida da reação nos primeiros minutos permite a determinação da creatinina.

A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor amarelo alaranjado que é medido fotometricamente em 510nm. Porém, com a acidificação do meio todos os cromógenos são degradados, menos o picrato de creatinina, que é estável em pH ácido.

Para cada amostras de plasma e para o padrão, em tubos de 1,5mL, adicionou-se 75uL do plasma e 150uL de ácido pícrico 44,4 mmol/L, homogeneizou-se em vortex e centrifugou-se a 1000RCF para precipitação de proteínas plasmáticas. Transferiu-se 56uL do sobrenadante para microplaca de 96 poços contendo 140uL de Tampão (hidróxido de sódio 208 mmol/L, tetraborato de sódio 12,7 mmol/L e surfactante) e incubou-se por 15 minutos a 37°C e após leu-se em comprimento de onda de 510nm (Bio-Rad Model 680), descontando o branco contendo apenas água destilada no lugar da amostra, tomando-se os valores de absorbância de cada amostra como A1. Posteriormente adicionou-se 7uL de acidificante em cada poço contendo amostra (ácido acético 11,4 mol/L), incubando a 37°C por 15 minutos e lendo em 510nm (Bio-Rad Model 680), tomando-se os valores de absorbância de cada amostra como A2. A valor de creatinina plasmática é dado por:

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{(A1-A2)}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 4,00$$

2.6. DETERMINAÇÃO DE PROTEINÚRIA

A dosagem de proteínas nas urinas coletadas foi realizado utilizando o método de Bradford (1976). Que baseia-se em determinação de proteínas totais que fazendo uso do corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Quando o corante BG-250 entre em contato com as moléculas proteicas contendo cadeias de aminoácidos laterais aromáticas ou básicas, ocorre um desequilíbrio no pH da solução, fazendo o corante passar de sua forma catiônica nativa de cor avermelhada para forma aniônica de coloração azulada, sendo a intensidade da cor proporcional a quantidade

de proteínas totais, absorvendo em comprimento de onda de 595nm.

Diluiu-se o reagente de Bradford Bio-Rad Protein Assay® em proporção de 1 parte do reagente mais 4 partes de água destilada. Em placa de 96 poços adicionou-se 200ul do reagente diluído. Para a curva padrão utilizou-se uma solução de albumina de soro bovino a 1mg/mL. As amostras de urina foram diluídas 10X e adicionado 5uL em cada poço, homogeneizando com a própria ponteira de micropipeta. A leitura da absorbância foi feita a 595nm.

Para o cálculo da concentração das amostras utilizou-se a equação da reta, obtida por software Microsoft Excel 2013 a partir da curva padrão feita com BSA.

2.7. PREPARO DE AMOSTRAS PARA SECÇÕES HISTOLÓGICAS E COLORAÇÃO PAS

O tecido renal foi coletado, fixado com formaldeído 4% tamponado em pH 7,4 por 24 horas com finalidade de fixação completa do tecido, impedindo autólise e destruição do tecido, assim como endurecimento do tecido a fim de manter a sua estrutura do tecido e ultraestrutura celular. Após foi realizado a desidratação do tecido, mergulhando-os em soluções de proporções crescentes de álcool, como 50%, 70%, 80%, 90%, e 100%, por 3 horas cada. A desidratação tem como finalidade de retirar a água para que seja ocupada por um material de preenchimento rígido, como a parafina. Este material permite que o tecido seja cortado em finas camadas preservando totalmente sua estrutura original. Após desidratação, foi realizado o processo de clareamento ou diafanização, em que o tecido desidratado é mergulhado em um líquido em que a parafina seja solúvel, neste caso o tecido foi deixado por 3 horas em xilol. Seguidamente o tecido foi mergulhado em parafina líquida a 60°C por 1 hora. Após solidificação do bloco foi realizado cortes de 5µM em micrótomo.

A coloração do ácido periódico de Schiff (PAS) foi aplicada para a coloração de estruturas que contenham uma alta proporção de carboidratos, como glicogênio, glicoproteínas, proteoglicanos. É uma reação efetuada em duas etapas: na primeira, grupos vicinais hidroxil dos carboidratos são oxidados a aldeídos, na segunda etapa, os dialdeídos formados são evidenciados usando-se o reagente de Schiff, que é o corante fucsina básica. A cor produzida varia entre o púrpura e o magenta, nos sítios onde se localizam carboidratos oxidáveis. O procedimento foi realizado pelo

Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, onde foi feito a desparafinização em xilol por 1 hora e hidratação em concentrações alcoólicas decrescentes de 100%, 90%, 80%, 70% e 50% e água destilada 3 minutos cada. Posteriormente foram incubadas em uma solução de ácido periódico 0,5% por 5 minutos, lavadas com água destilada e incubadas em Reativo de Schiff por 20 minutos, e lavados em água sulfurosa por 3 vezes de dois minutos cada lavagem. A água sulfurosa foi então substituída por água destilada. Por fim foi realizado coloração dos núcleos com hematoxilina de Harris por 40 segundos. Ao final do processo, as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas em concentrações de álcool 50%, 70%, 80%, 90%, e 100%, por 3 minutos cada, finalizando com adição de meio de montagem de lâminas Entellan e fechamento do corte com lamínula.

2.8. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DE GLOMERULOESCLEROSE, FIBROSE INTESTICIAL E ATROFIA TUBULAR

Para esta análise, foi pedido auxílio da Professora^a Dr^a Maria Fernanda Soares, médica patologista do Hospital das Clínicas – Curitiba – Paraná. A determinação do grau de glomeruloesclerose foi feito em microscópio Olympus, onde foi realizado contagem de glomérulos normais e esclerosados em campos em 10 campos de 100X em lâmina de tecido renal corado com PAS, com microscópio Olympus 40 com múltiplas cabeças para visualizações. Foram escolhido 10 campos de tecido de cada amostra pois este número era suficiente para observar quase totalmente o tecido renal presente na lâmina. Os glomérulos totais observados em cada campo foram contados, em seguida no mesmo campo contava-se os glomérulos que apresentavam qualquer grau de GE. Para fibrose intersticial e atrofia tubular, utilizou-se um aumento de 10X, e estimou-se uma porcentagem da área do tecido que apresentava tais características.

2.9. DETECÇÃO DE DO PAR REDOX PLASMÁTICO CISTINA/CISTEÍNA

Para a quantificação de cisteína e cistina no plasma dos ratos DRC, foi utilizado o protocolo adaptado de Jones e Liang (2009), utilizando método de derivatização e cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) com detector de fluorescência.

Em métodos de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC), padrões

externos foram utilizados na identificação dos picos no cromatograma e rotineiramente, para construir uma curva de calibração e quantificação de cada analíto de interesse nas amostras. Os padrões de L-Cistina (CySS), L-Cisteína (CyS) de alta pureza (<99%), foram adquiridos da Sigma Aldrich®. Foram feitas diluições de 1 mM em água ultrapura (MilliQ®) e estas foram filtradas em filtro Millipore® 22µm e armazenadas em freezer -80°C. Para verificação da concentração de cada padrão, as amostras foram submetidas ao método de Ellman ou DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)) descrito por Ellman (1959).

Para o protocolo, foi necessário reduzir 100µL de cada um dos padrões dissulfetos da cistina utilizando 35µL de uma solução de boroidreto de sódio 1,43M. Para esta reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e posteriormente interrompida com 70µL de HCl 1M.

Para a reação de DTNB, em um tubo de 1,5mL, foram adicionados 50µL de cada padrão e 950µL de tampão fosfato 500mM contendo 0,5M de DNTB, 0,5M DTPA pH 7,4. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 412nm.

Para o cálculo das concentrações, foi utilizada a seguinte fórmula: $A = \epsilon b c$. Onde, A é Absorbância, ϵ é Coeficiente de absorção molar (14100 M⁻¹x cm⁻¹), b corresponde ao Caminho óptico da cubeta (1 cm) e c é Concentração (M). Para o cálculo da concentração final, as diluições foram consideradas.

Primeiramente, foi preparado um tampão estoque de Acetato, adicionando 272g de Acetato de sódio triidratado em 378mL de Ácido acético Glacial (Padrão analítico, HPLC) sob agitação por 16 horas de.

O método para HPLC utiliza um gradiente entre dois solventes, A e B. O solvente A consiste de uma solução de 80% Metanol em água ultrapura e o tampão B é uma mistura de 640mL de metanol com 200mL do tampão Acetato estoque, 125mL de ácido acético glacial e 50mL de água ultrapura.

O equipamento utilizado foi um HPLC da Shimadzu Prominence® (Tokyo, Japão) equipado com um injetor manual Rheodyne®, uma bomba de dois pistões (LC-20AD) controlada pelo software LC Solution® equipada com detector de fluorescência Shimadzu RF-20A. Foi utilizada excitação em 335 nm e emissão detectada em 518 nm. A separação dos analítos foi realizada em uma coluna 25-cm × 4.6-mm, 5-µm sílica, LC–NH₂ Supelco Sigma Aldrich®.

Um gradiente de tampões foi desenhado de modo a determinar o tempo de retenção de cada analíto. Inicialmente, Jones e Liang (2009) estabeleceram uma

'corrida' de 60 minutos para a detecção tanto de CyS e CySS quanto GSH/GSSG. Foi feita uma nova padronização de método, reduzindo este tempo para 45 minutos, mantendo as condições de análise.

Os plasmas que foram coletados juntamente com a solução N°1 (item 3.4 COLETA DE AMOSTRAS) foram centrifugados a 10.000RCF para retirada de proteínas precipitadas, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL contendo 190uL de solução N°2 contendo 50mM ácido bórico e 0,6M ácido perclórico. As amostras foram centrifugadas e 50µL do sobrenadante foram injetados para a quantificação de CyS e CySS no plasma. O fluxo do sistema de cromatografia se manteve fixo em 1mL/min. A separação foi obtida com um gradiente de tampões, onde os tampões A e B se intercalam, com a finalidade de reduzir a afinidade de cada analito pela coluna cromatográfica. A quantificação dos analitos foi realizada através de uma curva padrão processada com o protocolo descrito anteriormente.

O potencial de redução do par cisteína/cistina de cada animal foi calculado através da equação de Nernst, utilizando um potencial padrão de redução (E0) de -250mV, para pH 7,4 (Blanco et al, 2007) e as concentrações plasmáticas de cisteína e cistina, em mols por litro, obtidas de cada animal:

$$E_h = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[cistina]}{[cisteína]^2}$$

Onde:

E0 = -250 mV; n = 2;

R = 8,314 J/mol.K; F = 96,406 J/V T = 309 K;

2.10. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR SONDA FLUORESCENTE DE DICLOROFLUORESCEÍNA

A diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) apolar e sem carga, atravessa a membrana celular por difusão passiva, e no meio intracelular os grupos acetato são hidrolisados gerando diclorofluoresceína (DCFH), que torna-se uma molécula polar e permanece aprisionada dentro da célula, e na presença de espécies reativas como peróxido de hidrogênio, emite fluorescência com comprimentos de onda de excitação em 485 nm e emissão em 530 nm.

As células mesangiais utilizadas foram obtidas por doação, não estando

disponíveis para compra na ATCC. Tais células extraídas de feto de 16 semanas após aborto espontâneo, imortalizadas por transfecção de plasmídeos pUCInwt e pRc/CMV por vírus SV40 (BANAS, *et al*, 1999)

As células mesangiais foram cultivadas em placa de 96 poços em densidade de 2×10^5 células por poço, utilizando-se meio de cultivo DMEM baixa glicose Cultilab contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). E incubadas com 10uM DCFH-DA (Sigma-Aldrich®) por 30 minutos a 37°C em incubadora de CO₂ na ausência de luz. Após as células foram lavadas com solução salina PBS por três vezes a fim de retirar toda DCFH-DA que não adentrou as células.

Foi realizado um pré-tratamento das células por 30 minutos com 10uM de difenileneiodônio (DPI), um inibidor irreversível da enzima NADPH oxidase, principal enzima geradora de ROS intracelular, e separadamente 2,5mM de Probenecid, um inibidor do OAT1, com a finalidade de atestar a presença de tal transportador na linhagem utilizada.

O indoxil sulfato de potássio (Sigma-Aldrich) foi adicionado na concentração de 939uM em duas condições: PBS e PBS+10%SFB, determinadas pelo EUTox como sendo concentração máximo urêmica, como controle da porção indoxil do IS, 939uM de sulfato de potássio foi utilizado na mesma concentração. Como controle positivo da reação aplicou-se em poços isolados 0,5mM de H₂O₂. Para cada análise foi realizado replicatas de 5 poços. Rapidamente seguiu-se para leitura em leitor de placa com detecção de fluorescência Rchisto Infinite® M200 com comprimentos de onda de excitação em 485nm e emissão em 530nm. Foram realizadas leituras nos tempos de 10, 30 e 60 minutos após adição do IS. Entre os intervalos das leituras manteve-se a placa em incubadora de CO₂ a 37°C na ausência de luz, pois esta pode catalisar reação de oxidação tanto da sonda quando da amostra.

2.11. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE FISSÃO/FUSÃO MITOCONDRIAL

Para determinação qualitativa da dinâmica mitocondrial, utilizou-se uma sonda fluorescente específica para mitocôndria, a MitoTracker® Red CMXRos (Life Technologies). Em placa de 24 poços contendo uma lamínula de vidro estéril em cada poço foi utilizada para plaquear 2×10^5 células por poço, utilizando-se meio de cultivo DMEM Cultilab contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Adicionou-se

separadamente 10 μ M de difenileneiodônio (DPI), e 2,5mM de Probenecid (PROB), como controle da porção indoxil do IS, 939 μ M de sulfato de potássio foi utilizado. Como os controles negativos do IS. Como controle positivo utilizou-se 0,1mM de H₂O₂ no meio de cultivo. O indoxil sulfato foi adicionado apenas na concentração de 939 μ M. Tendo poços contendo individualmente, PBS, SO₄, DPI, PROB, IS, DPI+IS, DPI+PROB, H₂O₂. Cultivou-se as células em tais condições por 24 e 48 horas.

Nos tempos de 24 e 48 horas retirou-se os tratamentos e lavou-se com tampão PBS a 37°C por duas vezes. Adicionou-se então 100nM da sonda mitocondrial e incubou-se por 30 minutos. Lavou-se cada poço novamente por duas vezes para retirada da sonda não ligada e fixou-se com solução de paraformaldeído 4% por 15 minutos.

As lamínulas foram então montadas em lâminas de vidro com meio de montagem histológico. As imagens foram produzidas microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando objetivas de 60X com imersão em óleo com abertura numérica de 1.40. Utilizou-se linhas fixas de *laser* para excitação a 579nm e filtro de intervalo (“band pass”) de 570-620nm. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens.

2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram realizadas a partir do teste One Way ANOVA com *pos-hoc* Tukey, com $p > 0,05$, através do software SigmaStat for Windows versão 3.5.

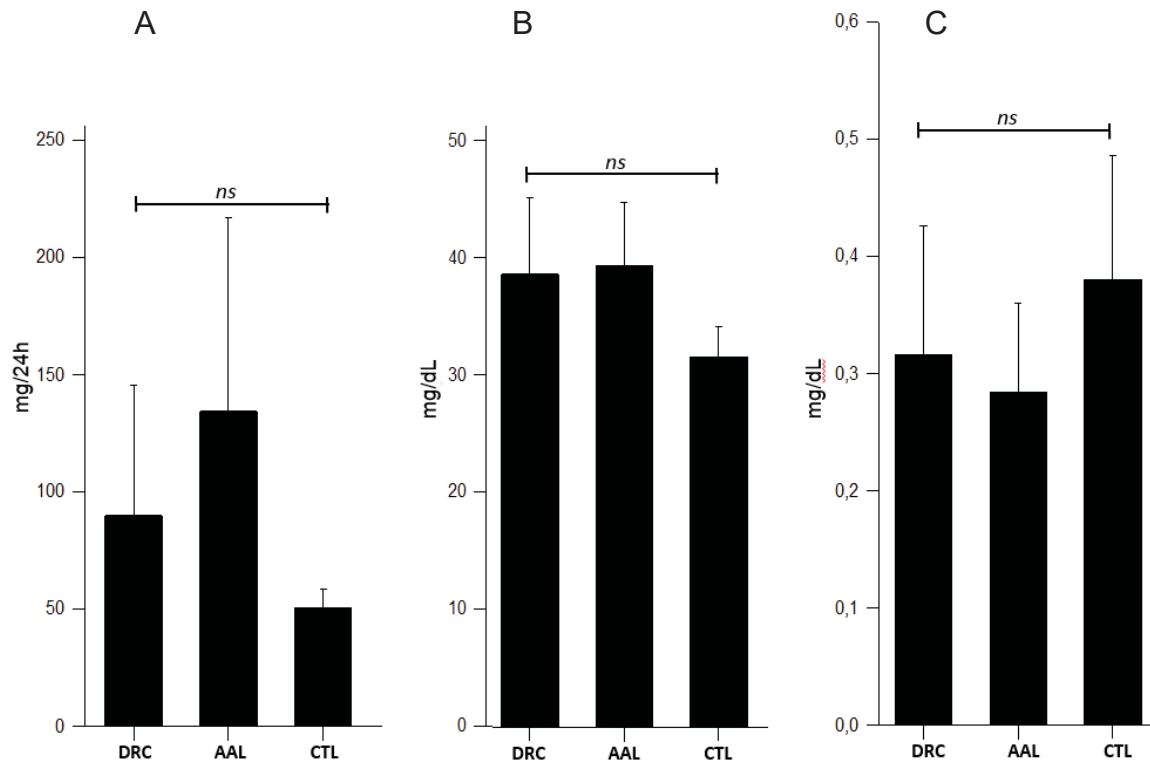
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PRIMEIRO LOTE DE ANIMAIS NEFRECTOMIZADOS

Os resultados do 1º lote de animais, de modo não esperado, foram negativos para todas as análises para determinação da presença da doença renal crônica nos animais, ou seja, todos demonstraram que a nefrectomia de 5/6 não foi realizada de maneira efetiva para induzir a doença renal. Não houve nenhuma diferença estatística comparando os dados dos grupos nefrectomizados (DRC) com o controle (CTL) e com o grupo nefrectomizados com tratamento com α -LA (AAL). As análises realizadas foram proteinúria de 24 horas, ureia e creatinina plasmática (GRÁFICO 1). Realizados os mesmos teste a partir do plasma sanguíneo de todos os animais no mesmo dia da nefrectomia, sendo que todos apresentavam valores dentro do fisiológico, que seria de até 15mg/24h de proteinúria até 45mg/dL para ureia plasmática, até 0,6mg/dL para creatinina plasmática e (SANTOS, 2010). O Valor da proteinúria do grupo CTL (GRAFICO 1.A) exibiu um valor da acima da média do normal fisiológico. Porém foi notado que durante a coleta da urina do grupo CTL nas gaiolas metabólicas, houve uma grande contaminação for fezes e ração dos animais devido à quebra das grades que faziam a contenção destes dejetos, podendo ter contribuído para a presença de alta quantidade de proteínas na amostra. Tais grades apresentavam diversos pontos de ferrugem, o que após diversas coletas acabaram cedendo com o peso do animal, deixando que tais materiais contaminantes entrassem em contanto com a urina coletada.

Todas análises descritas anteriormente foram repetidas de modo independente e os resultados repetiram-se como negativos para a presença da DRC em todos os grupos nefrectomizados. Como tais resultados foram negativos, as análises subseqüentes de glomeruloesclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular não foram realizadas devido a não conformação da presença da DRC, portanto não havia como comparar os possíveis efeitos renoprotetores do α -LA pois não havia dano renal significativo.

GRÁFICO 1 – RESULTADOS DE FUNÇÃO RENAL NO 1º LOTE DE ANIMAIS 60 DIAS APÓS NEFRECTOMIA DE 5/6. **(A)**: PROTEINÚRIA DE 24 HORAS. **(B)**: UREIA PLASMÁTICA. **(C)**: CREATININA PLASMÁTICA. *ns* – NÃO SIGNIFICATIVO ENTRE GRUPOS. (DRC n=13): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6. (AAL n=10): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6 COM TRATAMENTO ORAL COM α -AL 25mg/kg/dia. (CTL n=3): GRUPO CONTROLE LAPARATOMIZADO



FONTE: O autor (2015).

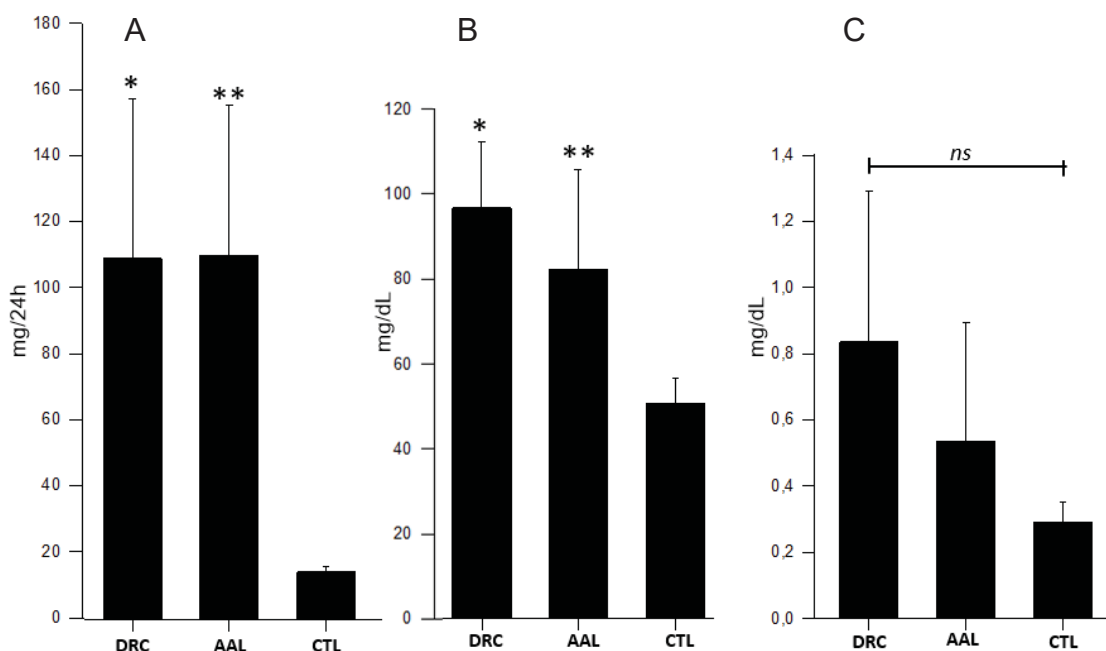
Após extensa e cuidadosa reavaliação do procedimento cirúrgico, concluiu-se que a ineficiência da nefrectomia de 5/6 foi devido ao não fechamento de um número suficiente das ramificações da artéria renal, a qual possui geralmente quatro ramificações, sendo necessário ocluir no mínimo três ramos para que o animal desenvolva a DRC no período de 60 dias. Esta falta de oclusão dos ramos foi devido a certa dificuldade de localização e visualização das ramificações da artéria renal, pois havia presença de tecido adiposo no hilo e seio renal. Este tecido adiposo necessitava ser removido cuidadosamente com micropinça, pois possuía uma quantidade significativa de vascularização. Durante a retirada deste tecido adiposo era comum a ocorrência de sangramentos, o qual se não fosse rapidamente estancado coagulava sobre o hilo renal impedindo completamente a visualização das pequenas ramificações arteriais renais. Deste modo, juntamente com a pouca experiência prática com o procedimento de nefrectomia 5/6, o número de

ramificações ocluídas necessária para indução da DRC não foi atingido em todos os animais nefrectomizados, resultando animais saudáveis mesmo após 60 dias pós cirúrgicos.

3.2. SEGUNDO LOTE DE ANIMAIS NEFRECTOMIZADOS

No 2º lote de animais, os problemas ocorridos com a ineficiência da cirurgia para causar a DRC em ratos foi corrigida. A principal, dificuldade que eram os sangramentos devido a remoção do tecido adiposo, para acesso das ramificações da artéria renal foi contornado utilizando uma solução estéril vasoconstritora de adrenalina a 0,01 mg/ml. Com ação rápida e local, a adrenalina causava uma diminuição significativas do calibre os vasos sanguíneos do tecido adiposo. Com isso, o tecido adiposo era facilmente removido sem extravasamento sanguíneo, revelando abaixo as ramificações das artérias renais a serem ocluídas.

GRÁFICO 2 – RESULTADOS DE FUNÇÃO RENAL NO 2º LOTE DE ANIMAIS 60 DIAS APÓS NEFRECTOMIA DE 5/6. **(A)**: PROTEINÚRIA DE 24 HORAS. * $p < 0,05$ vs. CTL ** $p < 0,05$ vs. CTL. **(B)**: UREIA PLASMÁTICA * $p < 0,05$ vs. CTL ** $p < 0,05$ vs. CTL. **(C)**: CREATININA PLASMÁTICA. *ns* – NÃO SIGNIFICATIVO ENTRE GRUPOS. (DRC n=5); GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6. (AAL n=7); GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6 COM TRATAMENTO ORAL COM α -AL 100mg/kg/48h. (CTL n=4); GRUPO CONTROLE LAPARATOMIZADO.

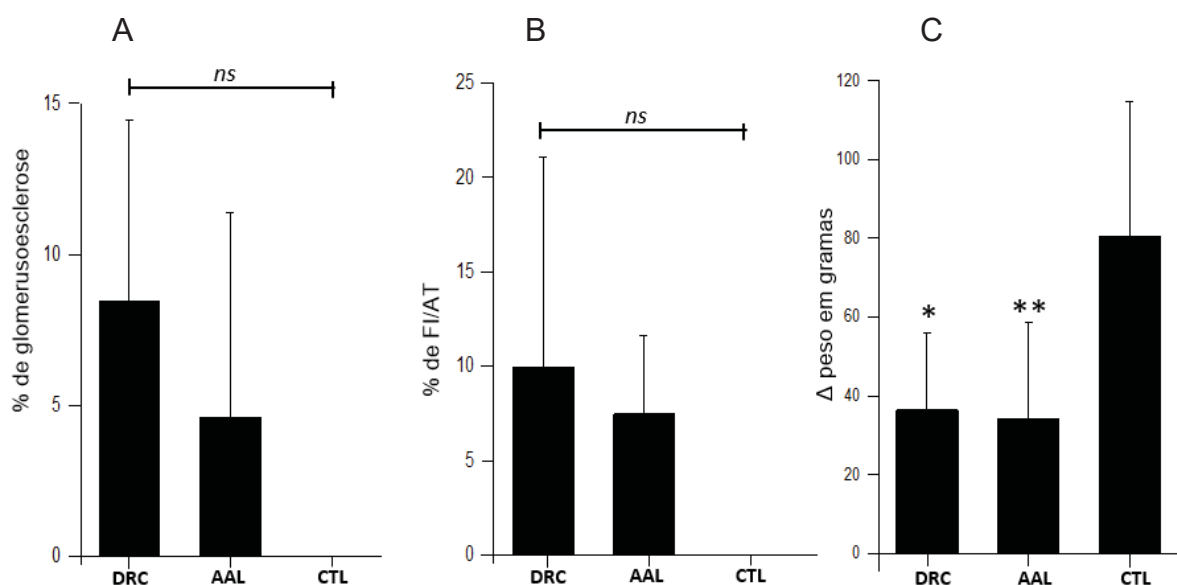


FONTE: O autor (2015).

Para este lote a dose de α -LA foi ajustada para 100mg/kg/dia, a qual o valor é pouco menor da dose máxima segura para consumo de 121mg/kg em que não ocorre toxicidade para o organismo.

Nos teste de função renal (GRÁFICO 2), constatou-se que houve diferença significativa entre o grupo DRC e o controle nos teste de proteinúria e ureia plasmática, demonstrando que a cirurgia foi efetiva para causar a doença renal crônica com o modelo de nefrectomia de 5/6 propõe, porém sem aumento significativo de creatinina plasmática. Entretanto, não houve diferença estatística entre o grupo DRC vs AAL, sugerindo que o α -La não teve o efeito renoprotetor esperado para tais análises de função renal. Os mesmos testes foram realizados a partir do plasma de todos os animais retirados durante a nefrectomia, todos apresentavam valores dentro do fisiológico.

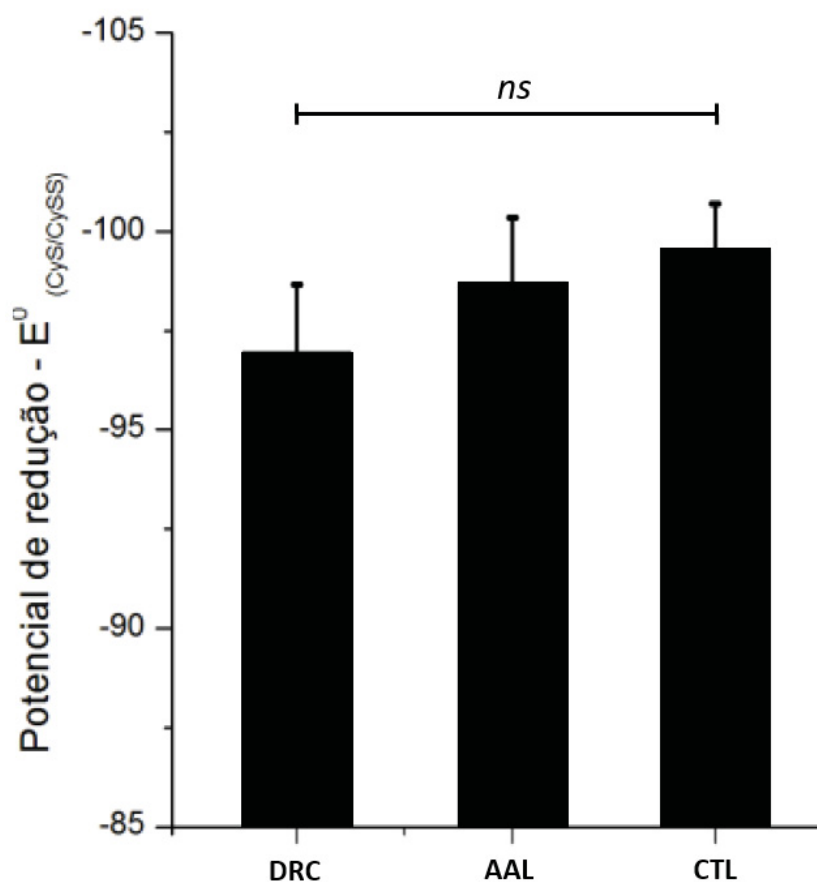
GRÁFICO 3 – RESULTADOS DE ANÁLISE HISTOLÓGICA SEMIQUANTITATIVA, E GANHO DE PESO CORPORAL DO 2º LOTE DE ANIMAIS 60 DIAS APÓS NEFRECTOMIA DE 5/6. (A): PORCENTAGENS DE GLOMÉRULOESCLEROSE TOTAL E SEGMENTAR. *ns* – NÃO SIGNIFICATIVO ENTRE GRUPOS (B): PORCENTAGEM DE FIBROSE INTERSTICIAL E ATROFIA TUBULAR. *ns* – NÃO SIGNIFICATIVO ENTRE GRUPOS (C): VARIAÇÃO DO GANHO DE PESO **p*<0,05 vs. CTL. ***p*<0,05 vs. CTL. (DRC n=5): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6. (AAL n=7): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6 COM TRATAMENTO ORAL COM α -AL 100mg/kg/dia. (CTL n=4): GRUPO CONTROLE LAPARATOMIZADO



FONTE: O autor (2015).

Neste 2º lote, foi constatado um certo grau de glomeruloesclerose (GE) (GRÁFICO 3.A), fibrose intersticial e atrofia tubular (FI/AT) (GRÁFICO 3.B) nos ratos animais nefrectomizados, porém não houve diferença estatística comparado ao grupo controle. Já a variação de peso corporal estava presente nos dois grupos nefrectomizados (GRÁFICO 3.C), porém sem efeito positivo do α -LA. O menor ganho de peso nos animais nefrectomizados podem ser explicadas pela baixa produção de eritropoietina, hormônio responsável pela produção de eritrócitos, o que a falta de tal leva a um quadro anêmico.

GRÁFICO 4 – RESULTADOS DE ANÁLISE POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO DO PAR CISTEÍNA/CISTINA DO 2º LOTE DE ANIMAIS 60 DIAS APÓS NEFRECTOMIA DE 5/6. *ns* – NÃO SIGNIFICATIVO ENTRE GRUPOS. (DRC n=5): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6. (AAL n=7): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6 COM TRATAMENTO ORAL COM α -AL. (CTL n=4): GRUPO CONTROLE LAPARATOMIZADO.



FONTE: O autor (2015).

Não foi observado alteração significativa no potencial de redução plasmático do par cisteína/cistina, demonstrando que os animais não se encontravam estresse oxidativo plasmático (GRÁFICO 4).

Na análise qualitativa de lâminas de tecido renal corado com PAS, foi observado alterações na estrutura glomérulos remanescentes. Alterações essa que caracterizavam-se por uma diminuição do espaço luminal da cápsula de Bowman, com adesão dos capilares glomerulares nas paredes internas da cápsula, expansão de células mesangiais com aumento da produção de sua matriz, alterações nas estruturas tubulares como perda parcial das microvilosidades das paredes dos túbulos contorcidos distais, acúmulo de material hialino proteico nos túbulos distais, sendo estas todas características de lesão renal comumente observado na DRC (SILVA'S, 2009).

Um fator que pode ter contribuído para tais resultados foi o tempo de administração oral do α -LA, sendo de 48 a 48 horas, um período relativamente longo. A metabolização do α -LA ocorre de forma muito rápida, tendo o composto meia vida de 30 a 40 minutos (MIGNINI, *et al*, 2012). Outros estudos, os quais serviram como base para este longo tempo de administração do α -LA, utilizaram o mesmo tempo de 48 a 48 horas, porém por via intraperitoneal, a qual possui uma absorção e distribuição muito mais rápida que a via oral e não há metabolização de primeira passagem pelo fígado, em que apenas 20 a 30% do α -LA escapa desta metabolização hepática (YU, *et al*, 2013).

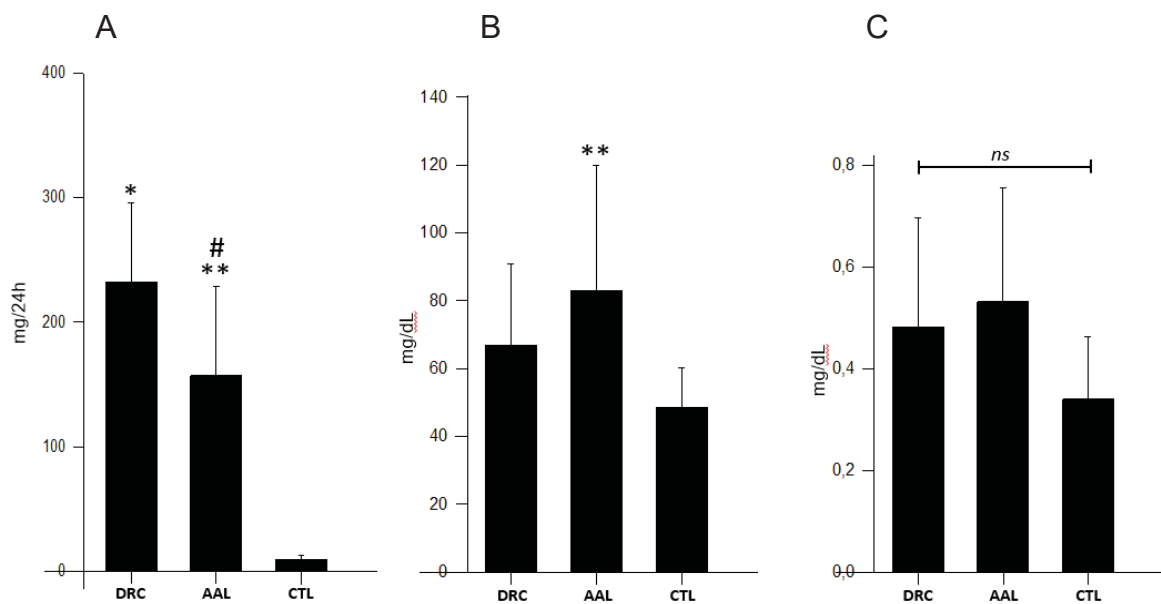
Como tal modelo de nefrectomia 5/6 gera animais com diferentes graus da doença renal crônica no mesmo intervalo de tempo (LIU, 2003), os resultados tendem a ter um desvio padrão muito grande, que juntamente com o pequeno número de animais por grupo, contribui para que o teste de normalidade na análise estatística acuse que o conjunto de dados são variáveis aleatórias.

3.3. TERCEIRO LOTE DE ANIMAIS NEFRECTOMIZADOS

Como o tratamento com α -LA pelo método de gavagem do 2º lote de animais não se mostrou eficaz, decidiu-se a aplicar novamente o método de α -LA dissolvido em água de beber ofertado *ad libitum* com a mesma dosagem de 100mg/kg. Decidiu-se também aumentar o número de animais por grupo, com finalidade de diminuir o

grande desvio padrão dos resultados exibidos devido à grande variabilidade do modelo de nefrectomia de 5/6 (LIU, 2003).

GRÁFICO 5 – RESULTADOS DE FUNÇÃO RENAL NO 3º LOTE DE ANIMAIS 60 DIAS APÓS NEFRECTOMIA DE 5/6. **(A)**: PROTEINÚRIA DE 24 HORAS * $p < 0,001$ vs. CTL. ** $p < 0,001$ vs. CTL. # $p < 0,05$ vs. α -LA. **(B)**: UREIA PLASMÁTICA ** $p < 0,05$ vs. CTL. **(C)**: CREATININA PLASMÁTICA *ns* – NÃO SIGNIFICATIVO ENTRE GRUPOS. (DRC n=14): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6. (AAL n=9): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6 COM TRATAMENTO ORAL COM α -AL. (CTL n=11): GRUPO CONTROLE LAPARATOMIZADO.

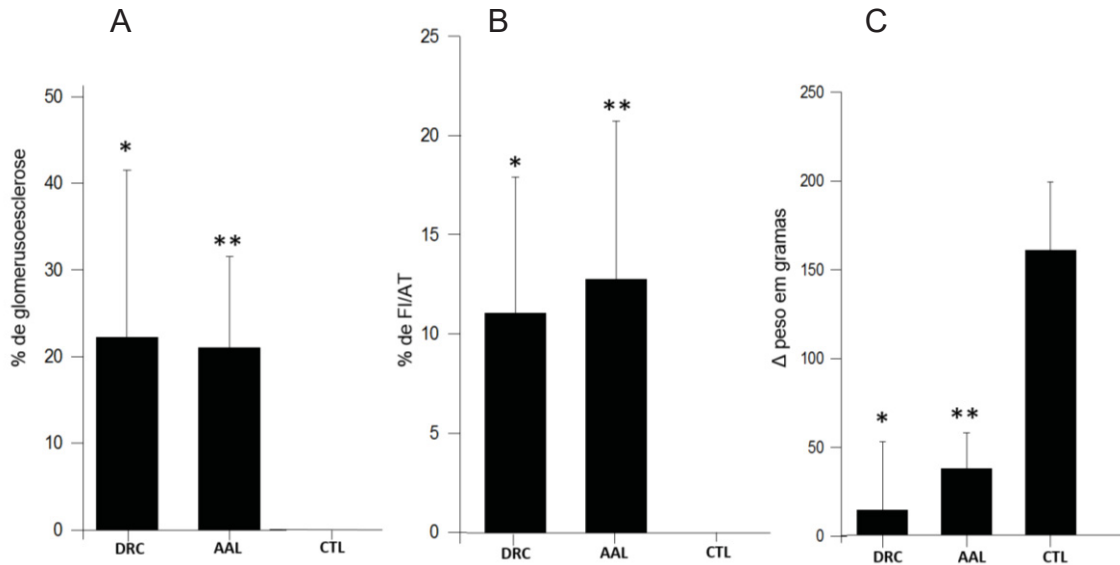


FONTE: O autor (2015).

Neste 3º lote de animais, nos testes sorológicos e de urina de função renal, apenas no teste de proteinúria (GRÁFICO 5A) o ácido lipoico apresentou uma diminuição da perda de proteínas plasmáticas pela urina (GRÁFICO 5). Porém não ocorrendo para ureia e creatinina plasmáticas, GE e FI/AT e variação de massa corpórea (GRÁFICO 6) sugerindo que tal melhora na proteinúria possa ser um evento aleatório.

Nota-se neste caso que a creatinina (GRÁFICO 5.B) sérica apresentou-se dentro dos valores fisiológicos normais, sugerindo que o dano renal tenha sido menor neste 3º lote, evidenciando a grande variabilidade do modelo cirúrgico discutido anteriormente, em que animais nefrectomizados podem apresentar função renal muito similar a um animal saudável.

GRÁFICO 6 – RESULTADOS DE ANÁLISE HISTOLÓGICA SEMIQUANTITATIVA, E GANHO DE PESO CORPORAL DO 3º LOTE DE ANIMAIS 60 DIAS APÓS NEFRECTOMIA DE 5/6. **(A)**: PORCENTAGENS DE GLOMÉRULOESCLEROSE TOTAL E SEGMENTAR *p=0,001 vs. CTL. **p<0,05 vs. CTL. **(B)**: PORCENTAGEM DE FIBROSE INTERSTICIAL E FIBROSE INTERSTICIAL *p=0,001 vs. CTL. **p<0,001 vs. CTL. **(C)**: VARIAÇÃO DO GANHO DE PESO *p=0,001 vs. CTL. **p<0,001 vs. CTL. (DRC n=14): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6. (AAL n=9): GRUPO NEFRECTOMIA DE 5/6 COM TRATAMENTO ORAL COM α -AL. (CTL n=11): GRUPO CONTROLE LAPARATOMIZADO.



FONTE: O autor (2015).

Como foi discutido anteriormente, o modelo utilizado de nefrectomia de 5/6 possui muitas limitações, como a mais evidente a grande variação de resultados, gerando um desvio padrão grande para os grupos nefrectomizados. Isso acarretou neste estudo diferentes resultados das médias para os grupos nefrectomizados DRC de diferentes lotes, mesmo sendo aplicado o método cirúrgico de maneira idêntica nos diferentes lotes.

Porém, mesmo sendo negativos, tais resultados podem entrar em acordo com dados recentes da literatura acadêmica, os quais indicam que o α -LA pode não exercer um efeito antioxidante suficiente para ação renoprotetora (EI-NAKIB *et al*, 2013. SHOWKAT *et al*, 2014). Um desses estudos demonstrou que não houve redução do acúmulo de ureia e creatinina plasmáticas, assim como marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído e LDL oxidado e marcadores inflamatórios como IL-6 e TNF- α , em pacientes dialíticos tratados com 600mg/dia de ácido lipoico após hemodiálise, sugerindo que o ácido lipoico não é capaz de exercer função

antioxidante devido ao estado de extrema escassez de antioxidantes endógenos. Outro apontamento do estudo para o não efeito significativo do α -LA foi o pequeno número amostral por grupo ($n=22$), já discutido anteriormente (item 4.2). (EI-NAKIB *et al*, 2013).

Em outro estudo constatou que o α -LA não foi capaz de impedir o estresse oxidativo, medido pelo aumento de sanguíneo de malondialdeído, em pacientes dialíticos após administração de gluconato de sódio férrico, que tinha finalidade de combater o quadro anêmico por falta de ferro em que encontravam-se tais pacientes. O α -LA apresentou-se como um pró-oxidante em potencial, já que naquele ambiente oxidante, devido ao ferro livre e de inflamação, houve um aumento na quantidade de MDA plasmático após o tratamento com α -LA (SHOWKAT *et al*, 2014).

Em relação a doença renal crônica, o uso do α -LA pode-se dizer que ainda é controverso, existindo estudos que demonstram diversos efeitos antioxidantes para alguns parâmetros analisados e efeito de piora para outros. Por exemplo no estudo de Yu *et al*. (2012) em que tratou-se com α -LA 100mg/kg/dia ratos nefrectomizados em 5/6 por 8 semanas, houve melhora da microalbuminúria, conteúdo intracelular de GSH e vitamina E, paralelamente a aumento dos níveis de MDA plasmático, de pressão sanguínea diastólica e aumento de sinalização de inflamação por NF- κ B.

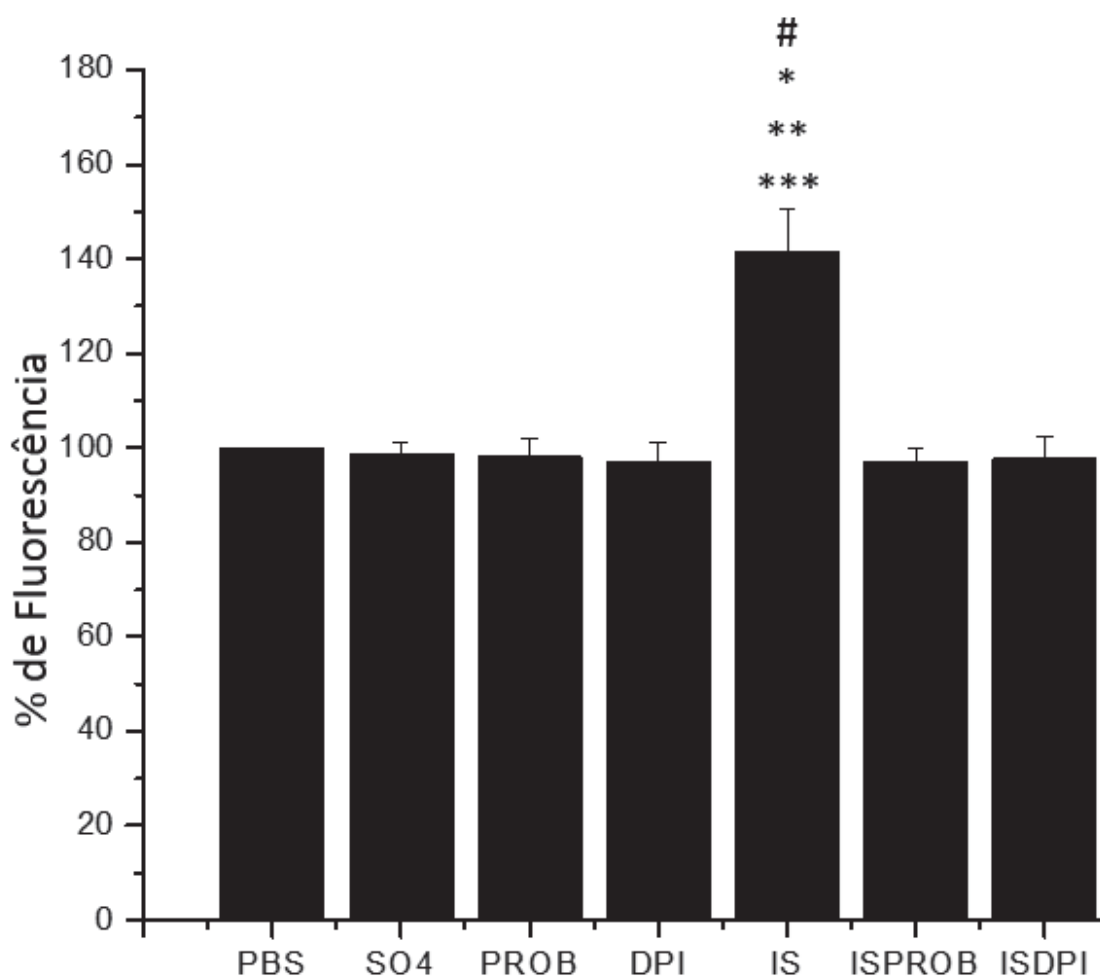
Deste modo, pode-se dizer que o efeito antioxidante do α -LA na doença renal crônica ainda é muito controversa, porém, com uma certa tendência a ser ineficaz segundo estudos com pacientes humanos com DRC.

3.4. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR SONDA FLUORESCENTE DICLOROFLUORESCEÍNA

Nesta análise, considerou-se a emissão de fluorescência basal como 100%. Como controle positivo do teste utilizou-se peróxido de hidrogênio. Tanto nos tempo de 10 minutos (GRÁFICO 7) e 60 minutos (GRÁFICO 8) após a exposição somente ao indoxil houve geração da EROs significativo. Com a inibição irreversível da enzima NADPH oxidase pelo DPI, e bloqueio do transportador OAT a intensidade de fluorescência foi a geração foi de mesma intensidade aos controles PBS e SO₄, demonstrando que a origem de tal espécie reativa é devido à ativação da enzima NADPH oxidase pelo IS. Bloqueando-se o transportador OAT com Probenecid, não

houve aumento na fluorescência, demonstrando que a entrada na célula desta toxina é via transportador OAT.

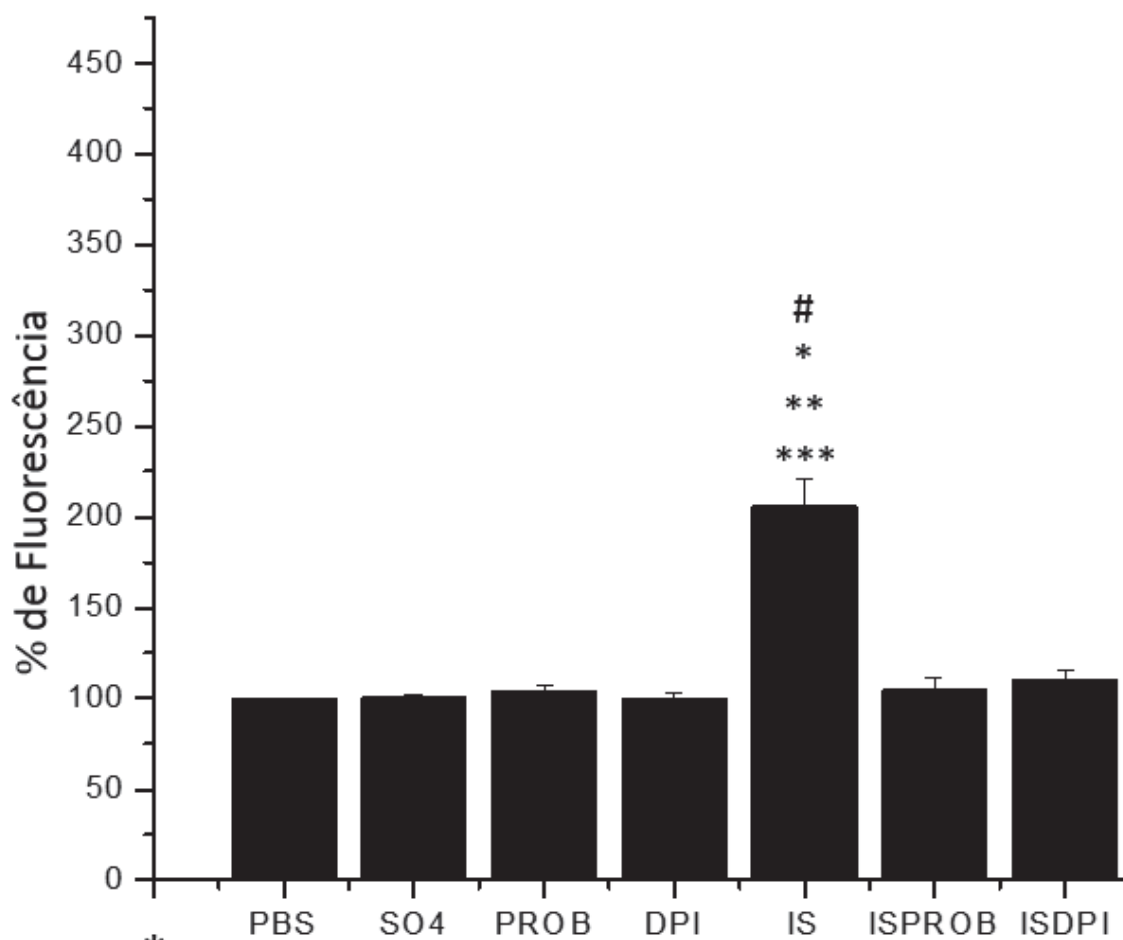
GRÁFICO 7 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULAR EM CÉLULA MESAGIAL POR ATIVIDADE NADPH OXIDASE 10 MINUTOS APÓS ADIÇÃO DE IS EM PBS. (PBS):CONTROLE. (SO4): SULFATO DE POTÁSSIO. (PROB): PROBENICID. (DPI): DIFENILENEIODÔNIO. (IS) INDOXIL SULFATO. (ISPROB): IS PRÉ-TRATADO COM PROB. (ISDPI): IS PRÉ-TRATADO COM DPI. *P<0,05 VS PBS. **P<0,05 VS SO4. ***P<0,05 VS ISPRO. #P<0,05 VS ISDPI. OS VALORES DE CADA COLUNA SÃO RESPECTIVAS A MÉDIA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES, SENDO CADA AMOSTRAS FEITA EM QUADRUPLICATA.



FONTE: O autor (2015).

GRÁFICO 8 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULAR EM CÉLULA MESAGIAL POR ATIVIDADE NADPH OXIDASE 60 MINUTOS APÓS ADIÇÃO DE IS EM PBS.

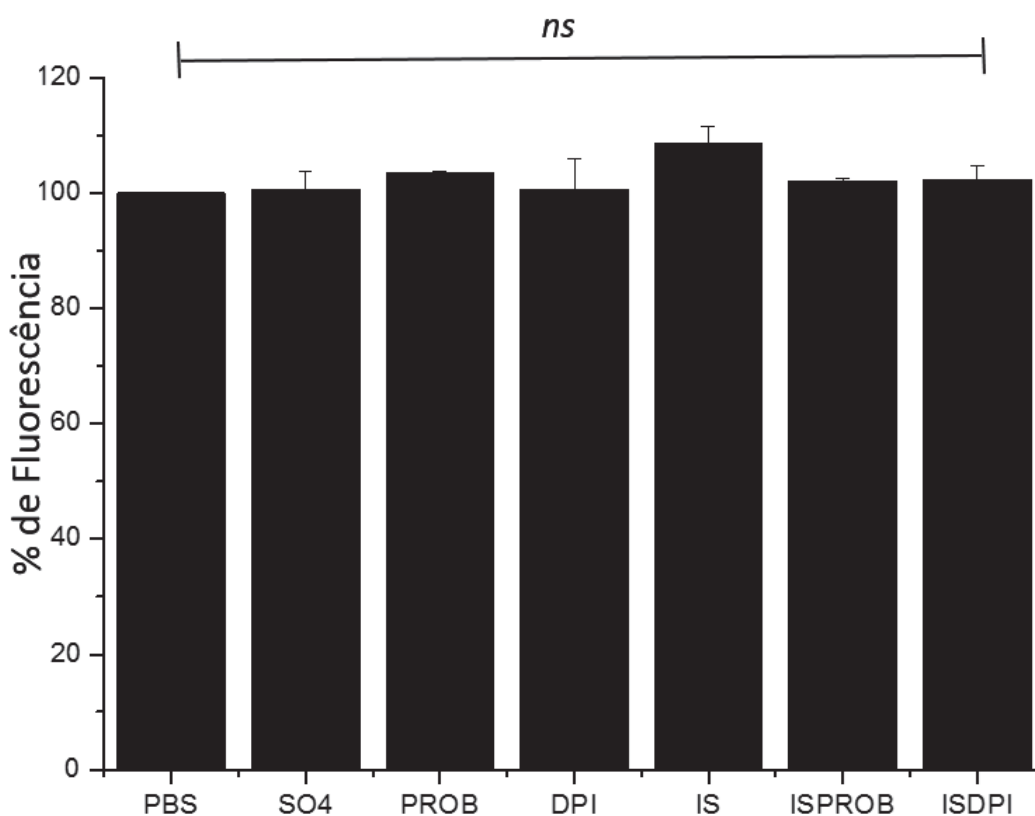
(PBS):CONTROLE. (SO4): SULFATO DE POTÁSSIO. (PROB): PROBENICID. (DPI): DIFENILENEIODÔNIO. (IS) INDOXIL SULFATO. (ISPROB): IS PRÉ-TRATADO COM PROB. (ISDPI): IS PRÉ-TRATADO COM DPI. *P<0,05 VS PBS. **P<0,05 VS SO4. ***P<0,05 VS ISPRO. #P<0,05 VS ISDPI. OS VALORES DE CADA COLUNA SÃO RESPECTIVAS A MÉDIA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES, SENDO CADA AMOSTRA FEITA A EM QUADRUPLICATA.



FONTE: O autor (2015).

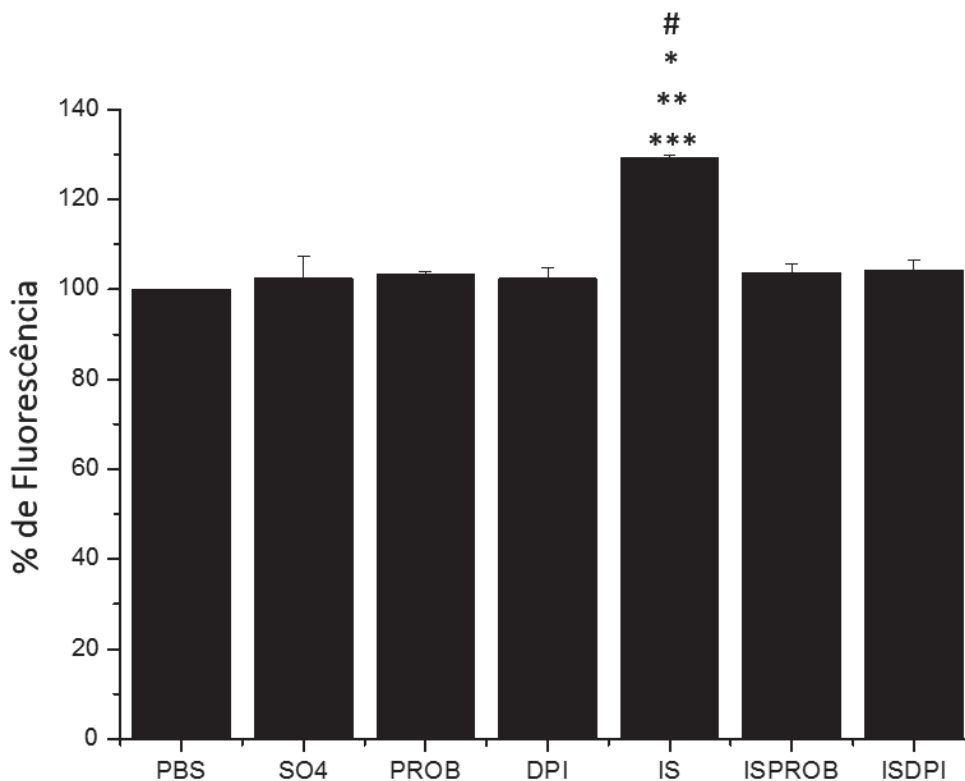
Nos resultados contendo SFB com exposição do IS por 10 minutos (GRÁFICO 9) mostram que não houve aumento de fluorescência devido a ligação do IS com a albumina plasmática do soro fetal bovino. Porém como IS apresenta-se 90% ligado na albumina sérica, sendo apenas 10% permanece livre na solução, disponível para entrada na célula. Com isso, em 60 minutos (GRÁFICO 10), observou-se um aumento na fluorescência, porém menos intenso que na ausência de SFB.

GRÁFICO 9 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULAR EM CÉLULA MESAGIAL POR ATIVIDADE NADPH OXIDASE 10 MINUTOS APÓS ADIÇÃO DE IS EM TAMPÃO COM 10% SFB. (PBS): CONTROLE. (SO4): SULFATO DE POTÁSSIO. (PROB): PROBENICID. (DPI): DIFENILENEIODÔNIO. (IS) INDOXIL SULFATO. (ISPROB): IS PRÉ-TRATADO COM PROB. (ISDPI): IS PRÉ-TRATADO COM DPI. OS VALORES DE CADA COLUNA SÃO RESPECTIVAS A MÉDIA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES, SENDO CADA AMOSTRAS FEITA EM QUADRUPPLICATA.



FONTE: O autor (2015).

GRÁFICO 10 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULAR EM CÉLULA MESAGIAL POR ATIVIDADE NADPH OXIDASE 60 MINUTOS APÓS ADIÇÃO DE IS EM PBS. (PBS): TAMPÃO FOSFATO SALINO. (SO4): SULFATO DE POTÁSSIO. (PROB): PROBENICID. (DPI): DIFENILENEIODÔNIO. (IS) INDOXIL SULFATO. (ISPROB): IS PRÉ-TRATADO COM PROB. (ISDPI): IS PRÉ-TRATADO COM DPI. *P<0,05 VS PBS. **P<0,05 VS SO4. ***P<0,05 VS ISPRO. #P<0,05 VS ISDPI. OS VALORES DE CADA COLUNA SÃO RESPECTIVAS A MÉDIA DE 3 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES, SENDO CADA AMOSTRA FEITA A EM QUADRUPPLICATA.



FONTE: O autor (2015).

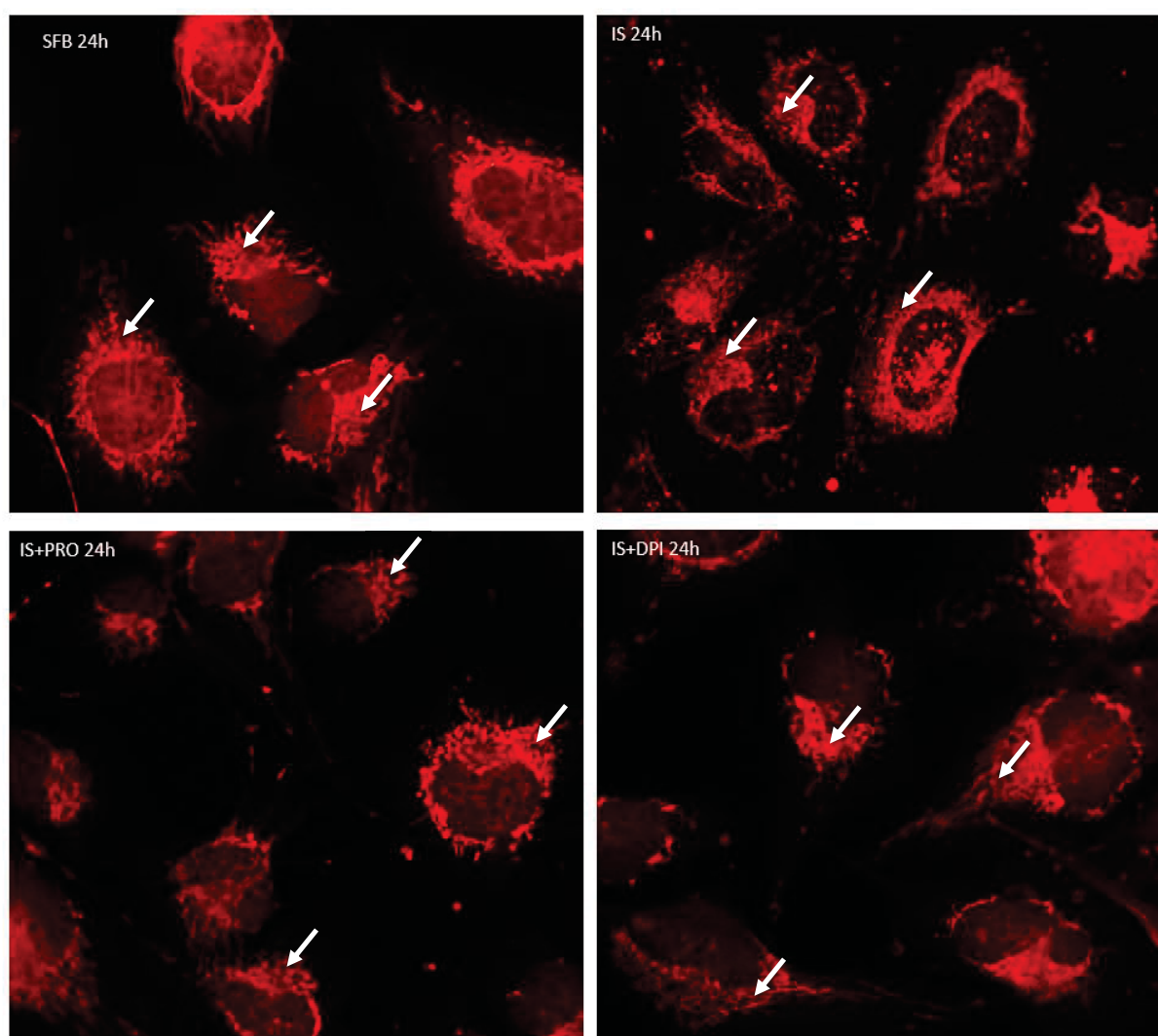
3.5. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE FISSÃO/FUSÃO MITOCONDRIAL

A análise da fissão mitocondrial fez-se de maneira qualitativa, ou seja, observando as alterações na estrutura mitocondrial. No tempo de 24h (FIGURA 5) notou-se que as células que estavam em contato com IS apresentavam mitocôndrias mais fragmentadas e dispersas no citoplasma da célula, comparando com o controle SFB, onde é possível observar estruturas tubulares mitocondriais. O fenômeno é melhor observado em detalhe (FIGURA 6). No item 4.4 foi observado que o DPI e Probenecid inibem a geração de EROs intracelular, assim, era esperado que também possuísem efeito na dinâmica mitocondrial, demonstrando que a morfologia

mitocondrial pelo IS quando tratando com tais inibidores não foi alterada como em IS24h (FIGURA 6).

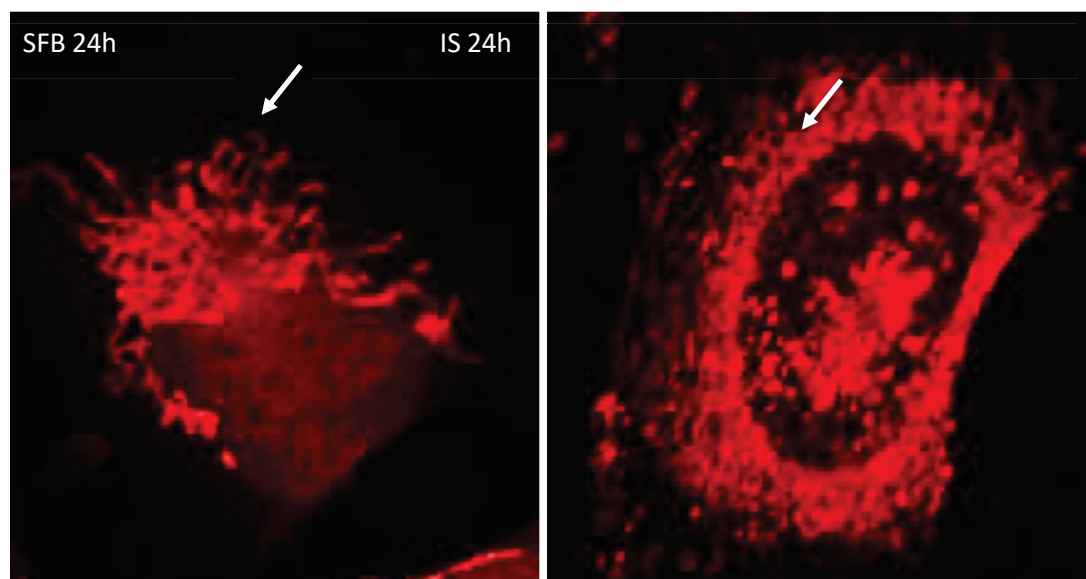
Deste modo, pode-se dizer que a fissão mitocondrial neste modelo parece ser induzida por IS. Este experimento foi realizado duas vezes independentemente, obtendo-se o mesmo resultado.

FIGURA 8 – DINÂMICA MITOCONDRIAL DA CÉLULA MESANGIAL FRENTE A EXPOSIÇÃO AO INDOXIL SULFATO POR 24 HORAS. SETAS BRANCAS INDICAM MITOCONDRIAS. (SFB 24h): CONTROLE. (IS 24h): INDOXIL SULFATO. (IS+PROB 24h): INDOXIL SULFATO COM PROBENICID. (IS+DPI 24h): INDOXIL SULFATO + DIFENILENEIODÔNIO



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 9 - CÉLULAS DA ÁREA CENTRAL FORAM AUMENTADAS EM DETALHE. SETAS BRANCAS INDICAM MITOCONDRIAS (SFB 24h); CONTROLE. (IS 24h); INDOXIL SULFATO.



FONTE: O autor (2015).

4. CONCLUSÃO

Como base nos resultados apresentados dos animais em que com quadro de uremia e glomeruloesclerose estavam presentes, concluiu-se o ácido alfa lipoico não exerceu um efeito renoprotetor significativo em tais animais, pois em nenhum parâmetro analisado houve efeito de diminuição da progressão da doença renal crônica.

Sobre os resultados do modelo *in vitro* com células mesangiais conclui-se que o indoxil sulfato é um agente pró-oxidante. Sua entrada nas células depende de transportador de ânions orgânicos na membrana celular, e como consequência dessa entrada, ocorre a geração EROs, que é dependente da enzima NADPH oxidase presente ativamente no citoplasma. O IS também foi capaz de a fissão mitocondrial.

Tais resultados *in vitro* são uma boa premissa para realização de estudos futuros sobre os impactos ainda não descritos da toxina urêmica do IS nas CM, quantificação a como é a fissão mitocondrial e as suas consequências para a célula.

5. REFERÊNCIAS

AIRES, MARGARIDA M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

AMOM, Z., ZAKARIA, Z., MOHAMED, J., AZLAN, A., BAHARI, H., TAUFIK HIDAYAT BAHARULDIN, M., ARIS MOKLAS, M., OSMAN, K., ASMAWI, Z. & KAMAL NIK HASSAN, M. (2008) Lipid lowering effect of antioxidant alpha-lipoic Acid in experimental atherosclerosis. **J Clin Biochem Nutr**, 43, 88-94.

AVELES, P. R., CRIMINACIO, C. R., GONCALVES, S., BIGNELLI, A. T., CLARO, L. M., SIQUEIRA, S. S., NAKAO, L. S. & PECOITS-FILHO, R. (2010) Association between Biomarkers of Carbonyl Stress with Increased Systemic Inflammatory Response in Different Stages of Chronic Kidney Disease and after Renal Transplantation. **Nephron Clin Pract**, 116, c294-c299.

BANAS B. *et al*, (1999). Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. **J Am Soc Nephrol**. (11):2314-22.

BARRETO, FELYPE CARVALHO *et al*. Em busca de uma melhor compreensão da doença renal crônica: uma atualização em toxinas urêmicas. **J. Bras. Nefrol**. [online]. 2014, vol.36, n.2, pp. 221-235.

BEREITER-HAHN J, VÖTH M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. **Microsc Res Tech**. 15;27(3):198-219.

BERKSON, B. M., RUBIN, D. M. & BERKSON, A. J. (2009) Revisiting the ALA/N (alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone) protocol for people with metastatic and nonmetastatic pancreatic cancer: a report of 3 new cases. **Integr Cancer Ther**, 8, 416-422.

BILSKA, A. & WLODEK, L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep*, 57, 570-577. Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. 414 (6865):813-20.

BLANCO RA, ZIEGLER TR, CARLSON BA, CHENG PY, PARK Y, COTSONIS GA, ACCARDI CJ, JONES DP. (2007) Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma. **Am J Clin Nutr**. 86(4):1016-23

BOLATI D1, SHIMIZU H, YISIREYILI M, NISHIJIMA F, NIWA T. (2013). Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF-κB. **BMC Nephrol** 4;14:56.

BRADFORD, MARION M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**. 72:248-54.

BRENNER, BARRY M. RECTOR, FLOYD C. **Brenner & Rector's the kidney**. Philadelphia: Elsevier, 2012.

BRUNET P, GONDOUIN B, DUVAL-SABATIER A, DOU L, CERINI C, DIGNAT-GEORGE F, JOURDE-CHICHE N, ARGILES A, BURTEY S. (2011) Does uremia cause vascular dysfunction? **Kidney Blood Press Res.** 34(4):284-90.

BUDISAVLJEVIC, M. N., HODGE, L., BARBER, K., FULMER, J. R., DURAZO-ARVIZU, R. A., SELF, S. E., KUHLMANN, M., RAYMOND, J. R. & GREENE, E. L. (2003) Oxidative stress in the pathogenesis of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. **Am J Physiol Renal Physiol**, 285, F1138-1148.

CAYLAK, E., AYTEKIN, M. & HALIFEOGLU, I. (2008) Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. **Exp Toxicol Pathol**, 60, 289-294.

CHEN WT., HUNG KC., WEN MS., HSU PY., CHEN TH., WANG HD., FANG JT., SHIE SS., WANG CY. (2013) Impaired Leukocytes Autophagy in Chronic Kidney Disease Patients. **Cardiorenal Med.** 3 (4):254-64.

CHEVALIER, R. L., B. A. THORNHILL, *ET AL.* (2010) Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. **Pediatr Nephrol**, v.25, n.4, p.687-97.

CHO KH, KIM HJ, RODRIGUEZ-ITURBE B, VAZIRI ND. (2009) Niacin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and hypertension in rats with chronic renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol.** 297(1):F106-13.

CLERMONT, G., LECOURE, S., LAHET, J., SIOHAN, P., VERGELY, C., CHEVET, D., RIFLE, G. & ROCHETTE, L. (2000) Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. **Cardiovasc Res**, 47, 618-623.

CREMER D.R, RABELER R, ROBERTS A, LYNCH B. (2006) Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). **regul Toxicol Pharmacol.** 46(1):29-41.

DI MARCO GS, HAUSBERG M, HILLEBRAND U, RUSTEMEYER P, WITTKOWSKI W, LANG D, PAVENSTÄDT H (2008) Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. **Am J Physiol Renal Physiol.** 294(6): F1381-1387.

DOU L, JOURDE-CHICHE N, FAURE V, CERINI C, BERLAND Y, DIGNAT-GEORGE F, BRUNET P. (2007) The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. **J Thromb Haemost.** 5(6): 1302-1308.

ELANGOVAN, S. & HSIEH, T. C. (2008) Control of cellular redox status and upregulation of quinone reductase NQO1 via Nrf2 activation by alpha-lipoic acid in human leukemia HL-60 cells. **Int J Oncol**, 33, 833-838.

ELLMAN G.L. TISSUE SULFHYDRYL GROUPS. (1959) **Arch. Biochem. Biophys.** doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

EL-NAKIB G, MOSTAFA T, ABBAS T, EL-SHISHTAWY, MABROUK M, SOBH M. (2013) Role of alpha-lipoic acid in the management of anemia in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, 6, 161–168.

FUJIHARA CK, ANTUNES GR, MATTAR AL, MALHEIROS DM, VIEIRA JM JR, ZATZ R. (2007) Chronic inhibition of nuclear factor-kappa B attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. **Am J Physiol Renal Physiol**. 292(1):F92-99.

FUJIHARA CK, DE NUCCI G & ZATZ, R. (1995) Chronic nitric oxide synthase inhibition aggravates glomerular injury in rats with subtotal nephrectomy. **J Am Soc Nephrol**, 5, 1498-1507.

GALLI F, Ghibelli L, BUONCRISTIANI U, BORDONI V, D'INTINI V, BENEDETTI S, CANESTRARI F, RONCO C, FLORIDI A. (2003) Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. **Nephrol Dial Transplant**. 18(8): 1592-1600.

GELASCO AK, RAYMOND JR. (2006) Indoxyl sulfate induces complex redox alterations in mesangial cells. **Am J Physiol Renal Physiol**. 290(6):F1551-8.

GORACA, A. & JOZEFOWICZ-OKONKWO, G. (2007) Protective effects of early treatment with lipoic acid in LPS-induced lung injury in rats. **J Physiol Pharmacol**, 58, 541-549.

GUILGEN G, WERNECK ML, DE NORONHA L, MARTINS AP, VARELA AM, NAKAO LS, PECOITS-FILHO R (2011) Increased Calcification and Protein Nitration in Arteries of Chronic Kidney Disease Patients. **Blood Purif**. 32, 296-302.

GUYTON, A. HALL, J. **Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica**. Tradução de Alcides Marinho Junior *et al*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAGER K, KENKLIES M, MCAFOOSE, J., ENGEL, J. & MUNCH, G. (2007) Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer's disease--a 48 months follow-up analysis. **J Neural Transm Suppl**, 189-193.

HAN, D., HANDELMAN, G., MARCOCCI, L., SEN, C. K., ROY, S., KOBUCHI, H., TRITSCHLER, H. J., FLOHE, L. & PACKER, L. (1997) Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. **Biofactors**, 6, 321-338.

HARTLEBEN B, GÖDEL M, MEYER-SCHWESINGER C, LIU S, ULRICH T, KÖBLER S, WIECH T, GRAHAMMER F, ARNOLD SJ, LINDENMEYER MT, COHEN CD, PAVENSTÄDT H, KERJASCHKI D, MIZUSHIMA N, SHAW AS, WALZ G, HUBER TB. (2010) Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. **J Clin Invest**. 120(4):1084-96

HAYES JD, CHANAS SA, HENDERSON CJ, MCMAHON M, SUN C, MOFFAT GJ, WOLF CR, YAMAMOTO M (2000). The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their

induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. **Biochem. Soc. Trans.** 28 (2): 33–41

HIMMELFARB, J. (2009) Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. **Semin Dial**, 22, 636-643.

HIMMELFARB, J., STENVINKEL, P., IKIZLER, T. A. & HAKIM, R. M. (2002) The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. **Kidney Int**, 62, 1524-1538.

HOSTETTER TH, OLSON JL, RENNKE HG, VENKATACHALAM MA, BRENNER BM. (2001) Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **J Am Soc Nephrol**. 12(6):1315-25.

JOHNSEN-SORIANO, S., GARCIA-POUS, M., ARNAL, E., SANCHO-TELLO, M., GARCIA-DELPECH, S., MIRANDA, M., BOSCH -MORELL, F., DIAZ -LLOPIS, M., NAVEA, A. & ROMERO, F. J. (2008) Early lipoic acid intake protects retina of diabetic mice. **Free Radic Res**, 42, 613-617.

JONES, D. P. (2006) Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, 8, 1865-1879.

JONES, D.P & LIANG, Y. (2009) Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. **Free Radical Biology & Medicine** 47,1329–1338.

KARAMOUZIS, I., SARAFIDIS, P. A., KARAMOUZIS, M., ILIADIS, S., HAIDICH, A. B., SIOULIS, A., TRIANTOS, A., VAVATSI-CHRISTAKI, N. & GREKAS, D. M. (2008) Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. **Am J Nephrol**, 28, 397-404.

KASSIOTIS C1, BALLAL K, WELLNITZ K, VELA D, GONG M, SALAZAR R, FRAZIER OH, TAEGTMEYER H. (2009). Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. **Circulation**. 120(11 SUPPL):S191-7.

K/DOQI. (2002) Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. **Am J Kidney Dis**;39(suppl):S1-S246

KIM H, KIM HJ, LEE K, KIM JM, KIM HS, KIM JR, HA CM, CHOI YK, LEE SJ, KIM JY, HARRIS RA, JEONG AD, LEE IK. (2012) -Lipoic acid attenuates vascular calcification via reversal of mitochondrial function and restoration of Gas6/Axl/Akt survival pathway. **J Cell Mol Med**.16 (2):273-86.

KIM, H. J. & VAZIRI, N. D. (2010) Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol**, 298, F662-671.

KOYA, D., HAYASHI, K., KITADA, M., KASHIWAGI, A., KIKKAWA, R. & HANEDA, M. (2003) Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. **J Am Soc Nephrol**, 14, S250-253.

KUNT, T., FORST, T., WILHELM, A., TRITSCHLER, H., PFUETZNER, A., HARZER, O., ENGELBACH, M., ZSCHAEBITZ, A., STOFFT, E. & BEYER, J. (1999) Alpha-lipoic acid reduces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelial adhesion of human monocytes after stimulation with advanced glycation end products. **Clin Sci** (Lond), 96, 75-82.

LEE JM, JOHNSON JA. (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **J Biochem Mol Biol**. 37(2):139-43.

LEVEY AS, CORESH J. (2012) Chronic kidney disease. **Lancet**. 379 (9811):165-80.

LEVEY, A. S. & EKNOYAN, G. (1999) Cardiovascular disease in chronic renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, 14, 828-833.

LISOWSKA-MYJAK B.(2014) Uremic toxins and their effects on multiple organ systems. **Nephron Clin Pract**. 128(3-4):303-11.

LIU ZC, CHOW KM, CHANG TM. (2003). Evaluation of two protocols of uremic rat model: partial nephrectomy and infarction. **Ren Fail**. 25(6):935-43.

LOCATELLI, F., CANAUD, B., ECKARDT, K. U., STENVINKEL, P., WANNER, C. & ZOCCALI, C. (2003) Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant**, 18, 1272-1280.

MELNYK, S., POGRIBNA, M., POGRIBNY, I., HINE, R. J. & JAMES, S. J. (1999) A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma amino thiols using coulometric electrochemical detection. **J Nutr Biochem**, 10, 490-497.

MIGNINI F, NASUTI C, GIOVENTU G, NAPOLIONI V, MARTINO PD. (2012) Human Bioavailability and Pharmacokinetic Profile of Different Formulations Delivering Alpha Lipoic Acid. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, 1(8) 1-7.

MUTELIEFU G, SHIMIZU H, ENOMOTO A, NISHIJIMA F, TAKAHASHI M, NIWA T. (2012) Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21 and prelamin A through oxidative stress. **Am J Physiol Cell Physiol**. 303(2) 126-34.

NEUMANN CA, CAO J, AND MANEVICH Y (2009). Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. **Cell Cycle** 8 (24): 4072–8.

NIWA T. (2010) Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. **J Ren Nutr**. 20(5 Suppl):S2-6.

OWADA S, MAEBA T, SUGANO Y, HIRAYAMA A, UEDA A, NAGASE S, GOTO S, NISHIJIMA F, BANNAI K, YAMATO H. (2010) Spherical carbon adsorbent (AST-120) protects deterioration of renal function in chronic kidney disease rats through inhibition of reactive oxygen species production from mitochondria and reduction of serum lipid peroxidation. **Nephron Exp Nephrol**. 115(4):e101-11.

PACKER, L., WITT, E. H. & TRITSCHLER, H. J. (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic Biol Med**, 19, 227-250.

QUIJANO C, CASTRO L, PELUFFO G, VALEZ V, RADI R (2007). ENHANCED MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE IN HYPERGLYCEMIC ENDOTHELIAL CELLS: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 293(6): H3404-3414.

RHEE EP, THADHANI R. (2011) New insights into uremia-induced alterations in metabolic pathways. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 20(6):593-8.

RODRIGUES SD, BATISTA G, INGBERMAN M, PECOITS-FILHO R, NAKAO, LS. Plasma cysteine/cystine reduction potential correlates with plasma creatinine levels in chronic kidney disease. (2012). **Blood Purif**. 34(3-4) 231-7.

RODRIGUES S.D, FRANÇA K.C, DALLIN F.T, FUJIHARA C.K, NASCIMENTO A.J, PECOITS-FILHO R., NAKAO L.S (2015) N-acetylcysteine as a potential strategy to attenuate the oxidative stress induced by uremic serum in the vascular system. *Life Sci*. 15;121:110-6

SALINTHONE, S., SCHILLACE, R. V., MARRACCI, G. H., BOURDETTE, D. N. & CARR, D. W. (2008) Lipoic acid stimulates cAMP production via the EP2 and EP4 prostanoid receptors and inhibits IFN gamma synthesis and cellular cytotoxicity in NK cells. **J Neuroimmunol**, 199, 46-55.

SANTOS M. R. V. SOUZA V. H. MENEZES I. A. C. BITENCURT J. L. REZENDE-NETO J. M. BARRETO A. S. CUNHA F. A. MARÇAL R. M. TEIXEIRA-SILVA F. QUÍNTANS-JÚNIOR L. J. BARBOSA A. P. O. (2010) Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena** 6(10)

SERRADELL M, DÍAZ-RICART M, CASES A, ZURBANO MJ, LÓPEZ-PEDRET J, ARRANZ O, ORDINAS A, ESCOLAR G (2002). Uremic medium causes expression, redistribution and shedding of adhesion molecules in cultured endothelial cells. **Haematologica**. 87(10): 1053-1061.

SHAY, K. P., MOREAU, R. F., SMITH, E. J., SMITH, A. R. & HAGEN, T. M. (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochim Biophys Acta**, 1790, 1149-1160.

SHIMIZU H, BOLATI D, HIGASHIYAMA Y, NISHIJIMA F, SHIMIZU K, NIWA T. (2012) Indoxyl sulfate upregulates renal expression of MCP-1 via production of ROS and activation of NF- κ B, p53, ERK, and JNK in proximal tubular cells. **Life Sci**. 90(13-14):525-30.

SHIMIZU, M. H., COIMBRA, T. M., DE ARAUJO, M., MENEZES, L. F. & SEGURO, A. C. (2005) N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. **Kidney Int**, 68, 2208-2217.

SHOWKAT A, BASTNAGEL W. R., HUDSON J.Q (2014) Effect of α -Lipoic Acid on Oxidative Stress in End-Stage Renal Disease Patients Receiving Intravenous Iron. **ISRN Nephrol.** 634515.

SINGH D, KAUR R, CHANDER V, CHOPRA K.(2006) Antioxidants in the prevention of renal disease. **J Med Food.** 9(4):443-50.

SILVA, FRED G., *et al.* **Silva's Diagnostic Renal Pathology.** New York: Cambridge University Press, 2009.

SOLIS WA, DALTON TP, DIETER MZ, FRESHWATER S, HARRER JM, HE L, SHERTZER HG, NEBERT DW (2002). Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. **Biochem. Pharmacol.** 63 (9): 1739–54.

TANKOVA, T., KOEV, D. & DAKOVSKA, L. (2004) Alpha -lipoic acid in the treatment of autonomic diabetic neuropathy (controlled, randomized, open-label study). **Rom J Intern Med**, 42, 457-464.

TEICHERT, J., HERMANN, R., RUUS, P. & PREISS, R. (2003) Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. **J Clin Pharmacol**, 43, 1257-1267.

TEICHERT, J., TUEMMERS, T., ACHENBACH, H., PREISS, C., HERMANN, R., RUUS, P. & PREISS, R. (2005) Pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. **J Clin Pharmacol**, 45, 313-328.

TOWNS R1, KABEYA Y, YOSHIMORI T, GUO C, SHANGGUAN Y, HONG S, KAPLAN M, KLIONSKY DJ, WILEY JW. (2005) Sera from patients with type 2 diabetes and neuropathy induce autophagy and colocalization with mitochondria in sy5y cells. **Autophagy.** 1(3):163-70

VANASCO, V., CIMOLAI, M. C., EVELSON, P. & ALVAREZ, S. (2008) The oxidative stress and the mitochondrial dysfunction caused by endotoxemia are prevented by alpha-lipoic acid. **Free Radic Res**, 42, 815-823.

KIM HJ1, VAZIRI ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol** 298(3):F662-71.

VALLIANOU, N., EVANGELOPOULOS, A., & KOUTALAS, P. (2009). Alpha-Lipoic Acid and Diabetic Neuropathy. **The Review of Diabetic Studies.** 6(4), 230–236.

VAZIRI ND, NI Z, OVEISI F, LIANG K, PANDIAN R. (2002) Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. **Hypertension.** 39(1):135-41.

VAZIRI ND. (2004) Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. **Semin Nephrol.** 24(5): 469-73.

VENUGOPAL R, JAISWAL AK (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 93 (25)

VLISSARA H, TORREGGIANI M, POST JB, ZHENG F, URIBARRI J, STRIKER GE. (2009) Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. **Kidney Int Suppl.** 114:S3-11.

WANG W, WANG Y, LONG J, WANG J, HAUDEK SB, OVERBEEK P, CHANG BH, SCHUMACKER PT, DANESH FR. (2012) Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. **Cell Metab.** 15(2):186-200.

WESTERMANN B. (2012) Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochim Biophys Acta.** 1817(10) 1833-8

WHITEMAN, M., DOGRA, Y., WINYARD, P. G. & ARMSTRONG, J. S. (2008) Detection and measurement of reactive oxygen intermediates in mitochondria and cells. **Methods Mol Biol**, 476, 29-50.

WINIARSKA, K., MALINSKA, D., SZYMANSKI, K., DUDZIAK, M. & BRYLA, J. (2008) Lipoic acid ameliorates oxidative stress and renal injury in alloxan diabetic rabbits. **Biochimie**, 90, 450-459.

WOLLIN SD, JONES PJH. (2003) Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition** 133 (11). 3327-3330

YI, X. & MAEDA, N. (2006) alpha-Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E-deficient mice fed high-fat/low-cholesterol diet. **Diabetes**, 55, 2238-2244.

YOON JW, PAHL MV, VAZIRI ND. (2007) Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. **Kidney Int.** 71(2):167-72.

YOULE RJ, KARBOWSKI M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 6(8):657-63. Yu T,



YU X, LIU H, ZOU J, ZHU J, XU X, DING X. (2012) Oxidative Stress in 5/6 Nephrectomized Rat Model: Effect of Alpha-Lipoic Acid. **Ren Fail.** 34(7):907-14

ZAJA, IVAN *et al.*(2014) Cdk1, PKC δ and calcineurin-mediated Drp1 pathway contributes to mitochondrial fission-induced cardiomyocyte death. **Biochem Biophys Res Commu**, 453(4):710-21.

ZIEGLER, D. (2004) Thioctic acid for patients with symptomatic diabetic polyneuropathy: a critical review. **Treat Endocrinol**, 3, 173-189.

6. ANEXOS

6.1. ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

 <p>UFPR UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</p>	<p>Ministério da Educação UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Setor de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)</p>	
		<p>Nº 692</p>
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, CERTIFICA que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
<p>CERTIFICATION</p>		
<p>The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
<p>PROCESSO: 23075.014112/2013-01</p>	<p>APROVADO: 23/05/2013 – R.O. 04/2013</p>	
<p>TÍTULO: Mecanismos antioxidantes da ação renoprotetora do ácido alfa-lipóico (ALA) no modelo experimental de nefrectomia de 5/6</p>		
<p>AUTORES: Lia Sumie Nakao, Fernando Tonholi Dal Lin, Leticia Baby Couto, Susan Amaral, Aline Hauser</p>		
<p>DEPARTAMENTO: Patologia Básica</p>		
		 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio Coordenador da CEUA