



Universidade Federal de Pernambuco
Curso de Graduação em Biomedicina

VALÉRIA BIANCA DE SOUZA SANTOS

**EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO
PARAQUAT NAS ATPASES TRANSPORTADORAS DE
SÓDIO E CÁLCIO DO TECIDO CARDÍACO DE RATOS**

Recife

2022

VALÉRIA BIANCA DE SOUZA SANTOS

**Efeitos do estresse oxidativo induzido pelo paraquat nas
ATPases transportadoras de sódio e cálcio do tecido
cardíaco de ratos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Leucio Duarte Vieira Filho

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Souza Santos, Valéria Bianca de.

Efeitos do estresse oxidativo induzido pelo paraquat nas ATPases transportadoras de sódio e cálcio do tecido cardíaco de ratos / Valéria Bianca de Souza Santos. - Recife, 2022.

41 p. : il., tab.

Orientador(a): Leucio Duarte Vieira Filho

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. Estresse Oxidativo. 2. Coração. 3. ATPases. 4. Síndrome Cardiorrenal. I. Vieira Filho, Leucio Duarte . (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

Universidade Federal de Pernambuco
Curso de Graduação em Biomedicina

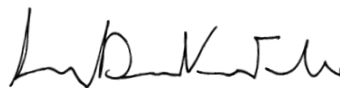
VALÉRIA BIANCA DE SOUZA SANTOS

**EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO PARAQUAT
NAS ATPASES TRANSPORTADORAS DE SÓDIO E CÁLCIO DO
TECIDO CARDÍACO DE RATOS**

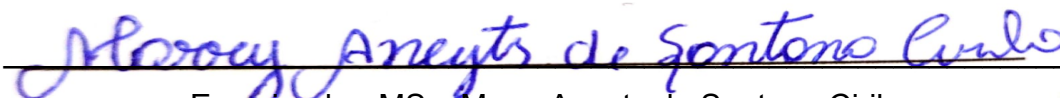
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 29/06/2022

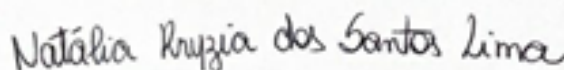
BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE



Examinador: MSc. Marry Aneyts de Santana Cirilo
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE



Examinador: MSc. Natália Kryzia dos Santos Lima
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder saúde e por ter me dado forças para continuar lutando por meus objetivos.

Agradeço a toda minha família, especialmente a minha querida mãe, por me amparar emocionalmente em todos os momentos, e aos meus irmãos, Lilianny e Jônatas, por serem meus melhores amigos e companheiros de estudos e da vida, além de serem pessoas que me inspiro e tenho muito orgulho.

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho, por toda paciência e todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional, por sua relevância em minha formação como pesquisadora e pela oportunidade de fazer parte do laboratório.

Agradeço aos meus amigos da graduação, por compartilharmos todos os momentos de alegria e tristeza, por todas as palavras de incentivo que sempre trocamos e por todas as experiências pessoais e profissionais divididas.

Agradeço a todos que fazem parte do LFPR por todo conhecimento que é compartilhado, por toda ajuda mútua nos experimentos e pela contribuição neste trabalho. Obrigada também pelo café e pela ótima convivência.

Agradeço a universidade Federal de Pernambuco e a todo corpo docente do curso de Biomedicina, por todo conhecimento ensinado e agradeço também a todos os funcionários, que de alguma forma com a sua prestação de serviço auxiliaram em meu desenvolvimento ao longo dos anos.

Agradecimentos aos integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente me apoiaram e fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

***“Uma grande descoberta não surge do
cérebro de um cientista já pronta, é fruto de
um acúmulo de trabalho preliminar”.***

(Marie Skłodowska-Curie)

SOUZA SANTOS, Valéria Bianca de. **Efeitos do estresse oxidativo induzido pelo Paraquat nas ATPases transportadoras de Sódio e Cálcio do tecido cardíaco de ratos**. 2020. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

O processo de contração-relaxamento muscular cardíaco é garantido pelo movimento do Ca^{2+} entre o citosol, retículo sarcoplasmático e fluido extracelular, que é influenciado pelas ATPases transportadoras de Na^+ e Ca^{2+} . O estresse oxidativo é um componente fisiopatológico extremamente importante na disfunção cardíaca, contudo ainda é pouco conhecido o impacto das espécies reativas do oxigênio na atividade das ATPases cardíacas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto da produção de espécies reativas do oxigênio induzida pelo Paraquat na função de ATPases cardíacas transportadoras de Na^+ e Ca^{2+} . Ratos Wistar machos adultos foram submetidos à administração intraperitoneal de paraquat ou NaCl 0,9%. Parte do grupo tratado com Paraquat recebeu administração do antioxidante tempol anteriormente à administração de paraquat. Os ratos foram alocados em gaiola metabólica por um período de 24 horas para avaliação do consumo dietético e hídrico e para coleta de urina. Após esse período, a pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca foram avaliadas através da pletismografia de cauda e, posteriormente, os ratos foram submetidos à coleta de sangue via aorta abdominal e a retirada do ventrículo esquerdo. Em 24h o paraquat induziu um menor consumo de alimento (65%, $P<0,001$) e de água (28%, $P<0,05$) e duas vezes maior diurese ($P<0,01$) e 10% de elevação ($P<0,05$) dos níveis séricos de proteína em comparação aos ratos controle. O grupo tratado com paraquat apresentou maiores níveis séricos de creatinina (44%, $P<0,01$), menor (50%, $P<0,01$) depuração da creatinina, e 10% maior PAS ($P<0,05$) e frequência cardíaca ($P<0,01$). O tratamento com tempol preveniu o surgimento das alterações. Adicionalmente, as atividades da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ no ventrículo esquerdo dos ratos tratados com paraquat foram de 30 e 55% menor ($P<0,05$) do que o grupo Controle, enquanto que a atividade da PMCA e da SERCA foram elevadas em 200% e 50% ($P<0,05$), respectivamente. Os ratos tratados com paraquat após administração de tempol não apresentaram alterações da atividade das ATPases transportadoras de Na^+ ou Ca^{2+} . Esses resultados indicam que o estresse oxidativo induzido pelo paraquat promove alterações na atividade das ATPases cardíacas que podem aumentar o risco do desenvolvimento de eventos adversos no órgão.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo. Coração. ATPases. Síndrome Cardiorrenal.

SOUZA SANTOS, Valéria Bianca de. **Effects of Paraquat-induced oxidative stress on sodium and calcium transport ATPases in rats cardiac tissue.** 2020. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

The contraction-relaxation process in the heart is maintained by the handling of cellular Ca^{+2} influx/efflux, which is influenced by Na^{+} and Ca^{+2} transporting ATPases. The oxidative stress is an extremely important pathophysiological component in cardiac dysfunction, but the impact of reactive oxygen species (ROS) on cardiac ATPases is still poorly understood. The aim of this study was to evaluate the impact of paraquat-induced ROS production on the function of cardiac Na^{+} and Ca^{+2} transporting ATPases. Adult male Wistar rats were submitted intraperitoneal administration of paraquat or 0.9% NaCl. Part of the group treated with Paraquat received administration of the antioxidant tempol prior to administration of paraquat. Rats were placed in a metabolic cage for a period of 24 hours to assess dietary and water consumption and to collect urine. Blood pressure was assessed by the tail-cuff method, and following, the rats were submitted to blood withdrawal (by abdominal aorta) and to the removal of left ventricle. In 24h, paraquat induced a lower intake of food (65%, $P<0.001$) and water (28%, $P<0.05$) and twice higher diuresis ($P<0.01$) and 10% increase ($P<0.05$) of serum protein levels compared to control rats. The paraquat-treated group had higher (44%, $P<0.01$) serum creatinine levels, lower (50%, $P<0.01$) creatinine clearance, and 10% higher SBP ($P<0.05$) and heart rate ($P<0.01$). Treatment with tempol prevented these changes. Additionally, $(\text{Na}^{+}+\text{K}^{+})$ -ATPase and Na^{+} -ATPase activities in the left ventricle of paraquat-treated rats were 30 and 55% lower ($P<0.05$) than the Control group, while the activity of PMCA and SERCA were elevated by 200% and 50% ($P<0.05$), respectively. Rats treated with paraquat after tempol administration did not present changes in the activity of Na^{+} or Ca^{+2} transporting ATPases. These results indicate that paraquat-induced oxidative stress promotes changes in cardiac ATPase activity that may increase the risk of developing adverse conditions in the organ.

Key words: Oxidative stress. Heart. ATPases. Cardiorenal Syndrome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPases	Classe de enzimas que catalisam a decomposição do ATP
Ca^{2+}	Cálcio
CAT	Catalase
Cu	Cobre
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
Fe^+	Ferro
GSH	Glutathiona Reduzida
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
H^+	Hidrogênio
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
K^+	Potássio
LRA	Lesão Renal Aguda
Mn	Manganês
Na^+	Sódio
NADP^+	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NADPH	Forma reduzida do NADP^+
NADPH oxidase	Complexo enzimático
NOX	Subunidades constituintes da NADPH oxidase
O_2	Oxigênio
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
$\text{OH}^{\cdot}$	Radical hidroxila
PAS	Pressão Arterial Sistólica
Pi	fosfato inorgânico
PMCA	Ca^{2+} -ATPase de Membrana Plasmática
RS	Retículo Sarcoplasmático
SCR	Síndrome Cardiorrenal
SERCA	Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoplasmático

SOD	Superóxido Dismutase
Zn	Zinco
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES	11
1.1.1	Função Cardiovascular	11
1.1.1.1	Acoplamento Excitação-Contração e Atividade das ATPases	12
1.1.2	Síndrome Cardiorrenal	14
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO	15
1.2.1	Metabolismo do O₂ e Formação das Espécies Reativas do Oxigênio	16
1.2.1.2	Paraquat e o ciclo redox	18
1.2.2	Patologias Relacionadas ao Estresse Oxidativo	20
1.2.3	Antioxidantes	20
1.2.3.1	Tempol	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.1.1	Objetivos Específicos	23
3	METODOLOGIA	24
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	24
3.2	TRATAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
3.2.1	Gaiola Metabólica	25
3.2.2	Avaliação da Pressão Arterial Sistólica	25
3.2.3	Atividade das ATPases Transportadoras de Na ⁺	25
3.2.4	Atividade das ATPases Transportadoras de Ca ²⁺	25
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO A	41

Introdução

A doença cardiovascular, principal causa de morte no Brasil e no mundo, tem como importante fator de risco a hipertensão arterial sistêmica (OLIVEIRA et al., 2022), estimada em um crescimento de 60% dos casos nos próximos anos (MONTEZANO et al., 2015). Disfunção cardíaca e renal são comumente observados em pacientes hospitalizados (DAR & COWIE, 2008). A taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares foi estimada em 57% maior entre pessoas com doença renal crônica (WEBSTER et al., 2017). O balanço do íon Ca^{2+} é muito importante para a contração muscular adequada, e ocorrendo perturbações nos mecanismos intracelulares que regulam a sua concentração haverá comprometimento do mecanismo de acoplamento excitação-contração (BÖGEHOLZ et al., 2012). O coração é um órgão suscetível ao estresse oxidativo, uma vez que os cardiomiócitos dependem fortemente da função mitocondrial e da fosforilação oxidativa (NERI et al., 2015). Além disso, já é muito reconhecido o papel do estresse oxidativo nas patologias renais, que pode acarretar hipertensão (SCHRIER, 2007).

O estresse oxidativo é um processo de desequilíbrio entre a produção de pró-oxidantes, como as espécies reativas do oxigênio, e atividade antioxidante, assim, pode ocasionar alterações e danos em biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, o que pode levar à morte celular. Esse fenômeno é considerado atualmente um dos principais contribuintes para início e progressão de diversas patologias graves (SHOJI & KOLETZKO, 2007). Diante da constante exposição dos tecidos às EROs, em condições fisiológicas, o organismo apresenta sistemas antioxidantes. O comprometimento ou saturação desses sistemas são fatores determinantes para o desequilíbrio (TELES, 2015). O Paraquat é um herbicida bastante usado na agricultura, entretanto ele é altamente tóxico, e o risco de mortalidade mediante a sua exposição é relativamente alto, em torno de 35 a 50% (PAVAN, 2013). Sabe-se que o Paraquat eleva a produção de EROs, por participar de ciclos redox na mitocôndria, e conseqüentemente leva ao estresse oxidativo (BLANCO-AYALA et al., 2014). Dessa forma, o Paraquat é uma útil ferramenta experimental para identificar o impacto das EROs na função celular e orgânica.

Assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar a atividade das ATPases transportadoras de Na^+ e Ca^{2+} no ventrículo esquerdo obtido de ratos expostos ao paraquat na presença e ausência da administração de um antioxidante, o Tempol.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCVs), principal causa de morte mundial (OMS, 2020), fazem parte do grupo das Doenças Crônicas Não Transmissíveis que levam a mortes prematuras, perda de qualidade de vida, além de impactos adversos econômicos e sociais, são causadores de cerca de 70% das mortes globais, onde 45% dessas são por DCVs (OLIVEIRA *et al.*, 2022). No Brasil as DCVs são responsáveis por quase um terço das mortes (OLIVEIRA *et al.*, 2022), e estão relacionadas a um alto nível de morbidade (PRECOMA *et al.*, 2019) e concomitante hipertensão (MONTEZANO *et al.*, 2015). Os principais fatores de risco incluem a hipertensão arterial, diabetes, dislipidemias, obesidade, sedentarismo, tabagismo, dieta inadequada, estresse e histórico familiar (PRECOMA *et al.*, 2019).

A hipertensão arterial sistêmica, o fator de risco cardiovascular mais importante, é uma doença crônica que constitui um problema de saúde pública grave, em virtude de sua dimensão, risco e dificuldades no controle, e está relacionada a uma taxa de mortalidade elevada por contribuir para o agravamento de DCV e também doenças renais (NEVES *et al.*, 2016). Estima-se que ocorra um crescimento de 60% dos casos de hipertensão nos próximos 30 anos (MONTEZANO *et al.*, 2015). O aparecimento de lesão renal aguda ou a piora da função renal nas DCVs tem emergido como um fator potencialmente associado com mortalidade em pacientes hospitalizados (LOGEART *et al.*, 2008; BREIDTHARDT, *et al.*, 2011).

1.1.1 Função Cardiovascular

A função primordial do coração é gerar um gradiente de pressão favorável a hemodinâmica do volume sanguíneo a fim de manter a perfusão tecidual adequada e promover a homeostase dos tecidos periféricos. Para este fim, as proteínas contráteis presentes nos cardiomiócitos interagem e se movimentam de forma organizada, gerando a contração muscular (BÖGEHOLZ *et al.*, 2012). São necessários íons, principalmente Na^+ e Ca^{2+} , para que exista a contração do músculo. A entrada do Na^+ despolariza a membrana e leva a condução do potencial de ação, permitindo uma pequena entrada de Ca^{2+} que irá induzir a liberação de

Ca^{2+} armazenado no RS, elevando as concentrações de Ca^{2+} intracelular livre que é responsável pela contração do miocárdio, por meio da interação com proteínas contráteis (MOHRMAN *et al.*, 2008; PEIXOTO, 2012). Esses são processos dependentes de ATP (MOHRMAN *et al.*, 2008).

Dessa forma, o coração é um órgão que é particularmente susceptível ao estresse oxidativo, uma vez que os cardiomiócitos dependem fortemente da função mitocondrial e da fosforilação oxidativa (NERI *et al.*, 2015). As mitocôndrias ocupam cerca de 30% do volume total de um cardiomiócito adulto, fornecendo a principal fonte de energia para a contração celular: ATP (MARTÍN FERNÁNDEZ & GREDILLA, 2016). Vários estudos suportam a hipótese de que as EROs desempenham um papel-chave na fisiopatologia das doenças cardíacas (DAHLLA *et al.*, 2000).

1.1.1.1 Acoplamento Excitação-Contração e Atividade das ATPases

A ação do bombeamento eficiente do coração requer uma coordenação precisa da contração sincronizada de milhões de células isoladas no músculo cardíaco em intervalos regulares quando um impulso elétrico excitatório é conduzido de célula em célula através de todo miocárdio (MOHRMAN *et al.*, 2008), isso desencadeia um conjunto de mecanismos e precede o desenvolvimento da força de contração (EISNER *et al.*, 2013). O acoplamento excitação-contração inicia-se com essa onda despolarizante percorrendo o sarcolema, abrindo os canais rápidos de Na^+ e os canais de Ca^{2+} do tipo L regulados por voltagem, permitindo a entrada desse íon na célula, induzindo a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático através dos receptores de rianodina (MEIRA, 2009), elevando assim, a concentração citosólica de Ca^{2+} em cerca de 100 vezes (EISNER *et al.*, 2013) e difundindo-se por todo o citosol ligando-se aos filamentos contráteis (formadas por proteínas contráteis) e, assim, induz a contração do miócito. Especificamente, o Ca^{2+} liga-se à troponina C, causando uma alteração conformacional que estabelece essas ligações estáveis chamadas pontes cruzadas. Os filamentos se organizam de forma que ocorre deslizamentos uns sobre os outros, encurtando as miofibrilas (compostas por filamentos), o que leva à contração das células musculares, e ao final do potencial de ação, a membrana se repolariza pela abertura de canais de K^+ (GUYTON, 2017). Assim é a elevação da concentração de Ca^{2+} que induz a contração da célula e ocorre a sístole. Por outro lado, a diástole, relaxamento da célula cardíaca, depende

da remoção do Ca^{2+} citosólico para o meio intersticial e para o retículo sarcoplasmático (MOHRMAN *et al.*, 2008).

A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, constituída pelas subunidades α , β e γ , funciona como um sistema de transporte ativo (Figura 1), responsável pela manutenção do potencial de repouso celular, pela manutenção dos gradientes de sódio e potássio e pelas propriedades excitáveis das células musculares e nervosas, através da membrana plasmática. A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ utiliza a energia armazenada em ATP para promover o transporte de íons sódio e potássio, três íons sódios para dentro da célula e dois íons potássio para fora da célula, o gradiente eletroquímico gerado por esse mecanismo é usado para conduzir uma variedade de processos de transporte secundários (FEHER, 2017).

O relaxamento da célula cardíaca, é um processo dependente do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presente no sarcolema, que é responsável pela extrusão de cálcio da célula em troca da entrada de íons sódio, a $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ de membrana plasmática (PMCA) também participa nesse processo. A recuperação do Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático é realizada pela $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ de retículo sarcoplasmático (SERCA) (EISNER *et al.*, 2013). A PMCA e a SERCA estão ilustradas na Figura 1.

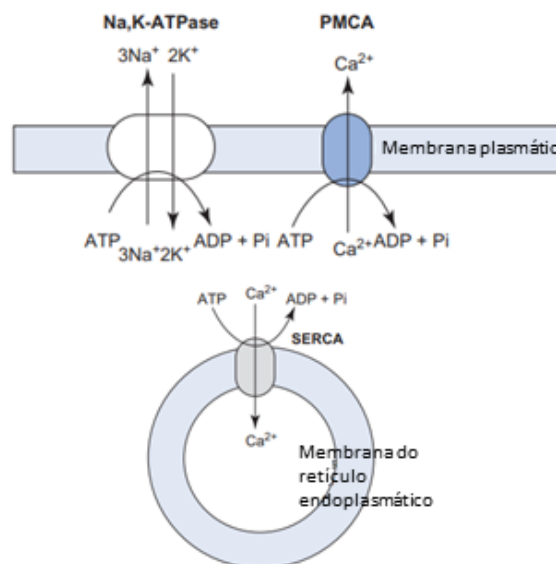


Figura 1. Adaptado (FEHER, 2017). $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é a responsável pela manutenção dos gradientes iônicos na maioria das células; PMCA, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ da membrana plasmática responsável por bombear Ca^{2+} para fora das células; a SERCA, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ do retículo endoplasmático liso, que é responsável por remover o Ca^{2+} do citosol e armazená-lo.

Dessa forma, o balanço do íon Ca^{2+} é muito importante para a contração muscular adequada, e ocorrendo perturbações nos mecanismos intracelulares que regulam a sua concentração haverá comprometimento do mecanismo de acoplamento excitação-contração (BÖGEHOLZ *et al.*, 2012).

1.1.2 Síndrome Cardiorrenal

Existe uma forte interação entre a função cardíaca e renal, onde uma disfunção ou lesão de um órgão muitas vezes contribui para disfunção ou lesão do outro (SCHRIER, 2007). Além disso, graus variados de disfunção cardíaca e renal são comumente observados em pacientes hospitalizados (DAR & COWIE, 2008). A Lesão Renal Aguda (LRA) ou Injúria Renal Aguda é um frequente e importante problema em pacientes hospitalizados cuja prevalência oscila entre 15 e 30%, e em pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI) este valor é praticamente duplicado (PERES *et al.*, 2015). Sua prevalência vem aumentando consideravelmente, tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento e, está associada ao aumento do tempo de internação, elevado custo para o sistema de saúde e à alta morbidade e mortalidade (INDA-FILHO *et al.*, 2021). A taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares foi estimada em 57% maior entre pessoas com doença renal crônica (WEBSTER *et al.*, 2017), que afeta o coração, principalmente por meio da hipertensão, ativação inflamatória e resistência aos diuréticos (WEBSTER *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019).

O termo Síndrome Cardiorrenal (SCR) foi proposto para descrever esta complexa inter-relação de prejuízo entre rins e coração (RONCO, 2011). A SCR é classificada em aguda ou crônica e de acordo com o primeiro órgão a sofrer a lesão, que pode ser o coração (SCR tipo 1 e tipo 2), rins (SCR tipo 3 e 4) ou ambos (SCR tipo 5) (JUNHO *et al.*, 2021), sendo a do tipo 3 conhecida como síndrome renocardiaca aguda (RONCO, 2011; JUNHO *et al.*, 2021), onde a ocorrência de LRA contribui ou precipita a disfunção cardíaca, por meio de sobrecarga de volume, acidose metabólica, distúrbios eletrolíticos, entre outros mecanismos (DI LULLO *et al.*, 2019).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A definição clássica para o estresse oxidativo é: “um processo de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas, pró-oxidantes, e a atividade antioxidante celular, favorecendo os pró-oxidantes” (SHOJI & KOLETZKO, 2007). Esse fenômeno é comum na base fisiopatológica de diversos processos/doenças e seu prejuízo está intimamente ligado à sua interação com várias biomoléculas essenciais, como os lipídios da membrana celular, polissacarídeos, proteínas e o próprio DNA celular (SHOJI & KOLETZKO, 2007) que podem culminar em dano tecidual (PETER *et al.*, 1992, SUNTRES, 2002).

As espécies reativas são átomos, moléculas ou íons que apresentam alta reatividade com outras substâncias, e que podem ser classificadas por radicais livres ou compostos não-radicalares. Os radicais livres são moléculas orgânicas ou inorgânicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa (PINHO *et al.*, 2010), e a forma usada para liberar essa energia, é reagindo com as moléculas adjacentes, comportando-se como receptores ou como doadores de elétrons (KOURY & DONANGELO, 2003). Moléculas que possuem funções essenciais para a célula, como lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, perdem sua função, e levam ao dano celular após reação com os radicais livres, (ABBAS *et al.*, 2015). Essa configuração faz com que os radicais livres sejam moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas, podendo levar à oxidação de outras moléculas (PINHO *et al.*, 2010). São capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa na tentativa constante de parear-se. Este fenômeno determina a formação de radicais livres em cascata, processo que só termina quando dois radicais livres se encontram onde um ganha e outro perde o elétron da órbita externa, deixando de ser um radical livre (OLSZEWER, 1995).

As espécies reativas do oxigênio (EROs) também se apresentam na configuração de radicais livres ou de espécies reativas não-radicalares. A produção celular de EROs ocorre de maneira constante em condições fisiológicas, através de reações de oxirredução que ocorrem durante a respiração celular (PINHO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011). A remoção das EROs ocorre por enzimas antioxidantes presentes nas células (PINHO *et al.*, 2010; JAKUBCZYK, 2020). As EROs apresentam uma diversidade de funções celulares, incluindo a indução à

diferenciação celular e a apoptose, contribuindo de forma significativa para o processo natural de envelhecimento, bem como as atividades bactericidas e bacteriostáticas (JAKUBCZYK, 2020). Porém, quando as EROS estão em altas concentrações no organismo, condição denominada de estresse oxidativo, podem ocasionar alterações e danos em biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, o que pode levar à morte celular (PINHO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011).

Uma importante fonte geradora de radicais livres do oxigênio são as enzimas NADPH oxidases, com suas subunidades catalíticas (NOX), proteínas transmembrana que possuem a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o receptor de elétrons é o próprio oxigênio e, dessa forma, gera-se o radical $O_2^{\cdot-}$. Essas enzimas existem em pelo menos sete isoformas, diferindo quanto ao local de expressão e co-fatores necessários para a sua ativação (BARBOSA *et al.*, 2010; KAYAMA *et al.*, 2015). Nos cardiomiócitos, são expressas a NOX 2, localizada na membrana celular, e a NOX 4, que é expressa predominantemente nas mitocôndrias das células musculares cardíacas (KAYAMA *et al.*, 2015). Em células da musculatura lisa vascular alterações na atividade de enzimas NADPH oxidases prejudicam a biodisponibilidade do óxido nítrico, que é essencial para a vasodilatação e a manutenção da função vascular normal, além de causarem hipertrofia, vasoconstrição e conseqüentemente a possibilidade de hipertensão, sendo assim, um fator que contribui para o aparecimento das doenças cardiovasculares (RABELO, *et al.*, 2010). A inibição crônica da síntese de óxido nítrico induz a elevação de pressão arterial, geralmente acompanhada por alterações funcionais e estruturais do rim e do coração. No coração, as anormalidades cardíacas incluem principalmente hipertrofia ventricular e focos de necrose e fibrose. (ZAGO; ZANESCO, 2006).

1.2.1 Metabolismo do O_2 e Formação das Espécies Reativas do Oxigênio

As EROs são formadas fisiologicamente como parte do metabolismo aeróbico celular no interior de mitocôndrias, sendo a principal via do metabolismo do oxigênio (O_2) no organismo (HYBERTSON *et al.*, 2011). Para suprir a necessidade energética celular, o processo metabólico de fosforilação oxidativa mitocondrial leva à geração de moléculas de ATP a partir de ADP e P_i , associada ao acontecimento de reações de oxidação-redução na cadeia de transporte de elétrons

na membrana interna mitocondrial, onde há incorporação de 4 elétrons ao final da cadeia respiratória, resultando em sua completa redução formando uma molécula de água (DAMASCENO, 2002; SHOJI & KOLETZKO, 2007). A enzima citocromo c participa da reação, sendo retirado um elétron de cada molécula de citocromo c, com utilização de quatro moléculas no processo (BARBOSA *et al.*, 2010). A Figura 2 ilustra o processo de redução de O₂ e formação de água (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Caso ao longo da cadeia transportadora de elétrons o O₂ seja reduzido com um menor número de elétrons há a produção das EROs (DAMASCENO, 2002; SHOJI & KOLETZKO, 2007).

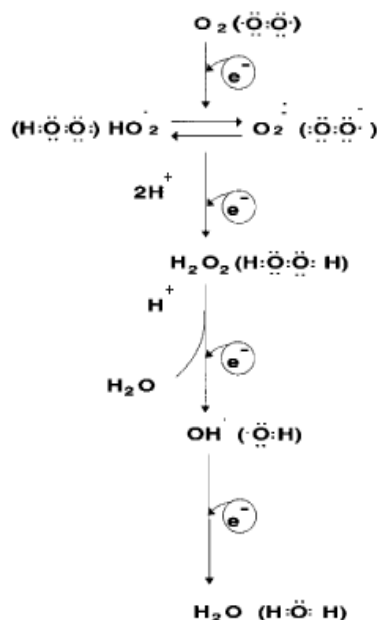


Figura 2. Redução de O₂ e formação de água (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A proteção celular e orgânica contra o efeito exacerbado das EROs e o surgimento de estresse oxidativo ocorre pela ação de sistemas antioxidantes de defesa (TELES, 2015), constituídos por antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas A/E e pró-betacarotenos (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005; PIZZINO, 2017) e principalmente por sistemas enzimáticos, protagonizados pelas enzimas superóxido dismutase, catalases e peroxidases. O comprometimento ou saturação desses sistemas antioxidantes são fatores determinantes para o acúmulo de espécies reativas (TELES, 2015). Quando ocorre desequilíbrio entre a formação e a remoção das EROs devido a uma superprodução ou deficiência na capacidade de

neutralizá-las ou reparar o dano resultante existe o surgimento do estresse oxidativo (LIGUORI *et al.*, 2018).

1.2.1.2 Paraquat e o ciclo redox

O Paraquat (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio; Paraquat) é um herbicida do tipo quaternário, bastante usado na agricultura em países em desenvolvimento devido ao seu baixo custo (GAWARAMMANA & BUCKLEY, 2011), no entanto, pode causar poluição do solo e da água e causar sérios danos ao meio ambiente e aos organismos (ERICKSON *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2021). Ao ser humano ele é altamente tóxico, e o risco de mortalidade mediante a sua exposição é alto, em torno de 35 a 50% (PAVAN, 2013). Além de sua utilização na agricultura, a ingestão intencional do Paraquat é realizada para cometer suicídio, sendo um problema comum que afeta vários países (LIN *et al.*, 2021).

O Paraquat é amplamente conhecido por elevar a produção de EROs e induzir estresse oxidativo, levando à destruição de organelas celulares e morte celular (MCCORMACK *et al.*, 2005). A principal causa de morte é a parada cardíaca durante os primeiros dias pós exposição ou a insuficiência respiratória (SEOK *et al.*, 2012). A insuficiência renal também é uma complicação crítica (KIM *et al.*, 2009), cujos mecanismos moleculares envolvem uma importante elevação de produção de EROs no rim (GU *et al.*, 2016), que pode contribuir ou precipitar a disfunção cardíaca, por meio de sobrecarga de volume, acidose metabólica, distúrbios eletrolíticos, entre outros mecanismos (DI LULLO *et al.*, 2019). Há indícios de que o Paraquat compromete a função contrátil do miocárdio e a taxa geral de sobrevivência dos cardiomiócitos (CHAN *et al.*, 2007; GE *et al.*, 2010).

De forma geral, a grande maioria dos autores concorda que, ao entrar na célula (DINIS-OLIVEIRA, 2008), o Paraquat exerce seus efeitos tóxicos devido ao seu ciclo redox, exibido na Figura 3 (BLANCO-AYALA *et al.*, 2014), que é um processo alternado de redução e reoxidação, e potencialmente leva à toxicidade mitocondrial indireta. (DINIS-OLIVEIRA, 2008).

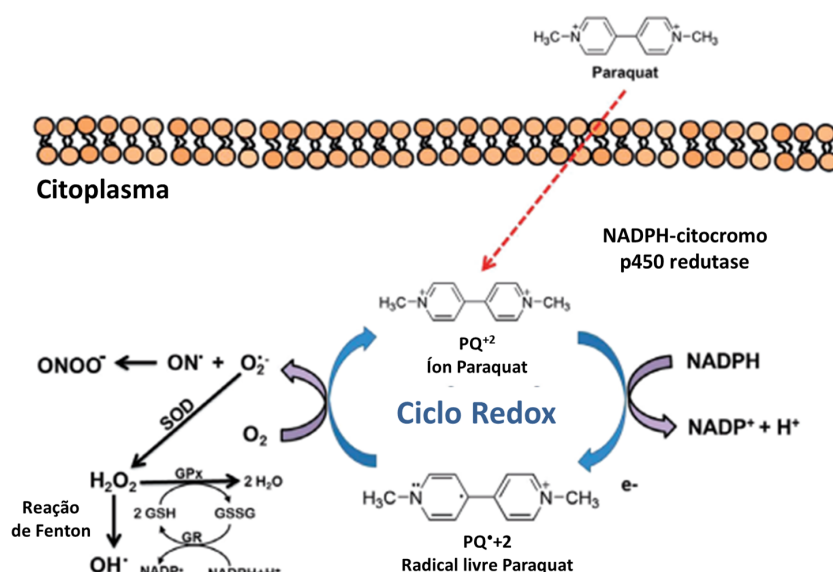


Figura 3. Ciclo redox do Paraquat (traduzido de BLANCO-AYALA *et al*, 2014).

As enzimas capazes de iniciar a ciclagem redox de Paraquat estão presentes em componentes microssomais, membrana plasmática e citosólicos e incluem: NADPH oxidase, óxido nítrico sintase e NADPH-citocromo P450 redutase (BLANCO-AYALA *et al*, 2014). O Paraquat (PQ) é reduzido enzimaticamente para formar o radical livre $\text{PQ}^{+\bullet}$ mais NADP⁺ ou NAD⁺. Finalmente, o $\text{PQ}^{+\bullet}$ é então rapidamente reoxidado na presença de O_2 com subsequente geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (DINIS-OLIVEIRA, 2008). Desde que haja NADPH suficiente como doador de elétrons e O_2 como aceptor de elétrons, o Paraquat desempenhará um papel catalítico nesse processo de ciclagem redox, gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$ às custas do NADPH (DINIS-OLIVEIRA, 2008).

Danos cardíacos causados pelo envenenamento por Paraquat são comuns e geralmente apresentam mau prognóstico (CHEN *et al.*, 2021). Os pacientes com colapso cardiovascular e falência múltipla de órgãos têm taxa de mortalidade superior a 50% (LIN *et al.*, 2021). Devido ao papel das EROs no mecanismo de toxicidade do Paraquat, a sua administração pode ser uma ferramenta muito útil para estudar o impacto das espécies reativas de oxigênio na injúria de células cardíacas.

1.2.2 Patologias Relacionadas ao Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é considerado atualmente um dos principais contribuintes para início e progressão de diversas patologias graves com implicações importantes na saúde pública (PIZZINO, 2017). Sua contribuição é principalmente por causar peroxidação lipídica da membrana celular, que resulta em grande comprometimento da integridade estrutural e funcional da célula, caracterizada por permeabilidade da membrana alterada e disfuncionalidade dos receptores de membrana (IGHODARO *et al.*, 2018). O envolvimento do estresse oxidativo em inúmeros processos patológicos, agudos e crônicos, abrange doença pulmonar obstrutiva, doença renal aguda e crônica, doenças neurodegenerativas, câncer e doenças e fatores de risco cardiovasculares, isto é, obesidade, diabetes, hipertensão e aterosclerose (LIGUORI *et al.*, 2018).

Recente pesquisa, de Saheera *et al.* (2019), demonstra com clareza a associação do estresse oxidativo e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, onde a utilização de um antioxidante foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, regredir a hipertrofia cardíaca e reduzir a pressão arterial (SAHEERA *et al.* 2019). As EROs possuem também um papel relevante na lesão renal aguda, sendo a NADPH oxidase uma importante fonte de produção no tecido renal e o aumento de sua expressão ou atividade é também relatado em diversos modelos de hipertensão e disfunção renal (LIMA *et al.*, 2021; VIEIRA-FILHO, 2014).

Desde que foi estabelecido o importante papel que o estresse oxidativo desempenha na patogênese de muitas condições clínicas e envelhecimento, vários estudos têm sido realizados para investigar os mecanismos específicos de cada uma delas e os efeitos terapêuticos da terapia antioxidante (LIGUORI *et al.*, 2018).

1.2.3 Antioxidantes

Diante da constante exposição dos tecidos às EROs, o organismo apresenta vias de defesa antioxidante (BIRI *et al.*, 2007). Antioxidantes possuem a função de inibir ou diminuir a oxidação ou os danos de espécies oxidantes (BARBOSA *et al.*, 2010). Isto ocorre por dois mecanismos: impedindo que estas espécies sejam formadas, ou seja, prevenindo a produção destas antes de

causarem lesões, ou através do reparo das lesões já formadas e reconstituição dos organismos danificados (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARBOSA *et al.*, 2010).

Os antioxidantes podem ser classificados como de origem enzimática ou não enzimática (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005). As enzimas antioxidantes primárias são o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (BIRI *et al.*, 2007; IGHODARO *et al.*, 2018). Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas que interagem com as EROs e terminam as reações em cadeia dos radicais livres, como a glutathiona, o ácido ascórbico e a vitamina E (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005). A Figura 4 ilustra os mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos (IGHODARO *et al.*, 2018).

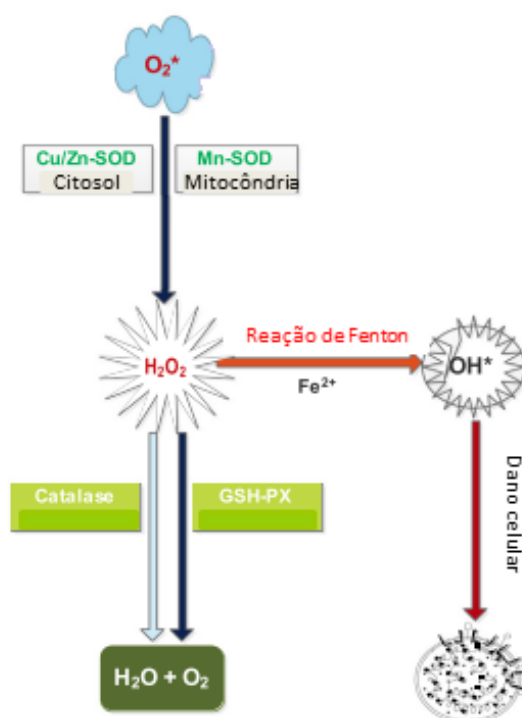


Figura 4. Defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio. Adaptado (IGHODARO *et al.*, 2018).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é convertido pela SOD em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é degradado ou reduzido em água e oxigênio molecular pela CAT, impedindo a produção de radicais hidroxila. Nas mitocôndrias a CAT é ausente, então a hidrólise mitocondrial de H_2O_2 ocorre por meio de GSH-Px, que converte peróxidos e radicais hidroxila em formas não tóxicas pela oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em dissulfeto de glutathiona e depois reduzida a GSH pela glutathiona

redutase (LIGUORI *et al.*, 2018; IGHODARO *et al.*, 2018). O $O_2^{\cdot-}$ produz o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) a partir do H_2O_2 , que resulta de sua dismutação por SOD, através da reação de Fenton que ocorre na presença de Fe^{2+} , processo ilustrado na Figura 3 e Figura 4. Tanto o $O_2^{\cdot-}$ quanto o $OH^{\cdot}$ atuam nas membranas lipídicas para promover o efeito mais devastador do estresse oxidativo, que é a peroxidação lipídica da membrana (IGHODARO *et al.*, 2018).

1.2.3.1 Tempol

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) tem sido inserido em pesquisas relacionadas ao estresse oxidativo e vem positivamente demonstrando os seus efeitos antioxidantes, especialmente, no controle a hipertensão (LIU *et al.*, 2014; SAHEERA *et al.*, 2019). Sendo reconhecido como tendo atividade mimética à superóxido dismutase (SOD), a sua função antioxidante está relacionada com a capacidade de sequestrar radicais livres além de penetrar na membrana celular e possuir atividade intracelular (CALABRESE, 2021), principalmente inibir a reação de Fenton (LIU *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente projeto é avaliar a atividade das ATPases transportadoras de Na^+ e Ca^{2+} no ventrículo esquerdo obtido de ratos submetidos ao estresse oxidativo pela administração de Paraquat na presença e ausência da administração do antioxidante tempol.

2.1.1 Objetivos Específicos

- i) Avaliação dos marcadores de função renal;
- ii) Avaliação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca;
- iii) Avaliação da atividade das ATPases transportadoras de Na^+ em homogenatos do ventrículo esquerdo;
- iv) Avaliação da atividade das ATPases transportadoras de Ca^{2+} em homogenatos do ventrículo esquerdo

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 0013/2017). Foram utilizados ratos do tipo Wistar, machos (90 dias), mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, em ciclo 12h/12h – claro/escuro, e temperatura em torno de 22°C.

3.2 TRATAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram submetidos a administração intraperitoneal em dose única de Paraquat (20 mg/kg de peso corpóreo; dissolvido em NaCl 0,9%; n=8). Outro grupo de ratos machos (n=8) também submetido a administração de Paraquat, recebeu tratamento diário prévio por 7 dias consecutivos com tempol (10 mg/kg de peso corpóreo, na água de beber). O grupo controle (n=8) formado por ratos submetidos a administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (1 mL/kg de peso corpóreo).

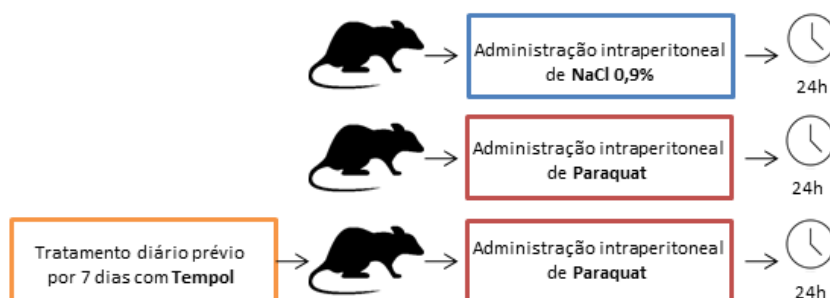


Figura 6. Esquema dos tratamentos dos grupos experimentais.

Após a administração de paraquat/NaCl 0,9%, os ratos dos três grupos foram alocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 horas para avaliação do consumo dietético e hídrico, bem como para coleta de urina. Após esse período, a PAS foi avaliada através da pletismografia de cauda e, em seguida, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), e submetidos a coleta de uma amostra de sangue via aorta abdominal (2 mL) e a retirada de coração que foi congelado por imersão em nitrogênio líquido e mantido a -80°C.

3.2.1 Gaiola Metabólica

As amostras de urina, em conjunto com soro, foram submetidas a avaliação da concentração de creatinina utilizando um kit comercial colorimétrico (labtest, Lagoa Santa, Brasil), e foi calculada a depuração da creatinina. Além disso, também foi avaliada a concentração de soro e de proteína urinária usando o método do fenol de Folin (LOWRY *et al.*, 1951).

3.2.2 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica

A avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada de forma não invasiva em ratos conscientes através de pletismografia da cauda. Os animais foram treinados durante três dias consecutivos para procedimentos experimentais de medida da PAS, conforme descrito por Vieira-Filho (2014).

3.2.3 Atividade das ATPases Transportadoras de Na^+

As atividades da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e sensível à ouabaína e $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ sensível à furosemida foram avaliadas, de acordo com o método descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981), utilizando inibidores específicos. A atividade $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas amostras do ventrículo esquerdo foi calculada a partir da diferença de fosfato inorgânico (Pi) liberado da hidrólise do ATP na ausência e presença de ouabaína 2 mM. A atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ nas amostras foi calculada a partir da diferença de Pi liberado na ausência e presença de furosemida 2mM.

3.2.4 Atividade das ATPases Transportadoras de Ca^{2+}

As atividades da PMCA e da SERCA foram avaliadas conforme descrito em Ferrão *et al.* (2012), utilizando inibidores específicos. A atividade total das ATPases transportadoras de Ca^{2+} foi definida pela diferença de fosfato inorgânico liberado da hidrólise do ATP na ausência e na presença de EGTA 2 mM. A atividade da SERCA é representada pela atividade da $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ sensível à tapsigargina, enquanto que a atividade residual representa a atividade da PMCA.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. As médias dos grupos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 24 horas da realização dos tratamentos, observou-se que a administração de Paraquat induziu um menor consumo de alimento (65%, $P < 0,001$) e de água (28%, $P < 0,05$), duas vezes maior volume de urina ($P < 0,01$) e níveis de proteína sérica 10% superiores ($P < 0,05$) em comparação aos ratos controle (Tabela 1). Simultaneamente a essas alterações, foi observada uma acentuada diminuição de peso corporal. O tratamento com tempol preveniu o surgimento das alterações induzidas pelo Paraquat na ingestão de alimentos, diurese e níveis séricos de proteína.

Esses dados indicam que o Paraquat promove uma perda de peso corpóreo através da diminuição da ingestão alimentar, mas principalmente em decorrência de um possível quadro de desidratação, secundário a uma capacidade de concentração de urina prejudicada e elevado nível de diurese. A desidratação induzida pelo Paraquat pode ser confirmada pela elevação da concentração dos níveis séricos de proteína, que indicam que houve perda de volume de água. Como essas alterações foram impactadas pelo tratamento com Tempol, pode-se sugerir que há uma participação de mediadores oxidativos nesse processo.

Tabela 1: Dados Metabólicos Gerais

	C	PQ	PQ + T
Variação do peso corporal (g)	$2 \pm 1,7$	$-24 \pm 4^{**}$	$2 \pm 6^{\dagger\dagger}$
Ingestão de alimento (g/100 g PC)	$6,5 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,2^{***}$	$6.1 \pm 0,6^{\dagger\dagger\dagger}$
Ingestão de água (mL/100 g PC)	$13,9 \pm 1.0$	$10.0 \pm 0,9^*$	$10.0 \pm 1.3^*$
Diurese (mL / 100 g PC)	$4.0 \pm 0,2$	$8 \pm 0,8^{***}$	$5,3 \pm 0,4^{\dagger\dagger}$
proteína sérica total (g/dL)	$6,76 \pm 0,10$	$7,46 \pm 0,22^*$	$6,74 \pm 0,13^{\dagger}$

C: ratos controle (n = 8); PQ: ratos tratados com Paraquat (20 mg / kg de peso corporal); PQ + T: ratos tratados com Paraquat (20 mg / kg de peso corporal) que recebeu previamente administração tempol (10 mg / kg de peso corporal). PC = peso corporal. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em comparação com C; $\dagger$ $P < 0,05$, $\dagger\dagger$ $P < 0,01$ e $\dagger\dagger\dagger$ $P < 0,001$ vs PQ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

A administração de Paraquat leva também a alterações nos marcadores de lesão renal (Tabela 2). O grupo de ratos que recebeu Paraquat apresentou níveis séricos aumentados de creatinina (44%, $P < 0,01$) e menor (50%, $P < 0,01$) depuração

da creatinina do que o grupo Controle. Os ratos tratados com tempol também apresentaram maiores níveis séricos de creatinina e menor depuração de creatinina do que o grupo controle. A proteinúria não foi alterada pela administração de Paraquat ou tratamento com Tempol.

Adicionalmente, os ratos tratados com Paraquat apresentaram PAS e frequência cardíaca aproximadamente 10% maiores ($P < 0,05$ e $0,01$, respectivamente) do que o grupo controle. Observou-se ainda uma tendência ($P < 0,08$) para o grupo tratado com Tempol apresentar PAS menor do que os ratos Paraquat não-tratados, enquanto na frequência cardíaca, os efeitos redutores do tempol foram estatisticamente observados ($P < 0,05$).

Tabela 2: Marcadores de função renal, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

	C	PQ	PQ + T
Creatinina no soro (mg/dL)	0,45 ± 0,02	0,65 ± 0,05 **	0,67 ± 0,04 **
Depuração da creatinina (mL/min por 100 g PC)	0,91 ± 0,08	0,48 ± 0,06 **	0,56 ± 0,06 **
Proteinúria (mg/ 100 g PC)	35,8 ± 2,3	28,8 ± 3,5	29,1 ± 3,0
Pressão arterial sistólica (mmHg)	133 ± 3	145 ± 4 *	136 ± 1
Frequência cardíaca (bpm)	405 ± 6	442 ± 9 **	408 ± 7 †

C: ratos controle (n = 8); PQ: ratos tratados com Paraquat (20 mg / kg de peso corporal; n = 8); PQ + T: ratos tratados com Paraquat (20 mg / kg de peso corporal; n = 7) que recebeu previamente administração Tempol (10 mg / kg de peso corporal, de po). PC = peso corporal; bpm = batimentos por minuto. Os resultados são expressos como média ± EPM. * $P < 0,05$, e ** $P < 0,01$ em comparação com C; † $P < 0,05$ vs PQ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

O Paraquat também afetou a função das ATPases transportadoras de Na^+ no ventrículo esquerdo (Figura 7). Os ratos tratados com Paraquat apresentaram a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ no ventrículo esquerdo cerca de 30 e 55% menor, respectivamente ($P < 0,05$) do que o grupo Controle. Nos ratos tratados com Tempol, a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi superior ($P < 0,001$) ao dos ratos sem tratamento, indicando que o Tempol preveniu completamente a inibição da bomba induzida pelo Paraquat. Por outro lado, a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ do grupo tratado com Tempol não foi diferente do grupo Paraquat sem tratamento, entretanto também não foi diferente do grupo Controle, indicando que o Tempol preveniu parcialmente os efeitos do Paraquat.

A redução da atividade das ATPases transportadoras de Na^+ desequilibram o controle do gradiente eletroquímico fazendo com que o nível de Na^+ intracelular permaneça elevado promovendo redução ou inibição da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, aumentando as concentrações de cálcio intracelular, consequentemente aumenta a força de contração do coração, esse panorama intracelular de cálcio elevado leva a contratura do miócito (WASSERSTROM, 2005; KIM, 2008; CABRAL, 2019). O cálcio intracelular excessivo tende a causar pós-despolarizações tardias, o que pode, por sua vez, leva a contrações prematuras e desencadear arritmias (LEVINE, 2016). Alguns transtornos cardíacos causados por Paraquat já foram observados, como miocardite tóxica, arritmias e choque (SCHMITT, 2006).

As EROs podem oxidar as subunidades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ inibindo sua atividade. Silva (2014) demonstrou que ratos com regulação negativa de $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ apresentam modificações eletrocardiográficas que aumentam o risco de arritmias cardíacas e morte súbita, juntamente com alterações renais (SILVA *et al.*, 2014). Em humanos, biópsias endomiocárdicas demonstraram que corações com função comprometida tem as concentrações totais de $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ diminuídas em 40% (SCHWINGER, 2003). A proteção antioxidante do Tempol nas atividades de $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ sugere que o estresse oxidativo mediado pelo Paraquat podem ter sido responsáveis por esse efeito.

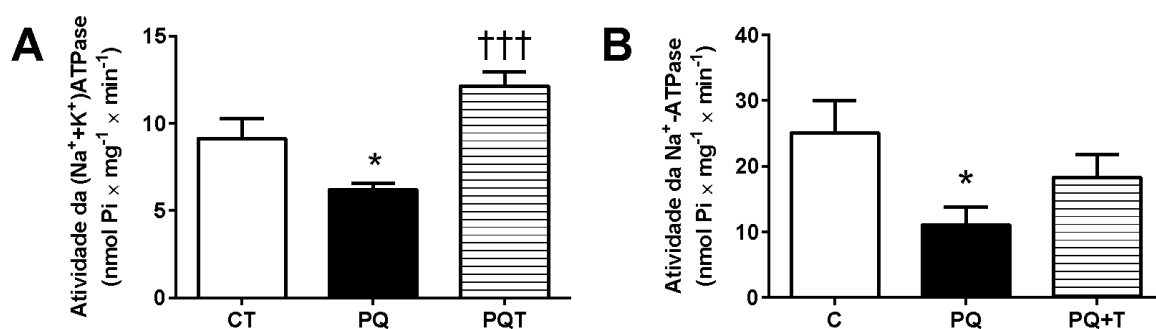


Figura 7. Atividade das ATPases transportadoras de Na^+ do ventrículo esquerdo: A, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ sensível à ouabaína; e B, $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ sensível à furosemida. , C: ratos controle (n = 8); PQ: ratos tratados com paraquat (20 mg / kg de peso corporal); PQ + T: ratos tratados com paraquat (20 mg / kg de peso corporal) que recebeu previamente administração Tempol (10 mg / kg de peso corporal). Os resultados são expressos como média ± EPM. * $P < 0,05$ em comparação com C; ††† $P < 0,001$ vs PQ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

A atividade das ATPases transportadoras de Ca^{2+} do ventrículo esquerdo também se mostraram alteradas, fortalecendo a hipótese de que o comprometimento funcional das ATPases transportadoras de Na^{+} alteraram o balanço do Ca^{2+} citosólico (Figura 8). No grupo de ratos tratados com Paraquat, a atividade da PMCA e da SERCA foram 200% e 50% superiores ($P < 0,05$) ao grupo controle. Os ratos que receberam o tratamento com Tempol apresentaram a atividade da PMCA e SERCA menor que a dos ratos sem o tratamento, e não diferente dos ratos controle, o que indica que o Tempol previne o desequilíbrio do controle do gradiente eletroquímico.

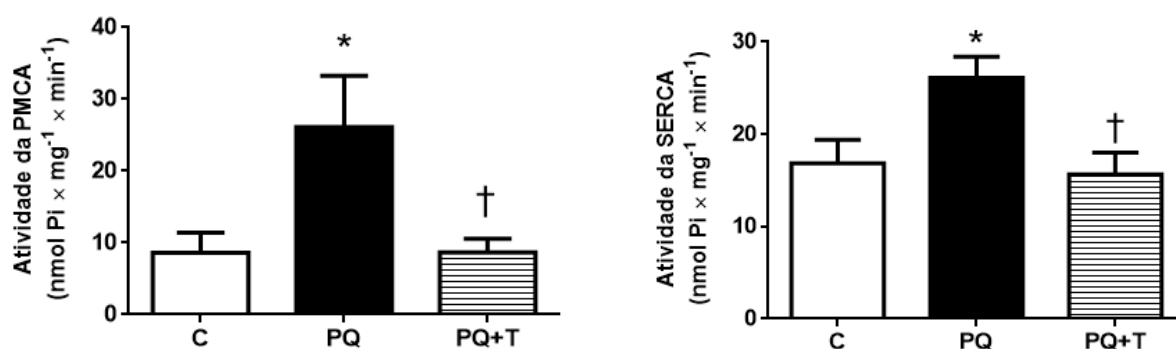


Figura 8. Atividade das ATPases transportadoras de Ca^{2+} do ventrículo esquerdo: A, Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (PMCA); e B, Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA). , C: ratos controle ($n = 8$); PQ: ratos tratados com Paraquat (20 mg / kg de peso corporal); PQ + T: ratos tratados com Paraquat (20 mg / kg de peso corporal) que recebeu previamente administração tempol (10 mg / kg de peso corporal). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ em comparação com C; † $P < 0,001$ vs PQ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

O aumento da atividade das ATPases transportadoras de Ca^{2+} no ventrículo esquerdo dos animais tratados com Paraquat pode indicar um mecanismo compensatório ao eventual acúmulo de Ca^{2+} induzido pela inibição da atividade das ATPases transportadoras de Na^{+} . Para que ocorra o processo de relaxamento muscular é necessário que o Ca^{2+} seja removido do citoplasma, então, é esperado que o Ca^{2+} celular em excesso se acumule no retículo sarcoplasmático (RS) em vez de no citoplasma (OTTOLIA *et al.*, 2013). No entanto, a sobrecarga no estoque de Ca^{2+} no RS resulta em maiores transientes de Ca^{2+} e, portanto, contratilidade (OTTOLIA *et al.* 2013). Isso ocorre porque os receptores de rianodina tornam-se mais sensíveis ao Ca^{2+} , levando à liberação espontânea de Ca^{2+} armazenado no SR. Dessa forma, com o Ca^{2+} intracelular elevado, precisa-se de uma compensação para

uma tentativa de manter o equilíbrio intracelular, o que justifica o aumento da atividade da PMCA e SERCA.

Magalhães (2014) cita que se a atividade da SERCA não responder compensatoriamente ao excesso de Ca^{2+} , os cardiomiócitos não conseguem reduzir a concentração intracelular de Ca^{2+} de maneira satisfatória para que ocorra a diástole, causando transtornos nas fases de contratilidade e relaxamento do músculo cardíaco e arritmias (MAGALHÃES, 2014). As lesões/disfunções cardiovasculares induzidas pelo Paraquat são relatadas em estudos de caso, principalmente a arritmia (TABATA *et al.*, 1999; SCHIMITT *et al.*, 2006).

A prevalência do aumento da frequência cardíaca e da PAS nos ratos do Grupo Paraquat (Tabela 2) acontece à medida que ocorre perda da função renal, e a associação dessas situações clínicas aumenta consideravelmente o risco cardiovascular. O que corrobora com as alterações cardiovasculares observadas, principalmente a diminuição da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ no ventrículo esquerdo (Figura 7), em cerca de 30-55% menores, causando o aumento de Na^+ , o que leva a inibição da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e consequentemente o acúmulo de Ca^{2+} intracelular, sobrecarregando então as ATPases transportadoras de Ca^{2+} (Figura 8), PMCA e SERCA. Tais dados sugerem uma via de prejuízo entre coração e rins, denominada síndrome cardiorrenal. O tratamento com o antioxidante Tempol foi capaz de manter o equilíbrio do gradiente eletroquímico (Figura 7 e Figura 8), e manter a PAS e frequência cardíaca menores do que as do Grupo Paraquat, além de prevenir o surgimento das alterações induzidas pelo Paraquat nos marcadores séricos de lesão renal (Tabela 2). Dessa forma é possível concluir que existe participação do estresse oxidativo.

5 CONCLUSÃO

O estresse oxidativo mediado pela administração de Paraquat induziu aumento de PAS e frequência cardíaca, também afetando a função das ATPases transportadoras de Na^+ e ATPases transportadoras de Ca^{2+} no ventrículo esquerdo, que pode resultar em desequilíbrio do controle influxo/efluxo de Ca^{2+} , e favorecendo ao surgimento de disfuncionalidades e lesões cardíacas. O presente estudo também indica que existe um vínculo entre o desenvolvimento de disfunção cardíaca secundariamente ao estabelecimento de LRA, induzido por Paraquat, uma vez que também observou-se alterações nos marcadores séricos de lesão renal.

A síndrome cardiorenal é um conjunto de processos fisiopatológicos que contribuem para a perpetuação de um ciclo de disfunção cardíaca e renal. Estudos adicionais com outros parâmetros são necessários para melhor avaliação e elucidação de seus mecanismos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran - **Patologia: Bases Patológicas Das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- ANDRADE JÚNIOR, Dahir Ramos de et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 60-68, 2005.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BREIDTHARDT, Tobias et al. Effect and clinical prediction of worsening renal function in acute decompensated heart failure. **The American journal of cardiology**, v. 107, n. 5, p. 730-735, 2011.
- BIRI, A., Bozkurt, N., Turp, A., Kavutcu, M., Himmetoglu, Ö., & Durak, I. (2007). Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. **Gynecologic and obstetric investigation**, 64(4), 187-192.
- BLANCO-AYALA, T.; ANDÉRICA-ROMERO, A. C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free radical research**, v. 48, n. 6, p. 623-640, 2014.
- BÖGEHOLZ, Nils; MUSZYNSKI, Adam; POTT, Christian. The physiology of cardiac calcium handling. **Wiener medizinische Wochenschrift**, v. 162, n. 13, p. 278-282, 2012.
- CABRAL, Edjair V. et al. Alpha-Tocopherol during lactation and after weaning alters the programming effect of prenatal high salt intake on cardiac and renal functions of adult male offspring. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 46, n. 12, p. 1151-1165, 2019.
- CALABRESE, Giovanna et al. Beneficial effect of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on inflammation and osteoarthritis in in vitro models. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, p. 352, 2021.

CHAN, Yin-Ching et al. Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 4, p. 595-603, 2007.

CHEN, Jiaxin et al. Effect of paraquat on cytotoxicity involved in oxidative stress and inflammatory reaction: A review of mechanisms and ecological implications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 224, p. 112711, 2021.

DAMASCENO, D. C., Volpato, G. T., Calderon, I. M. P., & Rudge, M. V. C. (2002). Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, 5(5), 355-361.

DAR, Owais; COWIE, Martin R. Acute heart failure in the intensive care unit: epidemiology. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. S3-S8, 2008.

DI LULLO, Luca et al. Cardiorenal syndrome in acute kidney injury. In: Seminars in nephrology. **WB Saunders**, 2019. p. 31-40.

DINIS-OLIVEIRA, RJ1 et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. 1, p. 13-71, 2008.

FEHER, Joseph J. **Quantitative human physiology: an introduction**. Academic press, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GAWARAMMANA, I. B., & Buckley, N. A. (2011). Medical management of paraquat ingestion. **British journal of clinical pharmacology**, 72(5), 745-757.

GE, W., Zhang, Y., Han, X., Ren, J., 2010. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates paraquat-induced myocardial geometric and contractile alteration: role of ER stress. **Free radical biology & medicine** 49, 2068-2077

GRUBMEYER, Ch; PENEFSKY, H. S. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 8, p. 3718-3727, 1981.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E.. **Tratado de fisiologia médica**. 13º ed. ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2017.

HYBERTSON, Brooks M. et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular aspects of medicine**, v. 32, n. 4-6, p. 234-246, 2011.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

INDA-FILHO, Antônio José et al. Perfil epidemiológico de injúria renal aguda em pacientes críticos admitidos em unidades de terapia intensiva: uma coorte brasileira prospectiva. **Brazilian Journal of Nephrology**, 2021.

JAKUBCZYK, Karolina et al. Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. **Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.

JUNHO, Carolina Victória Cruz et al. Heat shock proteins: connectors between heart and kidney. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1939, 2021.

KAYAMA, Yosuke et al. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 25234-25263, 2015.

KIM, H. R. et al. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.

KIM, Su-ji et al. The clinical features of acute kidney injury in patients with acute paraquat intoxication. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 4, p. 1226-1232, 2009.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, Campinas, 16: 433-441, out./dez. 2003.

LEVINE M, Skolnik AB. **Digitalis Glycosides**. In: TINTINALLI JE, Stapczynski J, Ma O, Yealy DM, Meckler GD, Cline DM. eds. Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide. 8^a ed. Nova York: McGraw Hill, 2016.

LIGUORI, I. et al. Bonaduce Det al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging**, v. 13, p. 757-72, 2018.

LIMA, Natalia KS et al. Renal ischemia-reperfusion leads to hypertension and changes in proximal tubule Na⁺ transport and renin-angiotensin-aldosterone system: Role of NADPH oxidase. **Life Sciences**, v. 266, p. 118879, 2021.

LIN, Chih-Chuan et al. Hemodynamic and electromechanical effects of paraquat in rat heart. **PloS one**, v. 16, n. 4, p. e0234591, 2021.

LIU, Yongmin et al. Tempol protects cardiomyocytes from nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 139, n. 1, p. 133-141, 2014.

LIU, Shan. Heart-kidney interactions: mechanistic insights from animal models. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 316, n. 5, p. F974-F985, 2019.

LOGEART, Damien et al. Transient worsening of renal function during hospitalization for acute heart failure alters outcome. **International journal of cardiology**, v. 127, n. 2, p. 228-232, 2008.

LOWRY, OliverH et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, Daniele Pires. **Simulação de Potencial de Ação Espontâneo em Miócitos Cardíacos do Ventrículo Esquerdo de Camundongos**. 89 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Espírito Santo. 2014.

MCCORMACK, Alison L. et al. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 4, p. 1030-1037, 2005.

MEIRA, Eduardo Frizzera. **Efeitos do tratamento crônico com ouabaína por 15 dias sobre a contratilidade cardíaca de ratos**. 2009. 91 p., Dissertação M. Sc., Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF, 2009.

MOHRMAN, David E.; HELLER, Lois Jane. **Fisiologia Cardiovascular (Lange)**.6.ed. AMGH Editora, 2008.

MONTEZANO, A. C.; et al. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, p. 631-641, 2015.

NERI, Margherita et al. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction. **Current vascular pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 26-36, 2015.

NEVES, Josynaria Araújo; NEVES, Josyanne Araújo; OLIVEIRA, Rita de Cássia Meneses. Biomarkers of endothelial function in cardiovascular diseases: hypertension. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 15, p. 224-233, 2016.

THE top 10 causes of death. **World Health Organization**, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>.

Acesso em: 13 de maio. de 2022.

OLIVEIRA, Gláucia Maria Moraes de et al. Estatística Cardiovascular–Brasil 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, p. 115-373, 2022.

OLSZEWER, Efrain. Radicais livres em medicina. In: **Radicais livres em medicina**. 1995. p. 204-204.

OTTOLIA, Michela et al. Na/Ca exchange and contraction of the heart. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 61, p. 28-33, 2013.

PAVAN, Malleshappa. Acute kidney injury following Paraquat poisoning in India. **Iranian journal of kidney diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

PEIXOTO, João Victor Capelli. Acoplamento excitação contração em músculo cardíaco: estudo de revisão, 2012

PERES, Luis Alberto Batista; WANDEUR, Vanessa; MATSUO, Tiemi. Predictors of acute kidney injury and mortality in an Intensive Care Unit. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 37, p. 38-46, 2015.

PETER, Birgit et al. Role of lipid peroxidation and DNA damage in paraquat toxicity and the interaction of paraquat with ionizing radiation. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 4, p. 705-715, 1992.

PINHO, R. A.; et al. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 549-555, 2010.

PIZZINO, G. et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Med Cell Longev**. 2017.

PRECOMA, Dalton Bertolim et al. Updated cardiovascular prevention guideline of the Brazilian Society of Cardiology-2019. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 113, p. 787-891, 2019.

RABÊLO, Luiza A. et al. Desbalance redox: NADPH oxidasa como un objetivo terapéutico en el manejo cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, p. 684-693, 2010.

RONCO, Claudio et al. Cardiorenal syndrome. **Journal of the American college of cardiology**, v. 52, n. 19, p. 1527-1539, 2008.

SAHEERA, Sherin; POTNURI, Ajay Godwin; NAIR, Renuka R. Protective effect of antioxidant Tempol on cardiac stem cells in chronic pressure overload hypertrophy. **Life sciences**, v. 222, p. 88-93, 2019.

SCHMITT, Gabriela Cristina et al. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 235-243, 2006.

SCHRIER, Robert W. et al. Appropriate blood pressure control in hypertensive and normotensive type 2 diabetes mellitus: a summary of the ABCD trial. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 3, n. 8, p. 428-438, 2007.

SCHWINGER, Robert HG et al. The Na, K-ATPase in the failing human heart. **Cardiovascular research**, v. 57, n. 4, p. 913-920, 2003.

SEOK, Su-jin et al. The time between paraquat ingestion and a negative dithionite urine test in an independent risk factor for death and organ failure in acute paraquat intoxication. **Journal of Korean medical science**, v. 27, n. 9, p. 993-998, 2012.

SHOJI, Hiromichi; KOLETZKO, Berthold. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, n. 3, p. 324-328, 2007.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

SILVA, Paulo A. et al. Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e100410, 2014.

SUNTRES, Zacharias E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 65-77, 2002.

TELES, Yanna Carolina Ferreira et al. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. **J Health Scilnst**, v. 33, p. 89-93, 2015.

VIEIRA-FILHO, Leucio D. et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **British journal of nutrition**, v. 111, n. 11, p. 1932-1944, 2014.

WASSERSTROM, J. Andrew; AISTRUP, Gary L. Digitalis: new actions for an old drug. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5, p. H1781-H1793, 2005.

WEBSTER, Angela C. et al. Chronic kidney disease. **The lancet**, v. 389, n. 10075, p. 1238-1252, 2017.

ZAGO, Anderson Saranz; ZANESCO, Angelina. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. e264-e270, 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 09 de agosto de 2017.

Ofício nº 71/17

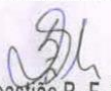
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Leucio Duarte Vieira Filho**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0013/2017**

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito do estresse oxidativo sobre o transporte de Na⁺ do túbulo proximal dependente de ATP e sua regulação dependente do sistema renina-angiotensina tecidual em um modelo murino de lesão renal aguda**”, registrada com o nº **0013/2017** sob a responsabilidade de **Prof. Leucio Duarte Vieira Filho** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 28/02/2019
Espécie/ linhagem/raça	Ratos heterogênicos/Wistar
Nº de animais	24
Peso/Idade	250-300g / 90 dias
Sexo	Machos
Origem	Bioterio do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - CB/UFPE

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691
