UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Curso de Bacharelado em Química

Trabalho de Conclusão de Curso

Efeito do composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida contra o dano oxidativo induzido pelo envelhecimento em Hamsters

Ana Paula Bonato Wille

Pelotas, 2022

Ana Paula Bonato Wille

Efeito do composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida contra o dano oxidativo induzido pelo envelhecimento em Hamsters

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profª. Drª. Ethel Antunes Wilhelm
Coorientadora: Ma. Carolina Cristóvão Martins

Pelotas, 2022

Ana Paula Bonato Wille

Efeito do composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida contra o dano oxidativo induzido pelo envelhecimento em Hamsters

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 24/11/2022

Banca examinadora

.....

Profª Drª Ethel Antunes Wilhelm (Orientadora)

.....

Profª.Drª Roselia Maria Spanevello

.....

Ma. Jaini Janke Paltian

.....

Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira

“Dedico essa monografia a minha mãe, Afrânia, por sempre viver meus sonhos junto comigo”.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por me proteger, iluminar e me conceder sabedoria em todas as etapas da minha vida, permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Afrânia e Dilmar, e aos meus irmãos, Davi, Arthur e Daniel, sem o amor de vocês eu não chegaria até aqui. Obrigada por mesmo de longe serem casa e suporte. Agradeço por me apoiarem nos meus sonhos e viverem eles comigo, mesmo quando isso significava abdicar o de vocês. Serei eternamente grata.

Ao meu melhor amigo e namorado, Denis, sem você nada disso seria possível. Agradeço muito por ser meu porto seguro em todos os aspectos da minha vida, por me incentivar e consolar sempre que necessário. Obrigada pelos conselhos, pelo companheirismo, pelas risadas, pelos abraços, pelo carinho e por todas as noites de estudo. Você e o Thor foram presentes incríveis que a vida me deu.

À minha amiga, Giulia, obrigada por estar presente em todas as etapas da minha graduação, por dividir momentos felizes e tristes, pelos conselhos, por todas as tardes, noites e manhãs de estudo. Você foi essencial nesta conquista, levarei para sempre um pedacinho seu comigo.

À minha orientadora Ethel, agradeço pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pelos conselhos e por todo o auxílio para que eu pudesse concluir esta etapa. Ainda, estendo esse agradecimento a Cristiane pelas oportunidades e a Carolina, por toda a paciência e disposição empregadas na co-orientação para escrita desta monografia.

Agradeço aos meus colegas do LaFarBio por todo acolhimento, pelo aprendizado e pelos momentos de descontração. Em especial gostaria de agradecer a Jaini, a Caren e a Luiza, pelos conselhos, pelo companheirismo e pelo incentivo, vocês foram essenciais para que eu conseguisse concluir esta etapa.

Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Pelotas e aos professores do curso de Bacharelado em Química, pelo ensino gratuito e de qualidade que tive a oportunidade de usufruir durante esse período. Agradeço

aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e ao Biotério Central da UFPel por todo auxílio prestado no decorrer do trabalho.

RESUMO

WILLE, Ana Paula Bonato. **Efeito do composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida contra o dano oxidativo induzido pelo envelhecimento em Hamsters.** 2022. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro das Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

O envelhecimento é um processo multifatorial que causa a diminuição da funcionalidade dos órgãos e tecidos, aumentando a susceptibilidade biológica para o desenvolvimento de patologias, principalmente renal e hepático. Com o envelhecimento, o fígado e o rim se encontram sujeitos a lesões oxidativas ocasionadas pela superprodução de espécies reativas (ER). Frente a isso, destaca-se o composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida (4-APSB), uma potencial estratégia terapêutica com ações antioxidante, antinociceptiva e antiedematogênica. Portanto, neste estudo investigou-se a ação antioxidante do composto 4-APSB frente aos danos oxidativos induzidos pelo processo do envelhecimento no tecido renal e hepático de hamsters machos. Os animais foram divididos em três grupos: **I)** Jovens, **II)** Idosos e **III)** Idosos+4-APSB (n=7-8 animais por grupo). Os animais do grupo **III** receberam o composto 4-APSB (1 mg/kg, i.g.) do 1º até o 8º dia do protocolo experimental. No 12º dia, os animais foram submetidos à eutanásia e as amostras de fígado e rim foram coletadas para determinação do teor de proteínas carboniladas (PCs), dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dos níveis de ER. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), Na^+/K^+ ATPase renal e os níveis de grupamentos tióis não proteicos (NPSH) também foram avaliadas. Os resultados mostraram que o envelhecimento causou aumento dos níveis de ER no rim e no fígado dos animais idosos. Ainda, foi observado um aumento dos níveis de PCs e de TBARS nestes tecidos, indicando o aumento dos danos oxidativos a proteínas e lipídios. Em resposta a isso, no fígado houve aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, enquanto no rim houve inibição da atividade das enzimas CAT, GPx e Na^+/K^+ ATPase e aumento da atividade da SOD. O tratamento com o composto 4-APSB foi capaz de reverter a oxidação de proteínas e reduzir os níveis de ER, além de reestabelecer a atividade da CAT no fígado e no rim de hamsters idosos. Em relação a GPx e a SOD, o tratamento com o composto 4-APSB foi capaz de reestabelecer a atividade das enzimas no tecido hepático e renal, respectivamente. Os dados obtidos sugerem que o composto 4-APSB pode ser utilizado como estratégia para reduzir o dano oxidativo renal e hepático causado pelo envelhecimento. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na ação farmacológica do 4-APSB nos danos oxidativos induzidos pelo envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento, Estresse Oxidativo, Antioxidante, Selênio-Sulfurados.

ABSTRACT

WILLE, Ana Paula Bonato. **Effect of 4-amino-3-(phenylselenyl)benzenesulfonamide against aging-induced oxidative damage in hamsters**. 2022. 63f. Undergraduate thesis – Centro das Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Aging is a multifactorial process that causes a decrease in the functionality of organs and tissues, increasing the biological susceptibility to the development of pathologies, mainly kidney and liver. With aging, the liver and kidney are subject to oxidative damage caused by the overproduction of reactive species (RS). In view of this, the compound 4-amino-3-(phenylselanyl)benzenesulfonamide (4-APSB) stands out as a potential therapeutic strategy with antioxidant, antinociceptive and antiedematogenic actions. Therefore, in the present study we investigated the antioxidant action of 4-APSB against oxidative damage induced by the aging process in male hamsters' kidney and liver tissue. The animals were divided into three groups: **I)** Young, **II)** Old and **III)** Old+4-APSB (n =7-8 animals per group). Group **III** animals received the 4-APSB compound (1 mg/kg, i.g.) from the protocol's 1st to the 8th day. On the 12th day, animals were euthanized and liver and kidney samples were collected to determine the content of carbonyl proteins (PCs), levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and RS levels. The activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), renal Na^+/K^+ ATPase and non-protein thiol groups (NPSH) levels were also evaluated. The results showed that aging caused increased levels of RS in the kidney and liver of aged animals. Furthermore, an increase in PCs and TBARS levels in these tissues was observed, indicating increased oxidative damage to proteins and lipids. In response to this, there was an increase in the activity of SOD, CAT and GPx enzymes in the liver, while in the kidney there was an inhibition of the activity of the CAT, GPx and Na^+/K^+ ATPase enzymes and an increase in SOD activity. Treatment with the 4-APSB compound was able to reverse protein oxidation and to reduce ER levels, in addition to reestablishing CAT activity in the liver and kidney of aged hamsters. Regarding GPx and SOD, treatment with 4-APSB was able to restore enzyme activity in liver and kidney tissue, respectively. The data obtained suggest that the compound 4-APSB can be used as a strategy to reduce renal and hepatic oxidative damage caused by aging. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the pharmacological action of 4-APSB on aging-induced oxidative damage.

Keywords: Aging, Oxidative Stress, Antioxidant, Selenium-Sulfa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de redução do oxigênio no complexo IV durante a respiração celular nas mitocôndrias. 19

Figura 2. Esquema simplificado da geração de ERO a partir da mitocôndria e a ação do sistema de defesa antioxidante composto pelas enzimas SOD, GPx e CAT. 25

Figura 3. Estrutura química do composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida (4-APSB). 31

Figura 4. Esquema do protocolo experimental utilizado. 33

Figura 5. Espectrofotômetro digital da marca Kasuaki. 39

Figura 6. Fluorímetro da marca Shimadzu. 39

Figura 7. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de TBARS em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos 40

Figura 8. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de PCs em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos. 41

Figura 9. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de ER em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos 42

Figura 10. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de NPSH em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos 43

Figura 11. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima SOD em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos 44

Figura 12. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima GPx em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos 45

Figura 13. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima CAT em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos. 46

Figura 14. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase em amostras rim (A) de hamsters jovens e idosos. 47

Figura 15. Representação esquemática do estudo. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais espécies reativas radicalares e não radicalares. .. 18

Tabela 2. Compostos orgânicos de selênio que atuam protegendo os tecidos renal e/ou hepático. 29

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

4-APSB - 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida

ER – Espécies Reativas

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

PCs – Proteínas Carboniladas

SOD – Superóxido Dismutase

GPx – Glutationa Peroxidase

CAT – Catalase

NPSH – Grupamentos tióis não proteicos

Nrf2 - Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

GSH – Glutationa Reduzida

GSSG – Glutationa Oxidada

AGPI – Ácidos Graxos Poli-insaturados

SH – Grupamento Sulfidrila

MDA – Malondialdeído

SUMÁRIO

1. Introdução 14
2. Objetivos 15
2.1 Objetivo geral 15
2.2 Objetivos específicos 15
3. Revisão da literatura 16
3.1 Envelhecimento 16
3.2 Estresse oxidativo 17
3.2.1 Espécies reativas 17
3.2.1.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) 18
3.2.1.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN) 21
3.2.2 Antioxidantes 22
3.2.2.1 Antioxidantes não enzimáticos 22
3.2.2.2 Antioxidantes enzimáticos 23
3.2.3 Lesões oxidativas as macromoléculas 25
3.2.3.1 Peroxidação lipídica 25
3.2.3.2 Oxidação de proteínas 26
3.2.4 Desequilíbrio redox e envelhecimento 27
3.3. Atividade biológica de compostos orgânicos de selênio e sulfonamidas 28
4. Materiais e métodos 31
4.1 Animais 31
4.2 Drogas 32
4.3 Protocolo experimental 32
4.4 Dosagens bioquímicas (*Ex vivo*) 33
4.4.1 Preparo da amostra 33
4.4.2 Determinação de proteínas 34
4.4.3 Envolvimento do estresse oxidativo 34
4.4.3.1 Níveis de TBARS 34
4.4.3.2 Teor de PCs 34
4.4.3.3 Níveis de ER 35
4.4.4 Defesas antioxidantes 35
4.4.4.1 Níveis de NPSH 36
4.4.4.2 Atividade da SOD 36
4.4.4.3 Atividade da GPx 36
4.4.4.4 Atividade da CAT 37

4.4.4.5 Atividade da Na^+/K^+ ATPase renal 37
4.5 Análise estatística 38
4.6 Equipamentos 38
4.6.1 Espectrofotômetro UV-Vis 38
4.6.2 Fluorímetro 39
5. Resultados e Discussão 40
5.1 Resultados 40
5.1.1 Envolvimento do estresse oxidativo 40
5.1.1.1 Níveis de TBARS 40
5.1.1.2 Teor de PCs 41
5.1.1.3 Níveis de ER 41
5.1.2 Defesas antioxidantes 42
5.1.2.1 Níveis de NPSH 42
5.1.2.2 Atividade da SOD 43
5.1.2.3 Atividade da GPx 44
5.1.2.4 Atividade da CAT 45
5.1.2.5 Atividade da Na^+/K^+ ATPase renal 46
5.2 Discussão 47
6. Considerações finais 52
Referências 53

1. Introdução

O envelhecimento é um processo natural, universal, progressivo, multifatorial e dinâmico, caracterizado pelo declínio funcional de células e tecidos[1]. De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAN), 1 a cada 6 pessoas terá 60 anos ou mais em 2030, indicando um crescimento exponencial mundial no número de idosos[2]. Esse crescimento vem sendo debatido, pois o envelhecimento é associado como fator de risco para o desenvolvimento de patologias, dentre elas as renais e hepáticas[3]. De acordo com o *National Council on Aging* (NCOA) (2021), aproximadamente 80% da população com 65 anos ou mais tem pelo menos uma doença crônica e 68% têm pelo menos duas, sendo que as doenças crônicas renais correspondem a 18% desse percentual e as doenças hepáticas, como por exemplo a hepatite (B e C), correspondem a 1%[4].

Apesar dos mecanismos envolvidos no processo do envelhecimento permanecerem pouco elucidados, acredita-se que o aumento dos níveis de espécies reativas (ER) esteja relacionado ao processo de senescência celular[3]. As ER são moléculas altamente instáveis que participam ativamente do metabolismo. Quando as ER se encontram em excesso no organismo, seja pela sua superprodução ou pelo declínio das defesas antioxidantes, instala-se o estresse oxidativo, responsável por causar danos às principais macromoléculas do organismo[5]. O acúmulo de lesões oxidativas decorrentes do processo do envelhecimento desencadeiam alterações estruturais nos tecidos renal e hepático, favorecendo o aparecimento de patologias[6].

Nesse contexto, é imprescindível a busca por novos compostos que possam minimizar os danos oxidativos induzidos pelo processo do envelhecimento. Os compostos orgânicos de selênio vem sendo estudados como possíveis estratégias terapêuticas, pois o selênio é um micronutriente essencial presente em diversas enzimas antioxidantes[7]. LEMOS et al. (2021) e DA MOTTA et al. (2021) descrevem que o composto 7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina (4-PSQ), capaz de diminuir a hepatotoxicidade e nefrotoxicicidade associadas ao tratamento com quimioterápicos em camundongos jovens[8,9]. Ainda, LUCHESE et al. (2020) descreve o 4-PSQ como

uma droga antienvelhecimento, revelando sua ação antioxidante contra os danos oxidativos causados pelo envelhecimento em tecidos renal e hepático de ratos *Wistar*[10]. Somado a isto, os compostos contendo grupamentos sulfonamida também possuem propriedades biológicas já descritas. SOLIMAN et al. (2020) descreve um composto derivado de sulfonamida que apresentou atividade hepatoprotetora em camundongos machos *Swiss*[11].

Assim, considerando as atividades biológicas dos compostos orgânicos de selênio e sulfonamidas, a síntese de novos compostos Selênio-Sulfurados pode ser promissora. Em vista disso, o composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida (4-APSB) destaca-se uma potencial estratégia terapêutica com ação multialvo[12]. Dessa forma, avaliou-se a capacidade antioxidante do composto 4-APSB frente aos danos oxidativos induzidos pelo processo do envelhecimento no tecido hepático e renal de hamsters.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a ação farmacológica do composto 4-APSB sobre os danos oxidativos hepático e renal induzidos pelo processo do envelhecimento em hamsters.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel da senescência sobre os níveis de ER, de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), assim como o teor de proteínas carboniladas (PCs) no fígado e rim de hamsters;
- Comparar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), bem como os níveis dos grupamentos tióis não proteicos (NPSH) no fígado e rim de hamsters jovens e idosos;

- Investigar o papel do envelhecimento sobre a atividade renal da enzima Na^+/K^+ ATPase em hamsters;
- Avaliar a ação antioxidante do composto 4-APSB sobre os marcadores de estresse oxidativo, mencionados anteriormente, no tecido hepático e renal de hamsters idosos.

3. Revisão da literatura

3.1 Envelhecimento

Do ponto de vista histórico, o envelhecimento têm sido uma preocupação significativa da humanidade desde o início da civilização, principalmente devido ao aumento do número de idosos e com isso, a urgência de atender suas necessidades[13]. Dessa forma, no século XX, houve a criação de novas especialidades médicas, a geriatria e a gerontologia, dedicadas ao estudo exclusivo do envelhecimento, dos idosos e dos aspectos sociais e fisiológicos envolvidos neste processo[14]. A criação destas especialidades concedeu maior visibilidade aos idosos e como consequência, aumentou a expectativa de vida e a densidade demográfica desta parcela da população[14].

De acordo com o relatório mundial de envelhecimento e saúde, publicado pela Organização Mundial da Saúde, pela primeira vez na história a população mundial pode esperar viver mais de 60 anos[15]. Considerando o aumento da expectativa de vida e a diminuição da taxa de natalidade, estima-se que até 2060 o Brasil será o sexto país com maior número de idosos no mundo, atingindo um total de 58,2 milhões de pessoas com 65 anos ou mais[16]. Com isso, a manutenção do bem-estar e da qualidade de vida desta população é crucial, dado que o envelhecimento está associado ao início e progressão de diversas patologias[17].

Apesar de ser um processo natural, o envelhecimento é envolto por uma cascata de reações funcionais e estruturais nocivas a órgãos e tecidos, denominadas como efeitos deletérios, que envolvem múltiplos fatores endógenos e exógenos e definem os sinais do “envelhecer”. Da perspectiva fisiológica, essas transformações consistem na alteração da permeabilidade cutânea, na diminuição da capacidade anti-inflamatória e da resposta imunológica, na menor produção de vitamina D e colágeno e na deficiência dos processos de regeneração, cicatrização, percepção sensorial e sudorese[17]. Esses fatores auxiliam na fragilização do organismo e aumentam sua susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças, dentre elas as degenerativas e as neurodegenerativas[18].

Dessa forma, destacam-se as patologias renais e hepáticas, como por exemplo a doença renal crônica e a insuficiência hepática, que estão envolvidas com o processo do envelhecer e atuam debilitando o funcionamento desses órgãos[18]. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento destas patologias ainda são pouco elucidados, entretanto, existem teorias que o relacionam com o acúmulo de lesões oxidativas causadas por espécies reativas durante o estresse oxidativo[19].

3.2 Estresse oxidativo

3.2.1 Espécies reativas

As ER são moléculas orgânicas e inorgânicas instáveis e extremamente reativas que fazem parte do metabolismo natural do organismo. Elas podem ser divididas como radicalares, conhecidas também como radicais livres, e não-radicalares. As espécies radicalares são caracterizadas por conterem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada de valência, o que as torna mais instáveis, reativas e com meia-vida curta[20]. Já as ER não-radicalares,

não possuem elétrons desemparelhados em sua última camada, sendo estas menos instáveis e reativas (Tabela 1)[6].

Tabela 1. Principais espécies reativas radicalares e não radicalares.

ER radicalares	ER não-radicalares
Hidroxil ($OH^{\bullet}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Óxido nítrico ($NO^{\bullet}$)	Oxigênio singleto ($^1O_2$)
Íon peroxil ($HOH^{\bullet}$)	Ozônio (O_3)
Alcoxila ($RO^{\bullet}$)	Peroxinitrito ($ONOO^-$)

Fonte: Barreiros et al., 2006 e Martelli et al., 2014.

No organismo, as ER participam de processos metabólicos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização celular, síntese de substâncias biológicas e defesa celular[19-21]. Entretanto, quando em excesso, essas espécies podem causar lesões oxidativas às macromoléculas do organismo, dentre elas os lipídeos e as proteínas[22].

As ER podem ser subdivididas a partir do átomo no qual o elétron desemparelhado está centrado, sendo eles o nitrogênio e o oxigênio. Quando é no oxigênio, a espécie reativa é denominada como espécie reativa de oxigênio (ERO), enquanto no nitrogênio são denominadas espécies reativas de nitrogênio (ERN)[23].

3.2.1.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

O oxigênio é um elemento essencial para o funcionamento do organismo, pois participa ativamente na oxidação de compostos orgânicos e no metabolismo energético[24]. Uma pequena parcela deste oxigênio é parcialmente reduzido e produz inúmeras espécies altamente reativas, as ERO. Essa redução ocorre

principalmente na mitocôndria, durante o processo de respiração celular (Figura 1)[25].

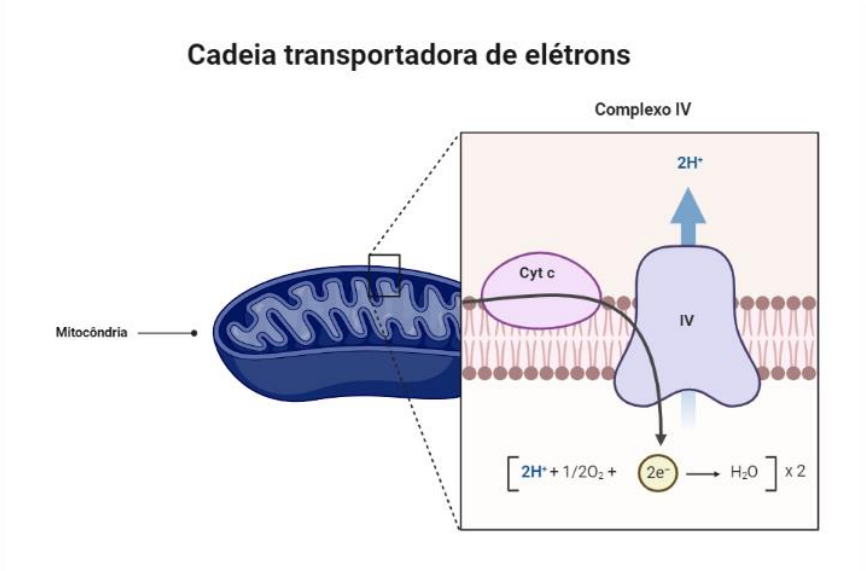


Figura 1. Via de redução do oxigênio no complexo IV durante a respiração celular nas mitocôndrias.

Fonte: Autora.

Na cadeia transportadora de elétrons, etapa final da respiração celular, o oxigênio molecular (O_2) recebe quatro elétrons do complexo IV (citocromo-oxidase), advindos do citocromo c, sendo reduzido a água. Entretanto, o processo de transferência de elétrons entre os complexos presentes na cadeia respiratória envolve o radical ubiquinona ($^{\bullet}Q^{-}$) como intermediário. Este radical pode passar um elétron diretamente ao O_2, formando o radical $O_2^{\bullet -}$ (Equação 1)[26].

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -} \qquad (1)$$

O radical $O_2^{\bullet -}$ é um agente redutor formado em todas as células aeróbicas. É instável em meio aquoso e possui meia-vida de milissegundos, o que dificulta sua travessia pela membrana[26,27]. O radical $O_2^{\bullet -}$ participa de processos metabólicos essenciais para o organismo, como na liberação de Fe^{2+} de proteínas férricas e na proteção durante infecções virais, bacterianas e

fúngicas[26]. A formação deste radical desencadeia a produção de diversas outras ER, mais citotóxicas e reativas, dentre eles $^{\bullet}OH$, $^{1}O_2$ e $ONOO^-$ [27].

O radical $^{\bullet}OH$ é o mais reativo do organismo, pois possui a menor meia-vida entre as ERO, cerca de 10^{-9} segundos. Por conta disso, este radical causa lesões oxidativas ao RNA, DNA, proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e da mitocôndria. A formação do radical $^{\bullet}OH$ pode ocorrer por duas vias, por meio da reação de Fenton (Equação 2) ou pela interação do H_2O_2 com o radical $O_2^{\bullet -}$, na presença de metais de transição como o Cu^+ e o Fe^{2+}, ou da enzima mieloperoxidase (Equação 3)[23].

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^- \qquad (2)$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\bullet} + HO^- + O_2 \qquad (3)$$

Diferente do radical $^{\bullet}OH$, o H_2O_2 é uma ERO mais estável e menos reativa frente a moléculas orgânicas. O H_2O_2 atua nos sistemas biológicos na sinalização celular e na defesa contra patógenos, através da oxidação de resíduos de cisteínas. A toxicidade desta ERO está associada à sua capacidade de transpor membranas e assim gerar radicais $^{\bullet}OH$. Além disso, é responsável por inativar enzimas, degradar proteínas, como hemoglobina e citocromo c, oxidar moléculas, como o piruvato e o α-cetoglutarato e macromoléculas, como os lipídeos. A formação do H_2O_2 ocorre principalmente pela dismutação do radical $O_2^{\bullet -}$ pela ação de enzimas antioxidantes, como também pela β-oxidação de ácidos graxos[24,25].

Além de fontes endógenas, as ERO podem ser formadas a partir de fontes exógenas, que atuam viabilizando o aumento endógeno dos níveis de ERO. Dentre os fatores ambientais que influenciam na formação de ERO estão a luz ultravioleta, radiações ionizantes, poluentes da atmosfera, tabaco, poluentes químicos, solventes e pesticidas. Já os fatores dietéticos incluem hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aditivos alimentares[28].

As ERO podem exercer efeitos deletérios sobre todas as macromoléculas do organismo. Entretanto, os lipídeos são os mais atingidos, por meio do processo denominado peroxidação lipídica, que acarreta a alteração de sua estrutura e da permeabilidade da membrana plasmática[29].

3.2.1.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

O óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) é a ER primordial para a formação de uma gama de ERN. Por possuir somente um elétron desemparelhado, o $NO^{\bullet}$ pode atuar tanto como doador de elétrons (oxidante) quanto com receptor de elétrons (antioxidante)[30]. Sua produção intracelular pode ocorrer por meio de um grupo de enzimas denominadas como óxido nítrico sintases (NOS), na presença de arginina, oxigênio e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), ou por fagócitos, durante processos de infecção e inflamação. Esta ER desemprenha um papel fundamental na fisiologia normal, principalmente em processos homeostáticos, sendo que algumas de suas funções consistem na neurotransmissão, dilatação de vasos sanguíneos, relaxamento do tecido muscular liso e participação na resposta imune[31]. A toxicidade do $NO^{\bullet}$ está associada a capacidade de reagir com o radical $O_2^{\bullet -}$ e produzir outras ERN, como o $ONOO^-$ (Equação 4)[13].

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow ONOO^- \qquad (4)$$

O $ONOO^-$ é a principal fonte de danos oxidativos à aminoácidos, pois atua inativando enzimas e comprometendo a função de proteínas por meio de reações de nitrosação. Pelo mesmo mecanismo, a ERN causa danos as bases nitrogenadas do DNA, em especial a guanina, ocasionando a formação da 8-nitroguanina, além de causar a oxidação da hemoglobina formando a metahemoglobina, prejudicando a oxigenação dos tecidos[31].

Além da reação com o radical $O_2^{\bullet -}$, o $NO^{\bullet}$ também pode reagir com o O_2, formando o NO_2, que pode reagir com outra molécula de NO_2, ou com o $NO^{\bullet}$, formando trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) (Equação 5) e o tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4) (Equação 6), respectivamente[32]. Ambas as moléculas em meio aquoso podem formar íons nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-), que reagem com os ácidos gástricos e formam o ácido nitroso (HNO_2), que causa danos as bases do DNA[33].

$$^{\bullet}NO + {}^{\bullet}NO_2 \rightleftharpoons N_2O_3 + H_2O \longrightarrow 2NO_2^- + 2H^+ \qquad (5)$$

$$NO_2 + NO_2 \rightleftharpoons N_2O_4 + H_2O \longrightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H^+ \qquad (6)$$

Assim como as ERO, as ERN também podem ser formadas a partir de fontes exógenas, como exposição à fumaça de cigarro, radiação solar ou ionizante e poluição ambiental[33].

3.2.2 Antioxidantes

A sucessiva exposição do organismo a ER levou-o a criar mecanismos de defesa para eliminação destes agentes deletérios. Como consequência da evolução surgiram as defesas antioxidantes, que são substâncias responsáveis por atrasar ou inibir as taxas de oxidação, mesmo que presentes em baixas concentrações. Estas defesas podem ser classificadas como enzimáticas e não enzimáticas e agem sinergicamente para promover a proteção da célula contra os danos oxidativos[34,35].

Os antioxidantes podem atuar por meio de diferentes mecanismos de proteção: o preventivo, impedindo a formação das ER e atuando como primeira linha de defesa; o interceptor, por meio da retenção das ER geradas por fontes endógenas ou exógenas, evitando a ocorrência de danos às macromoléculas; e o reparador, por meio do reparo das lesões causadas pelas ER, bem como a inativação de seus metabólitos[35].

3.2.2.1 Antioxidantes não enzimáticos

O grupo dos antioxidantes não enzimáticos incluem os compostos de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico (vitamina C), o α-tocoferol (vitamina E), os flavonóides e a glutationa[34,36]. O ácido ascórbico possui

capacidade antioxidante em meio aquoso, principalmente através da eliminação de ERO. Pode atuar em conjunto com a vitamina E, com carotenóides ou com enzimas antioxidantes. Além disso, possui capacidade de reduzir o radical livre do α-tocoferol, regenerando sua estrutura, e aumentar os níveis de glutationa. Já o α-tocoferol exerce sua ação antioxidante em meio lipossolúvel, reagindo com ácidos graxos poliinsaturados e com radicais peroxil, sendo eficaz contra as reações em cadeia da peroxidação lipídica[36].

A glutationa, conhecida também como tripeptídeo glutationa (GSH), formada pelo glutamato, cisteína e glicina, é o principal antioxidante tiol não proteico. Atua principalmente como cofator enzimático, no transporte de aminoácidos por meio da membrana e na regeneração das vitaminas E e C, além de eliminar diretamente algumas ERO. A glutationa está presente em abundância principalmente no citosol, núcleo e mitocôndria, podendo ser encontrada na sua forma reduzida (GSH) ou na sua forma oxidada (GSSG). A relação entre GSH/GSSG é um parâmetro de medida do estresse oxidativo[35].

Os flavonóides são importantes antioxidantes e quelantes advindos de metabólitos vegetais, constituídos por anéis fenólicos e piranos. Suas propriedades biológicas estão intrinsicamente associadas a seus grupamentos hidroxila, o que determina sua ação como antioxidante ou como modulador enzimático. Deste modo, os flavonóides podem atuar contra o estresse oxidativo através da quelação de metais, na eliminação de radicais peroxil e na inibição da lipoperoxidação[34].

Existem ainda inúmeros outros antioxidantes não-enzimáticos que atuam protegendo o organismo da ação de ERO e ERN, denominados nutrientes minerais essenciais. Como exemplo têm-se o Zinco, o Cobre, o Selênio, o Ferro e o Manganês, que participam do sistema antioxidante associados a enzimas[35].

3.2.2.2 Antioxidantes enzimáticos

As defesas antioxidantes enzimáticas estão presentes em grande quantidade no organismo, distribuídas tanto no meio intracelular quanto no

extracelular. Como exemplos dessas defesas têm-se as enzimas endógenas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase (CAT)[36].

As metaloenzimas SOD possuem papel essencial na sobrevivência das células aeróbicas e estão presentes em várias formas no organismo humano. As isoformas SOD 1 e SOD 3 encontradas no citosol e no líquido extracelular, respectivamente, utilizam como cofator o cobre e o zinco. Enquanto a SOD 2, presente nas mitocôndrias, utiliza o manganês. Essas enzimas realizam a reação de dismutação do radical $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e O_2, que é responsável pela formação das demais ERO. O H_2O_2 formado pode então ser transformado em H_2O e O_2 tanto pela GPx, quanto pela CAT[37].

A enzima GPx reduz uma variedade de hidroperóxidos (ROOH e H_2O_2) de forma indireta em H_2O e O_2, usando-os como substrato para a oxidação da GSH em GSSG, prevenindo danos oxidativos em tecidos. A GPx possui em seu sítio ativo um resíduo de selenocisteína, contendo um átomo de selênio por subunidade da enzima. A atividade a GPx demonstra ter correlação positiva com a ingestão dietética do mineral, logo, a deficiência de selênio no organismo pode levar a diminuição da atividade da enzima[38].

A CAT, ao contrário da GPx, é uma enzima específica para a conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2. Pode ser encontrada principalmente nos peroxissomos das células aeróbicas hepáticas e nos eritrócitos. Possui uma constante de velocidade elevada, na ordem de aproximadamente 10^7, indicando sua rapidez na redução do H_2O_2. Somado a isso, também possui uma das maiores taxas de renovação entre as enzimas, podendo converter cerca de 6 milhões de moléculas de H_2O_2 a cada minuto[39]. A figura 2 demonstra como as principais enzimas antioxidantes endógenas se relacionam no organismo.

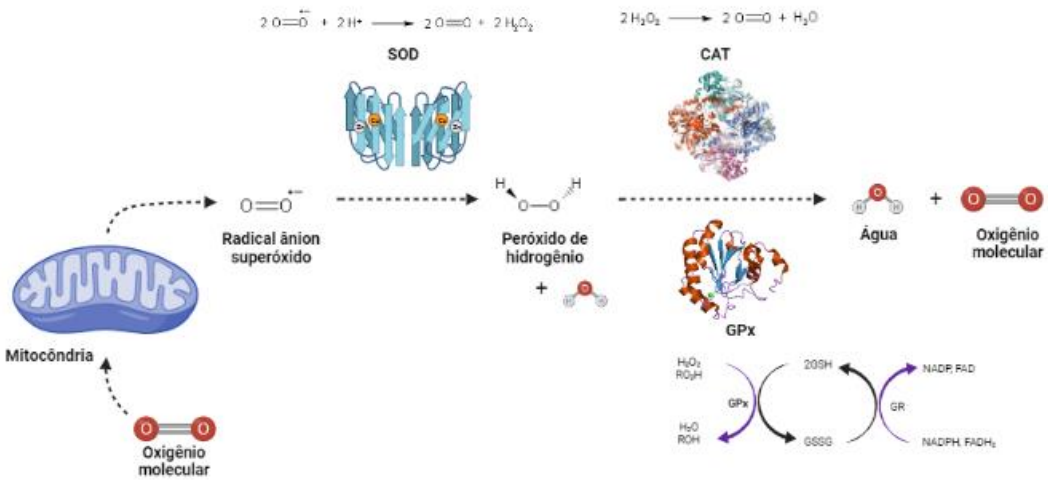


Figura 2. Esquema simplificado da geração de ERO a partir da mitocôndria e a ação do sistema de defesa antioxidante composto pelas enzimas SOD, GPx e CAT.

Fonte: Autora.

3.2.3 Lesões oxidativas as macromoléculas

3.2.3.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um dos principais danos as macromoléculas causadas pelas ER. Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), com elevado número de ligações duplas, como é o caso do ácido araquidônico, linoleico e linolênico, são mais suscetíveis aos danos oxidativos[40]. O processo de lipoperoxidação pode ser definido como uma cascata de reações radicalares resultante da ação de ER, principalmente os radicais hidroxila e hidroperoxila, sobre os AGPI. Esses radicais atuam por meio de três etapas, a iniciação, a propagação e a terminação[41,42].

Na iniciação, o AGPI sofre ação de uma ER capaz de capturar um átomo de hidrogênio do grupo, formando um radical de carbono. Esse radical passa por um rearranjo formando um dieno conjugado, ou, em meio aeróbico, se combina

com o oxigênio originando o radical peroxila. Esse radical pode abstrair um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando outros radicais de carbono e assim dando continuidade a etapa de propagação. Nesta etapa, formam-se os radicais peróxido lipídicos, pela reação do radical peroxila com um hidrogênio, que são oxidados a hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Esses hidroperóxidos sofrem novas reações de fragmentação oxidativa, gerando aldeídos α,β-insaturados, como é o caso do malondialdeído (MDA), o 4-hidroxinonenal (4-HNE) ou a acroleína, que servem como indicadores de lipoperoxidação . A etapa de terminação ocorre pela aniquilação dos radicais, formando produtos não radicalares[43,44].

A formação dos produtos de peroxidação lipídica afeta diretamente as propriedades físicas das membranas celulares, por meio da interrupção da assimetria lipídica que gera despolarização da membrana, aumentando sua fluidez e permeabilidade. Além disso, por sua elevada reatividade, a maioria dos produtos da peroxidação lipídica podem reagir com outras macromoléculas do organismo, como por exemplo outros lipídeos e proteínas, promovendo a formação de adutos e levando a distúrbios no metabolismo celular[44].

3.2.3.2 Oxidação de proteínas

As proteínas são os componentes mais abundantes dos sistemas biológicos e desempenham um papel essencial em diversas funções celulares, desde a mitose celular até a participação em sistemas de transporte. Com isso, essas macromoléculas estão frequentemente expostas a ER que causam modificações oxidativas estruturais. Dentre essas modificações estão a perda do grupamento sulfidrila (SH), a formação de proteínas carboniladas e a formação de adutos de peroxidação lipídica[45].

As modificações oxidativas mencionadas podem ocorrer pela ação de uma série de ERO e ERN, bem como por outros subprodutos do estresse oxidativo. Quando uma proteína funcional perde seu grupamento SH ou sofre carbonilação, consequentemente, ela também pode perder sua capacidade catalítica, antioxidante e algumas de suas funções específicas (ligações com

metais e aminoácidos). Os peróxidos formados como subprodutos da oxidação de proteínas podem atuar oxidando outras macromoléculas, como o DNA, formando ligações cruzadas DNA-proteínas e outras mutações[46,47].

A formação de derivados de carbonil proteicos pode ocorrer a partir de modificações químicas diretas em resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina, ou por reações secundárias de resíduos de cisteína, histidina ou lisina. Não é possível distinguir os produtos formados a partir de oxidações diretas ou secundárias, por isso, utiliza-se os níveis gerais de proteínas carboniladas (PCs) como marcadores do estresse oxidativo. Os níveis de PCs vêm sendo relacionados a uma série de doenças associadas ao envelhecimento, como por exemplo a doença de Alzheimer, a doença pulmonar crônica, a insuficiência renal crônica e a diabetes[48].

3.2.4 Desequilíbrio redox e envelhecimento

Para que a homeostase do organismo seja conservada é necessário que haja equilíbrio entre a produção das ER e a atividade das defesas antioxidantes. Quando a produção destas espécies supera a capacidade das defesas antioxidantes em eliminá-las, instala-se o estresse oxidativo. Neste quadro, as ER podem atuar danificando as macromoléculas do organismo, dentre elas os lipídios, as proteínas e o DNA, levando a modificações oxidativas estruturais e, em últimos casos, sua inativação[49]. O acúmulo de danos oxidativos no organismo é associado ao aparecimento de doenças degenerativas, que estão intrinsecamente associadas ao envelhecimento[50].

A teoria dos radicais livres do envelhecimento proposta pelo gerontologista Denham Harman em 1956, postula que o envelhecimento é um processo decorrente do acúmulo de danos oxidativos resultantes de reações radicalares e seus metabólitos[50]. Nesta teoria, os danos oxidativos são possíveis causadores das denominadas marcas da idade, dentre elas as quatro marcas primárias (instabilidade genômica, atrito de telômeros, alterações epigenéticas e perda de proteostase), as três marcas antagônicas (desregulação de nutrientes,

disfunção mitocondrial e senescência celular) e as duas marcas integrativas (exaustão das células-tronco e comunicação intracelular alterada)[51]. O status antioxidante de um organismo, ou seja, a qualidade e a quantidade das defesas antioxidantes podem determinar a frequência e a rapidez com que essas marcas se expressarão[51].

Como consequência do processo de envelhecimento, há o declínio geral da capacidade das defesas antioxidantes do organismo. Acredita-se que esse fenômeno ocorra principalmente pelo envelhecimento estar associado a deterioração da síntese proteica e da capacidade de diferenciação celular. Sendo assim, o aumento de ER causa o consumo e degradação dos antioxidantes, que provavelmente não são repostos durante o processo do envelhecimento, aumentando a fragilização do organismo[49,50].

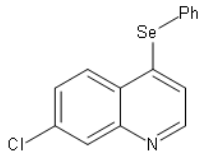
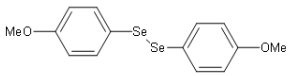
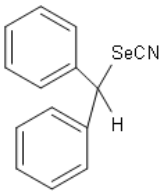
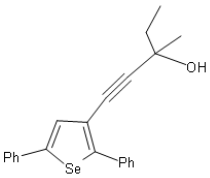
3.3. Atividade biológica de compostos orgânicos de selênio e sulfonamidas

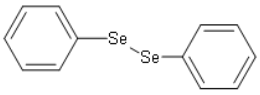
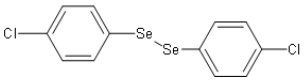
Nos últimos anos, pesquisadores têm buscado desenvolver compostos orgânicos que possuam um ou mais grupos funcionais, com o objetivo de maximizar suas propriedades biológicas. Em especial, têm-se voltado a atenção para a síntese de compostos organoselênio, pois o selênio é um micronutriente essencial para o funcionamento do organismo. Este oligoelemento está envolvido no processamento da resposta imune, na manutenção das funções cardiovascular e cerebral, assim como na homeostasia da sinalização redox, principalmente por estar presente em enzimas e proteínas, como é o caso da GPx e da selenocisteína[52].

Diversos estudos já publicados na literatura com compostos orgânicos de selênio demonstram suas ações antioxidantes, ansiolíticas, anti-inflamatórias, imunossupressoras, antivirais, antinociceptivas, antiedematogênicas, neuroprotetoras e antimicrobianas [53-63]. Além disso, destaca-se também que esses compostos apresentam efeitos farmacológicos relevantes em doses baixas e apresentam pouca ou nenhuma toxicidade, sendo possíveis estratégias

terapêuticas multialvo[64]. Somado a isto, os compostos orgânicos de selênio podem atuar revertendo os danos oxidativos nos tecidos renal e/ou hepático, que podem ser causados por diversos fatores, como por exemplo pelo envelhecimento ou pelo tratamento com quimioterápicos em roedores, como evidenciado por estudos publicados por diferentes grupos de pesquisa (Tabela 2)[10,65,66,67,68,69,70].

Tabela 2. Compostos orgânicos de selênio que atuam protegendo os tecidos renal e/ou hepático.

Estrutura química	Espécie	Dose (nº administrações)	Efeito	Referência
 7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina	Rato	5 mg/kg (7)	Anti-envelhecimento	LUCHESE, et al. 2020
 *p*-metoxil-difenil disseleneto	Camundongo	50 e 100 mg/kg (6)	Nefroprotetor	WILHELM, et al. 2012
 Difenilmetil selenocianato	Camundongo	3 mg/kg (9)	Nefroprotetor	CHAKRABORTY, et al. 2011
	Rato	25 mg/kg (1)	Hepatoprotetor	WILHELM et al. 2010

3-Alquinil selenofeno				
 Disseleneto de difenila	Rato	100 µmol/kg (1)	Hepatoprotetor	BORGES et al. 2005
	Camundongo	1 mg/kg (35)	Hepatoprotetor e nefroprotetor	FREITAS et al. 2009
 4,4 – Dicloro-difenil disseleneto	Rato	10 mg/kg (7)	Hepatoprotetor	HECK 2016

Assim como os compostos orgânicos de selênio, as sulfonamidas também possuem propriedades biológicas já elucidadas na literatura. Os registros da atividade farmacológica das sulfas surgiram em meados de 1938, com a sulfapiridina, um fármaco capaz de tratar a pneumonia pneumocócica e com um amplo espectro antimicrobiano. Com o passar dos anos, foram sintetizados os fármacos sulfatiazolina e sulfadiazina, que atuaram melhorando alguns dos efeitos adversos das sulfas mais antigas[71]. Atualmente, inúmeros estudos publicados descrevem as ações antitumorais, hipoglicemiantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e antipsicóticas das sulfonamidas[72-75].

A síntese de compostos contendo frações organoselênio e sulfonamidas levam a fármacos com atividades biológicas promissoras, como por exemplo o 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida (4-APSB). O 4-APSB (Figura 3) é um composto orgânico de selênio que contém em sua estrutura um grupamento benzenosulfonamida. Estudos recentes demonstram que este composto possui propriedades antioxidantes, antiedematogênicas e antinociceptivas. Em testes com camundongos machos da raça *Swiss*, o composto demonstrou atenuar a hiperalgesia mecânica induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA), além de exercer ação antinociceptiva no teste da placa quente, principalmente na dose de 1 mg/kg, sem influenciar na atividade locomotora e exploratória dos animais[12].

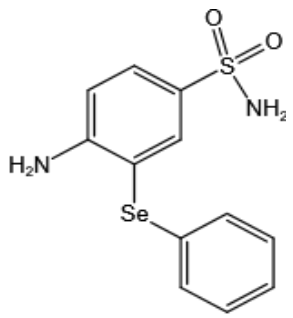


Figura 3. Estrutura química do composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida (4-APSB).

Como observado, o crescente estudo sobre compostos orgânicos Selênio-Sulfurados tem despertado a curiosidade sobre suas possíveis ações farmacológicas. Em especial, têm-se buscado estudar a possível ação antioxidante do composto 4-APSB frente a danos oxidativos nos tecidos renal e hepático[12].

4. Materiais e métodos

4.1 Animais

Os experimentos foram realizados em hamsters machos adultos, com 2 meses de idade, e hamsters machos idosos, com 20 meses de idade, advindos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os animais foram alojados em gaiolas com livre acesso a água e comida. Foram mantidos em uma sala sob ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas as 7:00 am), à temperatura (22 ± 2 ºC) e umidade (75 ± 5 %) constantes. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPel (CEUA 4506-2017), bem como estão de acordo com *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH n° 80-23, revisadas em 1996). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais

utilizados e seu desconforto durante e após a realização do protocolo experimental.

4.2 Drogas

O composto 4-APSB foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da UFPel, de acordo com a metodologia de SACRAMENTO et al., (2022)[12]. O composto foi obtido com um rendimento de 80% e as análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C mostraram dados analíticos e espectroscópicos em total concordância com a estrutura química atribuída.

Os demais reagentes utilizados para a realização dos ensaios eram de grau analítico e foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

4.3 Protocolo experimental

Para a realização do protocolo experimental (Figura 5), conforme LUCHESE et al. (2020)[10], os hamsters foram divididos em três grupos experimentais, sendo eles **I)** Jovens, **II)** Idosos e **III)** Idosos+4-APSB, com 7-8 animais por grupo. Os animais do grupo **III** receberam o composto 4-APSB na dose de 1 mg/kg, diluído em óleo de canola, pela via intragástrica (i.g), do 1º até o 8º dia do protocolo experimental. No 12º dia, os animais foram submetidos a eutanásia, e as amostras de fígado e rim foram coletadas para posteriores análises.

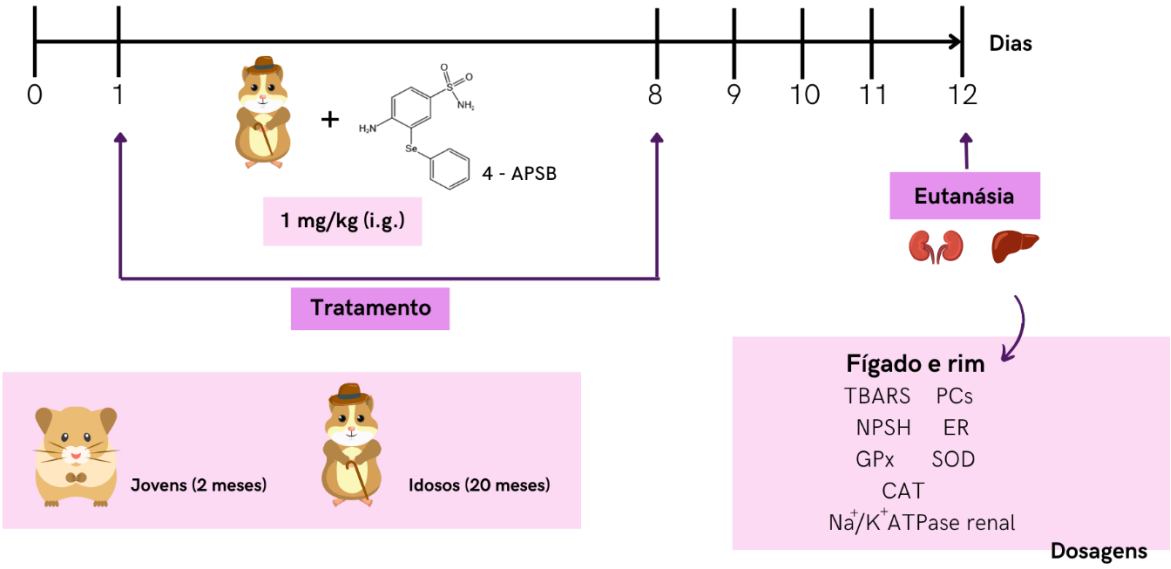


Figura 4. Esquema do protocolo experimental utilizado.

Fonte: Autora.

4.4 Dosagens bioquímicas (*Ex vivo*)

4.4.1 Preparo da amostra

No dia da eutanásia os animais foram anestesiados com isoflurano e posteriormente coletou-se as amostras de interesse. As amostras de fígado e rim foram dissecadas e em seguida lavadas com solução salina fria (0,9%). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com Tris-HCl 50 mM pH 7,4, na proporção de 1:10, e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante (S_1) para determinar a quantidade de proteínas, níveis de TBARS, níveis de ER, atividade das enzimas SOD, GPx, CAT e Na^+/K^+ ATPase e níveis de NPSH.

4.4.2 Determinação de proteínas

A quantidade de proteína dos tecidos foi dosada de acordo com BRADFORD (1976)[76], por meio da adição de 2,5 mL de Comassie e 45 µL de Tris HCl 50 mM pH 7,4 a 5 µL do S_1. Após 10 minutos, a leitura foi realizada a 595 nm e o resultado foi expresso em mg/mL, usando albumina de soro bovino (1 mg/mL) como padrão.

4.4.3 Determinação de parâmetros do estresse oxidativo

4.4.3.1 Níveis de TBARS

Os níveis de TBARS foram determinados a partir de OHKAWA et al. (1979)[77]. Neste ensaio, foram adicionados 200 µL do S_1, 500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8% (TBA), 500 µL de tampão ácido acético pH 3,4, 100 µL de água e 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%. O sistema foi incubado durante duas horas a 95 °C e a absorbância foi medida a 532 nm. O resultado foi expresso em nmol de MDA/mg de proteína e corresponde a medida de lipoperoxidação dos tecidos analisados.

4.4.3.2 Teor de PCs

O teor de proteínas modificadas oxidativamente foi quantificado através de YAN et al. (1995)[78] e LEVINE et al. (1990)[79]. Inicialmente o tecido foi homogeneizado com Tris HCl 10 mM pH 7,4 na proporção de 1:8 (vol/vol) e diluído na proporção de 1:10 com o mesmo tampão. Em seguida, 1 mL da

diluição foi misturada com 200 µL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM ou 200 µL de HCl 2 M. Após, os tubos foram incubados, a temperatura ambiente, durante 1 hora no escuro, sendo submetidos a agitação a cada 15 minutos.

Em sequência, adicionou-se aos tubos 500 µL do tampão de desnaturação (tampão fosfato de potássio 150 mM pH 6,8 contendo 3% de SDS), 1,5 mL de hexano (99,5%) e 1,5 mL de etanol (95,5%). Os tubos foram submetidos novamente a agitação durante 40 segundos e centrifugação, durante 15 minutos a 3000 rpm. Ao final da centrifugação, os pellets formados foram lavados duas vezes com 1 mL de acetato de etila/etanol 1:1 (vol/vol) e ressuspensos em 1 mL de tampão de desnaturação. A absorbância foi medida a 370 nm. O total de proteínas carboniladas foi expresso em nmol de teor de carbonila/mg de proteína, utilizando para o cálculo o coeficiente de extinção molar de 22.000 M^{-1}/cm.

4.4.3.3 Níveis de ER

Os níveis de ER foram determinados a partir de LOETCHUTINAT et al., (2005)[80], por meio de um método espectrofluorimétrico, com incubação durante 60 minutos, de 20 µL de S_1 com 2460 µL de Tris HCl pH 7,4 10 mM e com 20 µL de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA). A avaliação da quantidade de ER intracelular ocorreu pela oxidação do DCFH-DA em diclorofluroscеína fluorescente (DCF). Para detecção do DCF utilizou-se a emissão da intensidade de fluorescência de DCF capturada em 525 nm e a extinção em 488 nm. O resultado foi expresso como unidade arbitrária de fluorescência (UF).

4.4.4 Defesas antioxidantes

4.4.4.1 Níveis de NPSH

Os níveis dos grupamentos tióis não proteicos foram analisados pelo método de ELLMAN (1959)[81]. Adicionou-se a 100 µL do S_1, 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm e o pellet formado pela desnaturação foi descartado, sendo somente o sobrenadante utilizado.

À uma alíquota de 100 µL do sobrenadante adicionou-se 850 µL de TFK 1 M pH 7,4 e ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A leitura foi realizada a 412 nm e o resultado foi apresentado como nmol de NPSH/ g de tecido.

4.4.4.2 Atividade da SOD

A atividade da enzima SOD foi avaliada através de método descrito por MISRA e FRIDOVICH (1972)[82], o qual baseia-se na capacidade da enzima de inibir a auto-oxidação da epinefrina. Para isso, o S_1 (0, 6, 12 ou 18 µL) foi adicionado a diferentes volumes (260, 254, 248, 242 µL) de tampão de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,05 mol/L, respectivamente. A adição de 30 µL de epinefrina marcou o início da reação. A reação de cor foi medida espectrofotometricamente a 480 nm e a atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína, sendo U a unidade da enzima definida como a quantidade necessária de enzima para inibir a auto-oxidação da epinefrina em 50% a 26 °C.

4.4.4.3 Atividade da GPx

A atividade da enzima GPx consiste na dismutação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de S_1 a 340 nm. Para isso, de acordo com WENDEL (1981)[83], adicionou-se a 10 µL de S_1, 170 µL do sistema contendo

glutationa reduzida (GSH)/NADPH/glutationa redutase (GR). O início da reação se deu pela adição de 20 µL de H_2O_2, que atua na reação como substrato, sendo reduzido pela GPx e formando a glutationa oxidada (GSSG) a partir da GSH. A GSSG é então novamente regenerada a GSH por ação da GR, as custas de NAPH. Logo, a atividade da enzima pode ser medida indiretamente pelo decaimento de NAPH no meio. O resultado é expresso em nmol/minuto/mg de proteína.

4.4.4.4 Atividade da CAT

A avaliação da atividade da CAT foi realizada conforme AEBI (1984)[84] por meio do monitoramento da taxa de desaparecimento do substrato, H_2O_2 no S_1 a 240 nm, durante um intervalo de 2 minutos. A reação iniciou com a adição de 105 µL de H_2O_2 e de 40 µL de S_1 a um meio contendo 960 µL de tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM pH 7,0. Os resultados foram expressos como unidade (U) CAT/mg de proteína.

4.4.4.5 Atividade da Na^+/K^+ ATPase renal

A atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase renal foi dosada conforme FISKE e SUBBAROW (1925)[85]. Misturou-se 50 µL do S_1 com 380 µL de um sistema contendo NaCl 125 mM, $MgCl_2$ 3 mM, KCl 20 Mm e o tampão Tris-HCl pH 7,4. As amostras foram pré-incubadas durante 10 minutos a 37 °C e a reação foi iniciada com a adição de 50 µL de Adenosina Trifosfato (ATP) 3 mM. Após 30 minutos de incubação a reação foi cessada com 250 µL de ácido tricloroacético (10%) com $HgCl_2$ 10 mM. Ao final da incubação as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e 200 µL do sobrenadante foram repassados para tubos contendo 200 µL de molibdato de amônio 2%, 1300 µL de água e 20 µL de ácido ascórbico. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 650 nm.

Como controle repetiu-se o experimento utilizando ouabaína 0,1 mM (20 µL em cada tubo), que atua inibindo a enzima Na^+/K^+ ATPase.

O cálculo da atividade da enzima foi realizado a partir da diferença entre a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) encontrado após a incubação do ensaio sem ouabaína e com ouabaína, sendo que essa foi expressa em nmol de Pi/min/mg de proteína.

4.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do Software GraphPad Prism ® 8, por meio da análise de variância unidirecional (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) e a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade omnibus de D'Agostino e Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.6 Equipamentos

4.6.1 Espectrofotômetro UV-Vis

Para realizar a medida da absorbância das soluções utilizou-se o espectrofotômetro digital UV Visível da marca Kasuaki (Figura 5), modelo IL-593-BI, que realiza leituras na faixa de comprimento de onda de 190 a 1100 nm. As cubetas empregadas variaram de acordo com o comprimento de onda do ensaio, sendo elas de quartzo (região ultravioleta), vidro e plástico (faixa visível).

Figura 5. Espectrofotômetro digital da marca Kasuaki.

Fonte: DsysLAB.

4.6.2 Fluorímetro

Para a realização das medidas de fluorescência da soluções utilizou-se o Fluorímetro da marca Shimadzu, modelo RF-5301PC (Figura 6), que realiza leituras em uma faixa de varredura de 220 a 990 nm. A cubeta utilizada foi a de quartzo.

Figura 6. Fluorímetro da marca Shimadzu.

Fonte: USP.

5. Resultados e Discussão

5.1 Resultados

5.1.1 Determinação de parâmetros do estresse oxidativo

5.1.1.1 Níveis de TBARS

Na Figura 7A-B é possível observar que os níveis de lipoperoxidação no grupo dos hamsters idosos foram significativamente maiores que no grupo de hamsters jovens, tanto em tecido hepático (Figura 7A) quanto renal (Figura 7B). Os resultados também demonstraram que o tratamento com o composto 4-APSB não foi capaz de reverter a oxidação de lipídios, tanto no fígado quanto no rim de hamsters idosos.

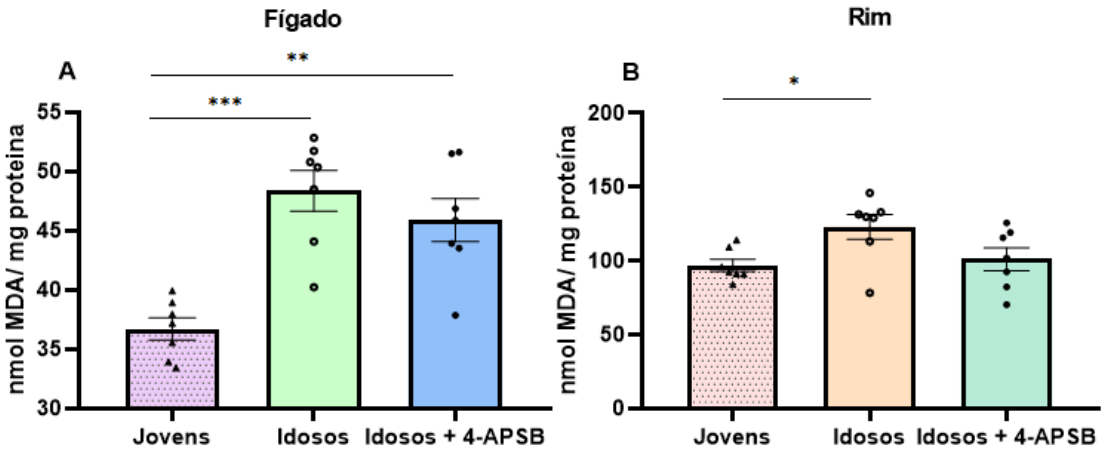


Figura 7. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de TBARS em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001 quando comparados ao grupo dos animais Jovens. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.1.1.2 Teor de PCs

De acordo com os resultados apresentados na Figura 8A-B pode-se constatar que os níveis de proteínas carboniladas foram significativamente maiores no grupo de animais idosos quando comparado ao grupo de animais jovens, tanto no fígado (Figura 8A), quanto no rim (Figura 8B). Dessa forma, pode-se inferir que o processo de envelhecimento causou aumento nos níveis de oxidação de proteínas no fígado e no rim. De forma importante, o tratamento com o composto 4-APSB foi capaz de reduzir os níveis de proteínas carboniladas, tanto no fígado quando no rim de hamsters idosos.

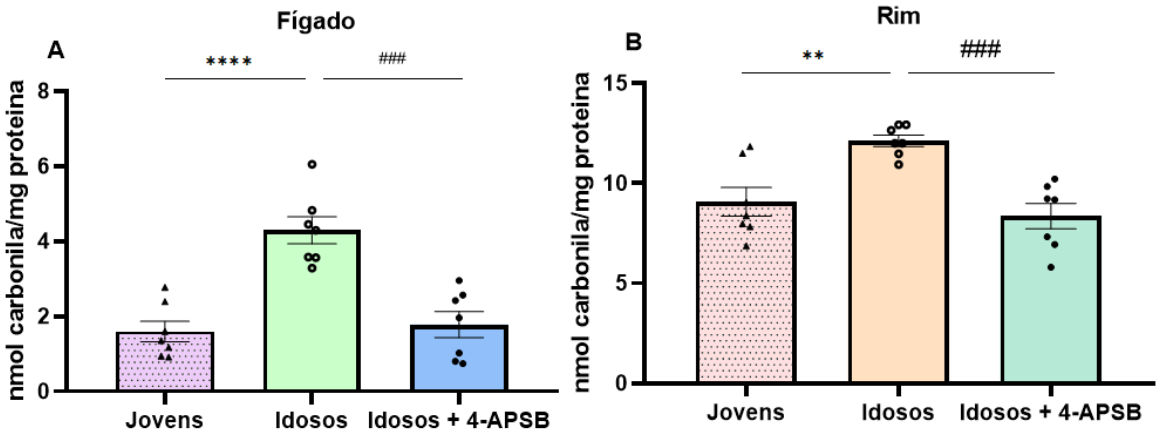


Figura 8. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de PCs em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). (**) p<0,01 e (****) p<0,0001 quando comparados ao grupo dos animais Jovens. (###) p<0,001 quando comparados ao grupo de animais Idosos. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.1.1.3 Níveis de ER

Na Figura 9A-B observa-se que os níveis de ER no tecido hepático (Figura 9A) e renal (Figura 9B) foram significativamente maiores no grupo de hamsters idosos quando comparado aos jovens, evidenciando que o envelhecimento

estimulou a superprodução destas espécies. O tratamento com o composto 4-APSB foi capaz de diminuir significativamente os níveis de ER no rim e no fígado de hamsters idosos.

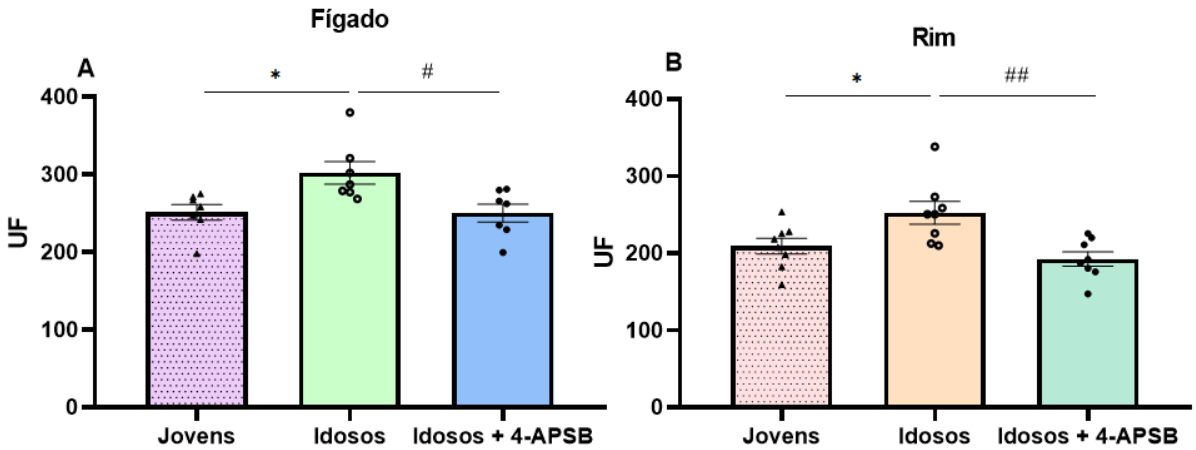


Figura 9. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de ER em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). (*) p<0,05 quando comparados ao grupo dos animais Jovens. (#) p<0,05 e (##) p<0,01 quando comparados ao grupo de animais Idosos. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.1.2 Defesas antioxidantes

5.1.2.1 Níveis de NPSH

Na Figura 10A-B é possível observar que não houve diferença significativa nos níveis de NPSH entre os grupos Jovens, Idosos e Idosos+4-APSB, tanto no fígado (Figura 10A) quanto no rim (Figura 10B) dos animais.

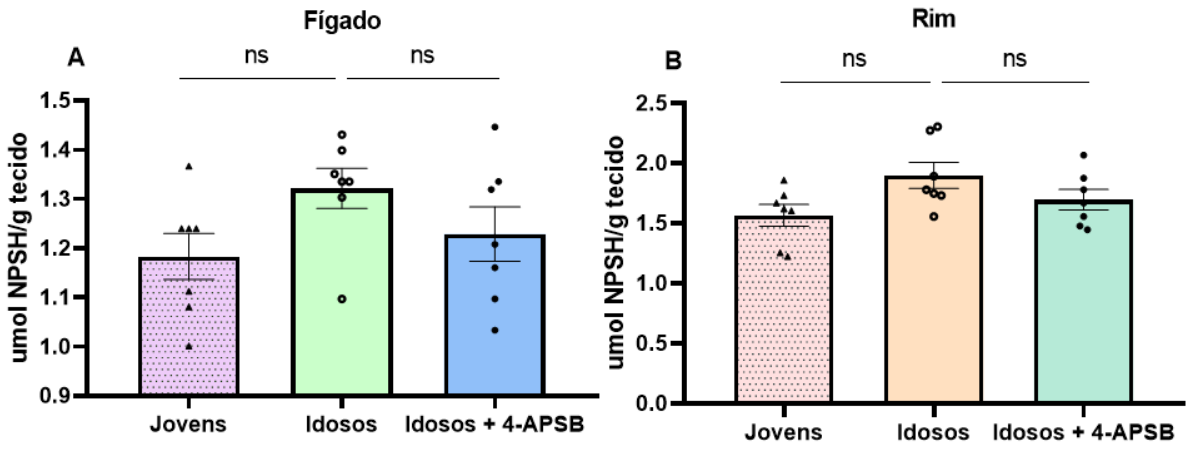


Figura 10. Efeito do composto 4-APSB nos níveis de NPSH em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). O símbolo ns indica não houve diferença significativa entre os grupos. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.1.2.2 Atividade da SOD

Os resultados apresentados na Figura 11A-B demonstram que o envelhecimento causou um aumento na atividade hepática da enzima SOD (Figura 11A), quando comparado ao grupo dos animais jovens. O tratamento com o composto 4-APSB não foi capaz de normalizar a atividade da enzima.

No tecido renal (Figura 11B), o envelhecimento também causou aumento da atividade da enzima SOD no grupo dos hamsters idosos, quando comparado ao grupo dos animais jovens. O tratamento com o composto 4-APSB foi capaz de reestabelecer a atividade dessa enzima.

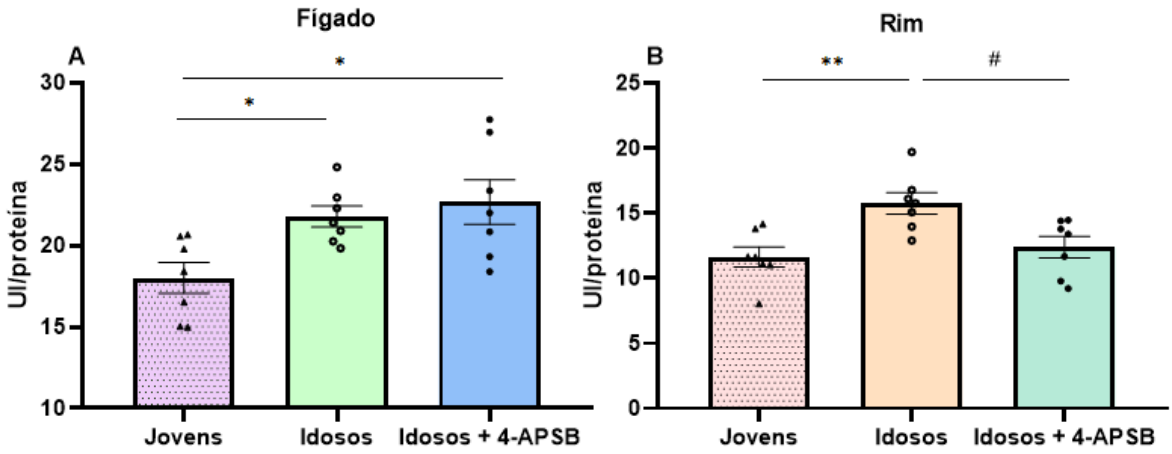


Figura 11. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima SOD em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). (*) p<0,05 e (**) p<0,01 quando comparados ao grupo dos animais Idosos. (#) p<0,05 quando comparados ao grupo de animais Idosos. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.1.2.3 Atividade da GPx

Na Figura 12A-B observa-se que o grupo dos animais idosos apresentou um aumento significativo na atividade da enzima GPx no fígado (Figura 12A) quando comparado ao grupo dos animais jovens. De forma importante, o tratamento com o composto 4-APSB foi capaz de reestabelecer a atividade dessa enzima no tecido hepático.

Entretanto, no tecido renal (Figura 12B), os hamsters idosos apresentaram uma inibição na atividade da enzima GPx quando comparado ao grupo dos animais jovens. Os resultados demonstraram que o tratamento com o composto 4-APSB não foi capaz de reverter a inibição da GPx causada pelo envelhecimento no tecido renal de hamsters idosos.

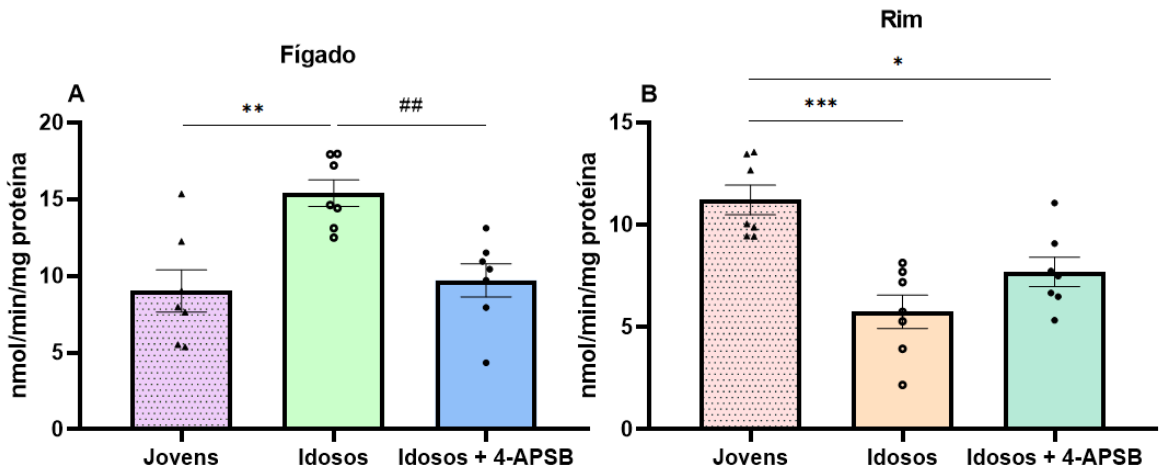


Figura 12. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima GPx em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). (*) p<0,05, (**) p<0,01 e (***) p<0,001 quando comparados ao grupo dos animais Jovens. (##) p<0,01 quando comparados ao grupo de animais Idosos. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.1.2.4 Atividade da CAT

O resultados demonstrados na Figura 13A-B revelam que houve aumento significativo na atividade da enzima CAT no fígado (Figura 13A) dos animais idosos, quando comparados aos jovens. Os resultados indicam que o tratamento com o composto 4-APSB reestabeleceu a atividade da CAT neste tecido.

No tecido renal (Figura 13B), observa-se que o envelhecimento causou a inibição na atividade da CAT. Isso pode ser evidenciado pois o grupo de animais idosos apresentou diminuição significativa na atividade dessa enzima quando comparado ao grupo dos animais jovens. De forma importante, o tratamento com o 4-APSB foi capaz de reestabelecer a atividade da enzima CAT no rim desses animais.

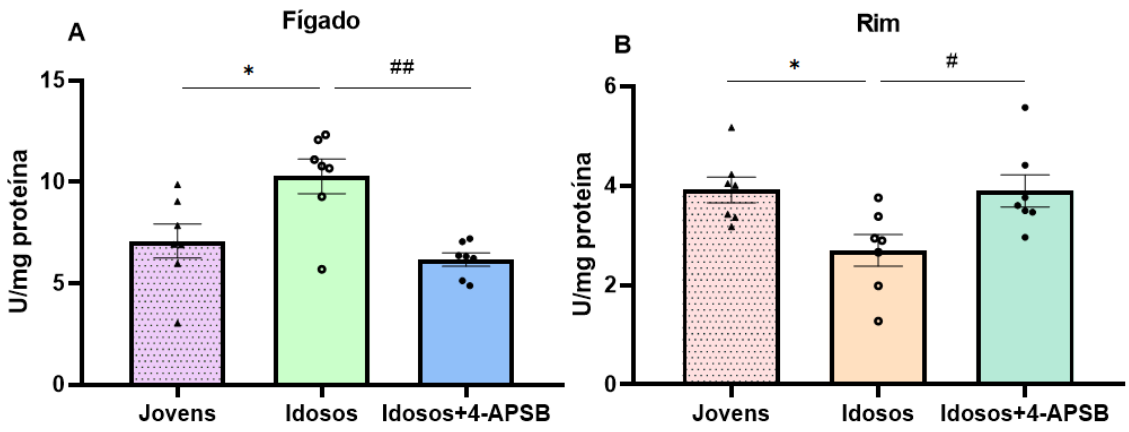


Figura 13. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima CAT em amostras de fígado (A) e rim (B) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). (*) p<0,05 quando comparados ao grupo dos animais Jovens. (#) p<0,05 e (##) p<0,01 quando comparados ao grupo de animais Idosos. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.1.2.5 Atividade da Na^+/K^+ ATPase renal

Na Figura 14A evidencia-se que o grupo de animais idosos apresentou uma inibição na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase no tecido renal quando comparado ao grupo dos hamsters jovens. Os resultados apresentados demonstraram que o composto 4-APSB não foi capaz de reverter essa inibição.

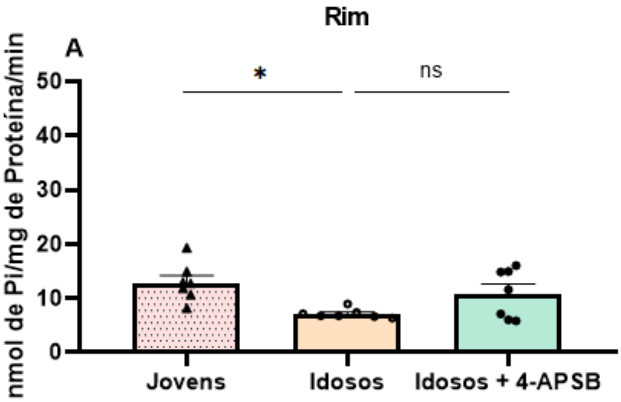


Figura 14. Efeito do composto 4-APSB na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase em amostras rim (A) de hamsters jovens e idosos (n=7 animais por grupo). (*) p<0,05 quando comparados ao grupo dos animais Jovens. O símbolo ns indica não houve diferença significativa entre os grupos. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

5.2 Discussão

No presente estudo observou-se que o processo de envelhecimento foi capaz de alterar os marcadores de estresse oxidativo no fígado e no rim de hamsters. Frente a isso, o 4-APSB, um composto organoselênio com grupamento sulfonamida, apresentou papel importante ao normalizar alguns desses parâmetros.

Como já descrito, o processo de envelhecimento é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças hepáticas e renais. A disfunção mitocondrial, a imunossenescência, o déficit na sinalização intracelular e o encurtamento dos telômeros são considerados mecanismos patogênicos envolvidos no processo de envelhecimento que influenciam na fragilização do organismo, aumentando a susceptibilidade para o desenvolvimento de patologias[86]. O estresse oxidativo é um dos mecanismos mais relevantes na compreensão do processo do envelhecimento. Diversos estudos têm demonstrado o papel fundamental do estresse oxidativo no desenvolvimento de

condições crônicas renais, hepáticas e no envelhecimento, demonstrando que este é um fator em comum em ambos os processos [87-89].

O fígado é um dos órgãos responsáveis pelo metabolismo energético, pela biossíntese molecular e pela excreção de xenobióticos. A maior parte dos processos de biotransformação hepática são realizados por meio de reações oxidativas catalisadas pelas enzimas do citocromo P450, que geram uma série de ER[90]. Somado a isto, durante a manutenção energética, o fígado está constantemente exposto a superprodução de ER advindas da mitocôndria, formadas durante a fosforilação oxidativa. Considerando estes fatores, é possível analisar que o fígado possui um enorme potencial na geração de ER por estar relacionado com reações que causam o desequilíbrio da homeostase redox do organismo[91]. Juntamente com o processo do envelhecimento, ocorrem inúmeras modificações degenerativas no fígado, que podem alterar drasticamente sua estrutura e funcionalidade[92]. Algumas das alterações hepáticas em indivíduos idosos variam desde a diminuição do fluxo sanguíneo (perda total de 20 a 40% do volume de sangue)[92], a redução do nível de albumina e bilirrubina séricas[93], a diminuição do metabolismo do colesterol[93] e a perda de massa celular funcional[94].

Assim como o fígado, o rim também é um órgão altamente energético, sendo um dos mais afetados pelo processo do envelhecimento. Algumas das alterações mais recorrentes no tecido renal envolvem a liberação de citocinas e de fatores de crescimento, a apoptose celular e a superprodução de ER, assim como a perda de massa funcional e a atrofia tubular. Associado a estes fatores, a fragilidade do rim envelhecido torna-o mais suscetível a não se recuperar das lesões agudas, progredindo a crônicas[95]. De acordo com DAENEN et al. (2018)[96] a geração excessiva de ER desempenham um papel fundamental no desequilíbrio da homeostase redox, promovendo a desregulação fisiológica renal. No presente estudo, observou-se um aumento dos níveis de ER, de TBARS e no teor de PCs no tecido hepático e renal de hamsters idosos, sugerindo um aumento dos danos oxidativos nestes tecidos. Além disso, evidenciou-se alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT em ambos os tecidos, caracterizando o desenvolvimento do estresse oxidativo.

Como relatado por LUCHESE et al. 2020 e LIGUORI et al. 2018[10,3] o processo de envelhecimento é responsável por causar danos às principais macromoléculas do organismo como por exemplo, os lipídios. Dessa forma, como evidenciado nos resultados, o envelhecimento desencadeou a peroxidação lipídica hepática e renal, causando o comprometimento da integridade, estabilidade e funcionalidade da membrana plasmática[96]. Uma vez que a membrana plasmática é comprometida, é provável que ocorra o aumento de sua fluidez, impactando diretamente em suas propriedades de transporte e nas propriedades das enzimas transmembrana, como por exemplo a Na^+/K^+ ATPase[97]. Além disso, tanto os metabólitos resultantes das reações de lipoperoxidação, quanto as ER podem reagir diretamente com as proteínas, causando sua oxidação[98]. Os resultados deste estudo demonstraram que o aumento dos níveis de ER, pode estar relacionado com o aumento dos níveis de TBARS e o teor de PCs no fígado e no rim de hamsters idosos.

Os dados encontrados neste estudo reforçam que tanto o aumento nos níveis de ER, quanto a peroxidação lipídica podem estar diretamente relacionados com o aumento da carbonilação de proteínas no fígado e no rim de hamsters idosos. Corroborando com este achado, LUCERI et al. (2018)[99] demonstraram que a partir dos 15 meses de idade, ratos machos apresentaram um aumento expressivo nos níveis de ERO associado a um aumento nos níveis de proteínas carboniladas circulantes. Diante dessas evidências, os autores sugeriram que tais marcadores de dano oxidativo podem indicar algum tipo de lesão oxidativa hepática. Assim como no tecido hepático, ANDRIANOVA, et al. (2020)[100] evidenciaram que o envelhecimento causou aumento nos níveis de ER e de proteínas carboniladas no rim de ratos *Wistar* machos com 21-24 meses de idade.

Como resposta aos danos oxidativos às macromoléculas (proteínas e lipídios) é possível observar uma modulação diferente na atividade das defesas antioxidantes no tecido hepático e renal. No presente estudo, demonstrou-se que as principais enzimas antioxidantes do organismo (SOD, CAT e GPx) sofreram alterações em sua atividade em decorrência do processo do envelhecimento. Como já descrito, a SOD é uma enzima responsável por neutralizar o radical $O_2^{\bullet-}$ formando H_2O_2 e H_2O[37]. Em continuidade, a CAT é uma enzima antioxidante responsável pela neutralização de elevados fluxos de H_2O_2[39], enquanto a GPx é

responsável por eliminar fluxos menores dessa ER, além de outros hidroperóxidos[38]. Sendo assim, as enzimas SOD, CAT e GPx atuam sinergicamente na eliminação de ER nos tecidos hepático e renal.

Nesse sentido, observando os resultados obtidos, acredita-se que o aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no tecido hepático seja devido a um mecanismo compensatório pela superprodução de $O_2^{\bullet-}$, e como produto da reação, do H_2O_2. A produção excessiva dessas ER durante o processo do envelhecimento é capaz de induzir danos oxidativos às macromoléculas, estimulando as defesas antioxidantes do organismo e causando a perturbação da homeostase redox. Como uma forma de minimizar este desequilíbrio, a célula busca maneiras de se adaptar e resistir ao estresse oxidativo e assim aumentar a síntese de enzimas antioxidantes[101]. Logo, a sobrevivência da célula depende de sua capacidade de sobreviver a estes desequilíbrios. ÍNAL et al. (2001)[102], observaram o aumento da atividade das enzimas CAT e GPx no plasma de um grupo de pessoas entre 40 e 69 anos.

Em contrapartida, no tecido renal dos hamsters idosos, os resultados obtidos demonstraram que houve o aumento da atividade da SOD e a inibição da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx. É importante destacar que inúmeros estudos têm salientado que o estresse oxidativo severo associado ao processo de envelhecimento causam o declínio das defesas antioxidantes devido ao fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)[89]. O Nrf2 é responsável pela regulação da expressão basal de enzimas antioxidantes, como por exemplo a GPx e a CAT. Tradicionalmente, o processo do envelhecimento é caracterizado pela diminuição gradual dos processos de sinalização, pelo aumento de lesões oxidativas e pela apoptose celular. Sendo assim, esses fatores influenciam na perda da homeostase da proteína Nrf2 com a idade, causando a diminuição de seus níveis e de sua ativação[102]. Em relação a enzima SOD, acredita-se que assim como no tecido hepático, o aumento da atividade da enzima seja relacionado a um mecanismo compensatório estimulado pelo excesso de ER[103].

Outro achado importante neste estudo foi a inibição da atividade da enzima transmembrana Na^+/K^+ ATPase no tecido renal. GEERING (2008)[104] destaca a importância da enzima Na^+/K^+ ATPase renal na manutenção do gradiente de concentração dos íons sódio e potássio, auxiliando na conservação

da homeostase celular básica. No tecido renal, a enzima é responsável pela reabsorção de eletrólitos, manutenção do volume celular e do potencial da membrana plasmática. Frente a importância da Na^+/K^+ ATPase, sua desregulação causa consequências fisiopatológicas graves para o rim[104]. CHKADUA et al. (2022)[105] descreve que a inibição da Na^+/K^+ ATPase pode ocorrer devido a presença de ER, que favorecem a oxidação de grupamentos tióis de cisteína presentes nesta enzima. Além disso, a Na^+/K^+ ATPase pode sofrer inibição em sua atividade pelas alterações das características funcionais da membrana plasmática após e durante o processo de lipoperoxidação[106].

O organismo também apresenta um importante antioxidante não-enzimático, a GSH, que promove a detoxificação e a proteção da célula contra danos oxidativos. A GSH é um dos grupamentos tióis não proteicos mais abundantes e pode ser dosada pela técnica do NPSH[81]. Como descrito por LUCHESE et al. (2020)[10], o envelhecimento causou aumento dos níveis de NPSH no tecido hepático e diminuição no tecido renal de ratos *Wistar* idosos. Este achado indica que o envelhecimento causou alterações nos níveis de NPSH que variam de acordo com o tecido analisado. Entretanto, ao contrário deste achado, neste estudo não encontramos variação nos níveis de NPSH entre os grupos experimentais, tanto no tecido hepático quanto no renal. Acredita-se que esses resultados conflitantes sejam parcialmente atribuídos a variabilidade entre espécies, sexo e os métodos de ensaio[107]. Esses fatores, somados a complexidade do processo do envelhecimento, podem atuar alterando a resposta antioxidante em determinados tecidos.

Após identificar os danos oxidativos renais e hepáticos induzidos pelo processo do envelhecimento em hamsters idosos, uma etapa importante deste estudo foi verificar as ações farmacológicas do 4-APSB sobre esses danos. Neste estudo, indicamos um potencial antioxidante do composto 4-APSB ao reduzir o teor de proteínas oxidadas, tanto no tecido hepático quanto renal. Somado a isto, o composto apresentou capacidade de neutralizar as ER e reestabelecer a atividade da enzima SOD no tecido renal, GPx no tecido hepático e CAT em ambos os tecidos.

Os compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre são parte de uma ampla classe de compostos descritos na literatura por suas atividades farmacológicas, principalmente as de neutralizar as ER[108]. Dessa

forma, sugere-se que a atividade antioxidante do composto 4-APSB esteja relacionada a seus substituintes, principalmente ao grupamento sulfonamida e a presença do átomo de selênio em sua estrutura. SOLIMAN et al. (2020)[11], descreve um composto orgânico contendo grupamento benzenosulfonamida que desempenhou atividade hepatoprotetora na dose de 20 mg/kg no fígado de camundongos machos *Swiss.* LUCHESE et al. (2020)[10] descreve um composto organoselênio com capacidade de reverter os danos aos lipídios e reestabelecer a atividade das enzimas GST e CAT em tecidos renal e hepático na dose de 5 mg/kg em ratos *Wistar* idosos. Corroborando com os dados destes estudos, o composto 4-APSB desempenhou ação antioxidante ao alterar os parâmetros oxidativos nos tecidos renal e hepático de hamsters idosos. Ainda, cabe salientar que o composto foi capaz de exercer atividade biológica na dose de 1 mg/kg, relativamente baixa quando comparado aos demais compostos. Dessa forma, o 4-APSB demonstra ser uma potencial estratégia terapêutica como tratamento adjuvante para o envelhecimento.

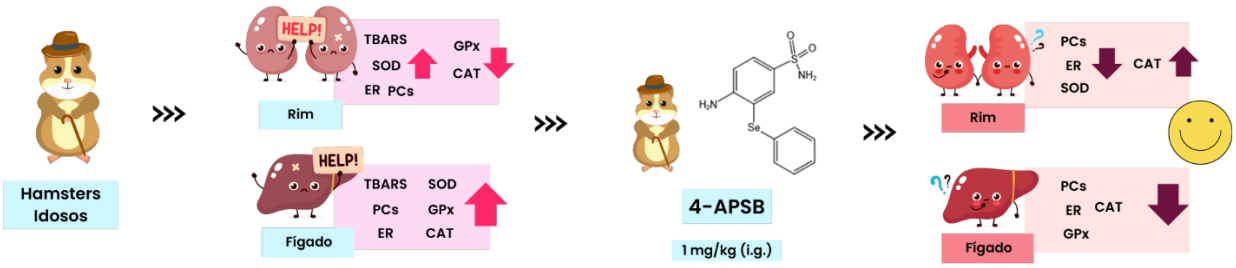


Figura 15. Representação esquemática do estudo.

Fonte: Autora.

6. Considerações finais

Os dados obtidos neste estudo reforçam que o envelhecimento está estreitamente associado ao desequilíbrio redox, uma vez que foi possível evidenciar a alteração dos parâmetros de estresse oxidativo nos tecidos renal e hepático. Além disso, demonstrou-se a ação antioxidante do composto 4-APSB frente aos danos oxidativos presentes em ambos os tecidos de hamsters idosos,

demonstrando que o composto pode ser uma estratégia terapêutica em potencial. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos pelos quais o composto 4-APSB atenua os danos oxidativos induzidos pelo envelhecimento.

Referências

1. SANTOS, F. H. S.; ANDRADE, V. M.; BUENO, O. F. A. Envelhecimento: um processo multifatorial. **Psicologia em Estudo,** v. 14, n. 1, p 3-10, 2009.
2. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAN). **Envelhecimento ativo: uma política de saúde.** 2005. Disponível em: https://iris.paho.org/handle/10665.2/7685. Acesso em: 09 nov. 2022.
3. LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 26, p. 757-772, 2018.
4. National Council on aging (NCO). **The top 10 Most Common Chronic Conditions in Older Adults**. 2021. Disponível em: https://www.ncoa.org/article/the-top-10-most-common-chronic-conditions-in-older-adults. Acesso em: 10 nov. 2021.
5. WU, C.; CHEN, X.; CAI, Y. et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease: Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, p.934–943, 2020.
6. CHICHOZ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 8082-8091, 2014.
7. CAPPERUCCI, A. et al. Synthesis of functionalised organochalcogenides and in vitro evaluation of their antioxidant activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 110, p. 104, 2021.
8. LEMOS, B. B., MOTTA, K. P. D., PALTIAN, J. J., REIS, A. S., BLÖDORN, G. B., SOARES, M. P., WILHELM, E. A. et al. Role of 7-chloro-4-

(phenylselanyl) quinoline in the treatment of oxaliplatin-induced hepatic toxicity in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. *99*, p. 378-388, 2021.

9. DA MOTTA, K. P., LEMOS, B. B., PALTIAN, J. J., REIS, A. S., BLÖDORN, G. B., ALVES, D., WILHELM, E. A. et al. 7-Chloro-4-(phenylselanyl) quinoline reduces renal oxidative stress induced by oxaliplatin in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 10, p. 1102-1111, 2021.
10. LUCHESE, C. et al. Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as an anti-aging drug fighting oxidative damage in different tissues of aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 130, p. 110804, 2020.
11. SOLIMAN, A. M.; KARAM, H. M.; MEKKAWY, M. H.; GHORAB, M. M. Antioxidant activity of novel quinazolinones bearing sulfonamide: Potential radiomodulatory effects on liver tissues via NF-κB/ PON1 pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 197, p. 1-13, 2020.
12. SACRAMENTO, M.; REIS, A. S.; MARTINS, C. C.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A.; ALVES, D. Synthesis and Evaluation of Antioxidant, Anti-Edematogenic and Antinociceptive Properties of Selenium-Sulfa Compounds. **ChemMedChem**, v. 17, 2022.
13. NETTO, M. P. O estudo da velhice: Histórico, Definição do Campo e Termos Básicos. *In*: DE FREITAS, E. V. et al.; **Tratado da Geriatria e Gerontologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 64-76.
14. MARTIN, G. B.; JÚNIOR, L. C.; BASTOS, Y. G. L. Aspectos demográficos do processo de envelhecimento populacional em cidade do Sul do Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 14, n. 3, p. 151-158, 2005.
15. OMS. **Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde.** Who.int, Genebra, 2015. Acessado em: 15 jun. 2022. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186468/WHO_FWC_ALC_15.01_por.pdf;jsessionid=532C8E76816822BC4B01F0F9094E1611?sequence=6.
16. IBGE. **Projeção da População 2018: número de habitantes do país deve parar de crescer em 2047**. Gov.br, Brasília, 25 jul. 2018. Acessado em 08 jul. 2022. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/2013-agencia-

de-noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-de-habitantes-do-pais-deve-parar-de-crescer-em-2047.

17. PEREZ, E. **Fundamentos de patologia.** 1ª Ed. São Paulo: Érica, 2014.
18. BOOTH, L. N; BRUNET A. The Aging Epigenome. **Molecular Cell**, v. 5, n. 62, p.728, 2016.
19. BARBOSA, K. B. F. et al., Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
20. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 12, p. 123– 130, 1999.
21. MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura.**, São Paulo, v. 66, n. 3, pág. 54-57, setembro de 2014. Disponível em <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000300017&lng=en&nrm=iso>.
22. 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.
23. BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 2006, v. 29, n. 1, p. 113-123.
24. ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, p. 693-702, 1996.
25. SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.
26. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica do Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
27. NKEHRER, J. P., KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical Reviews in Toxicology**, 45(9), 765–798, 2015.

28. VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.
29. 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.
30. DREW, B.; LEEUWENBURGH, C. Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 959, p. 66-81, 2002.
31. GOUVEIA, S. S.; LIMA, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 20, n. 3, p. 174-179, 2017.
32. PATEL, R. P.; et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. (**BBA) – Bioenergetics**, v. 1411, n. 2, p. 385-400, 1999.
33. DEDON, P. C., TANNENBAUM, S. R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, n. 1, p. 12–22, 2004.
34. FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 4, n. 2, p. 32-39, 2007.
35. VASCONCELOS, T. B. de et al. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. UNOPAR Científica. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.
36. KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J.** v. 15, n. 1, p. 71, 2016.
37. FRIDOVITCH, I. Superóxido Dismutases. **Revisão Anual de Bioquímica**, v. 44, n. 1, p. 147-159, 1975.
38. ROTTA, R. B. **Estudo da atividade da enzima glutationa peroxidase em carne de frango.** 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2007.
39. TEHRANI, H. S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.140, p. 5-12, 2018.

40. GEGOTEK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 221, p. 46-52, 2019.
41. LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.3, 293-303, 2001.
42. FRANÇA, B. K.; et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastrenterologia**, v. 20, n.5, p. 199-206, 2013.
43. ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 6, p. 749-756, 2008.
44. ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista contexto saúde**, v.10, n. 20, p. 93-102, 2011.
45. DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n.4, p. 169-176, 2003.
46. SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, A. D. Protein Carbonylation. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 12, n.16, p. 323-325, 2010.
47. FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. **MassSpectrometryReviews**, v. 33, n. 2, p. 79-97, 2014.
48. WEHR, N.; LEVINE, R. L. Quantification of Protein Carbonylation. **Cell Senescence**, v. 965, p. 265-281, 2012.
49. PORSCH, L.; SIMAS, L. A. W.; GRANZOTI, R. O. C. Estresse oxidativo e seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v.2, n.2, p. 80-85, 2019.
50. LUO, J.; Mills, K.; CESSIE, S.; NOORDAM, R.; VAN HEEMST, D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next?. **Ageing Research Review**, v. 57, p. 1-44, 2020.
51. VIÑA, J.; BORRAS, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GARCIA-VALLES, R.; GOMEZ-CABRERA, M.C. The free radical theory of aging revisited: the

cell signaling disruption theory of aging**. Antioxidant Redox Signal**, v. 10, n. 19, p. 779-787, 2013.

52. FROST, D. V.; LISH, P. M. Selenium in biology. **Annual Review of Pharmacology**, v. 15, p. 259-284, 1975.
53. LUCHESE, C; STANGHERLIN, E.C.; GAY, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 248-254, 2009.
54. BRÜNING, C.A.; PRIGOL, M.; ROEHRS, J.A.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect caused by mtrifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 2, p. 511-517, 2009.
55. BORTOLATTO, C. F.; CHAGAS, P.M.; WILHELM, E.A.; ZENI, G; NOGUEIRA, C. W. 2, 2′-dithienyl diselenide, an organoselenium compound, elicits antioxidant action and inhibits monoamine oxidase activity in vitro. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicine Chemistry**. v. 28, p. 677-684, 2013.
56. PALTIAN, J. J. et al. The anxiolytic effect of a promising quinoline containing selenium with the contribution of the serotonergic and GABAergic pathways: modulation of parameters associated with anxiety in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 393, p. 112797, 2020.
57. PINZ, M. P. et al. 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p. 122-128, 2016.
58. PINZ, M. P. et al. Current advances of pharmacological properties of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline: prevention of cognitive deficit and anxiety in Alzheimer's disease model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1006-1014, 2018.
59. REIS, A. S. et al. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. **Journal of Psychiatric Research**, v. 84, p. 191-199, 2017.

60. RODRIGUES, K. C. et al. The neurotherapeutic role of a selenium-functionalized quinoline in hypothalamic obese rats. **Psychopharmacology**, v. 238, n. 7, p. 1937-1951, 2021.
61. VOGT, A. G. et al. Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenyl-quinoline. **Chemico-Biological Interactions**, v. 282, p. 7-12, 2018.
62. VOSS, G. T. et al. Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselanyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. **Materials Science and Engineering: C**, v. 84, p. 90-98, 2018.
63. VICTORIA, F. N.; et al. Further analysis of the antimicrobial activity of α-phenylseleno citronellal and phenylseleno citronellol. **Food control**, v. 23, n. 1, p. 95-99, 2012.
64. NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255-6286, 2004.
65. WILHELM, E. A.; BORTOLATTO, C. F.; NOGUEIRA, C. W. *p*-Methoxyl-diphenyl diselenide protects against cisplatin-induced renal toxicity in mice. **Food Chem Toxicol**, v.50. p.1187–1193, 2012.
66. CHAKRABORTY P.; ROY S. S.; SK U.H.; BHATTACHARYA S. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by oral administration of diphenylmethyl selenocyanate. **Free Radicals Research**, v. 45, p. 177–187, 2011.
67. WILHELM, E. A.; JESSE, C. R.; PRIGOL, M.; ALVES, D.; SCHUMACHER, R. F.; NOGUEIRA, C. W. 3-Alkynyl selenopheno protects carbon-tetrachloride-induced and 2-nitropopane-induced hepatic damage in rats. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, p. 567-577, 2010.
68. BORGES, L. P.; BORGES, V. C.; et al. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v. 210, p. 1-8, 2005.
69. FREITAS, A. S. et al. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 77-84, 2009.

70. HECK, S. O**. Efeito Hipolipidêmico e Hepatoprotetor do 4,4-dicloro-difenil disseleneto em um modelo de hiperlipidemia em ratos**. 2016. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.
71. BRAÑA, M. F.; CACHO, M.; GUISADO, C. Sulfonamida: el grupo mágico. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 76, p. 317-341, 2006.
72. SUPURAN, C. T.; CASSINI, A.; SCOZZAFAVA, A. Protease inhibitors Of the sulfonamide type: Anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 5, p. 535- 558, 2003.
73. SUPURAN, C. T.; INNOCENTI, A.; MASTROLORENZO, A.; SCOZZAFAVA, A. Antiviral sulfonamide derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 189-200, 2004.
74. PARVEEN, B. R.; PRAVEEN, S.; HIMANSHU, A. A shot review on sulphonamides with antimicrobial activity. **International Journal of Pharmaceutical Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 70-73, 2017.
75. TANG H.; et al. Design and synthesis of a new class of malonyl-CoA decarboxylase inhibitors with anti-obesity and anti-diabetic activities. **Bioorg Med Chem Lett**., v. 15, n. 20, p. 6088-6092, 2010.
76. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye biding. **Analytical Biochemistry**., v. 72, p. 248-254, 1976.
77. OHKAWA H.; OHISHI N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry,** v. 95, p. 351-358,1979.
78. YAN, L. J.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins, **Analytical Biochemistry,** v. 228, p. 349-351, 1995.
79. LEVINE, R.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 465-478, 1990.

80. LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2,7-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p.323-331, 2005.
81. ELLMAN, G. L.; Tissue sulfhydryl groups. **Archives Biochemistry Biophysics,** v. 82, p.70-77,1959.
82. MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **Journal Biological Chemistry,** v. 274, p. 3170-3175, 1972.
83. WENDEL, A. Glutationa Peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.77, p. 325-333, 1981.
84. AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology,** v. 105, p. 121-126,1974.
85. FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry,** v.66, p. 375-400, 1925.
86. PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal Clinical Biochemistry,** v.30, p. 11-26, 2015.
87. MICHALAK, A.; LACH, T.; CICHOZ-LACH, H. Oxidative Stress – A key Player in the Course of Alcohol-Related Liver Disease. **Journal of Clinical Medicine**., v.10, p. 1-17, 2021.
88. ARANDA-RIVERA, A. K.; CRUZ-GREGORIO, A.; APARICIO-TREJO, O. E.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Mitochondrial Redox Signaling and Oxidative Stress in Kidney Diseases. **Biomolecules**., v.11, p.11-44, 2021.
89. SCHMIDLIN, C.; DODSON, M. B.; MADHAVAN, L.; ZHANG, D. D. Redox regulation by NRF2 in aging and disease. **Free Radical Biology and Medicine**., v.134, p. 702-707, 2019.
90. MELLO, T.; ZANIERI, F.; CENI, E.; GALLI, A. Oxidative Stress in the Healthy and Wounded Hepatocyte: A Cellular Organelles Perspective. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p.1-15, 2015.
91. ZEEH, J.; PLATT, D. The Aging Liver. **Gerontology**, v.48, p.121-127, 2002.

92. TIETZ, N. W.; SHUEY, D. F.; WEKSTEIN, D. R. Laboratory values in fit aging individuals, sexagenarians through centenarians. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 1167-1185, 1992.
93. HUNT, N. J. et al. Hallmarks of Aging in the Liver. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.17, p. 1151-1161, 2019.
94. WAKABAYASHI, H.; NISHIYAMA, Y.; USHIYAMA, T.; MAEBA, T.; MAETA, H. Evaluation of the effect of age on functioning hepatocyte mass and liver blood flow using liver scintigraphy in preoperative estimations for surgical patients: comparison with CT volumetry. **Journal of Surgical Research,** v. 106, p. 246-253, 2002.
95. LI, Y.; LERMAN, L. O. Cellular Senescence: A New Player in Kidney Injury. **Hypertension**, v. 76, p.1069-1075, 2020.
96. DAENEN, K.; ANDRIES, A.; MEKAHLI, D.; SCHEPDAEL, A. V.; JOURET, F.; BAMMENS, B. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v. 34, p. 975-991, 2019.
97. DAS, U. N. “Cell Membrane, Theory of Senescence” and the Role of Bioactive Lipids in Aging, and Aging Associated Diseases and Their Therapeutic Implications. **Biomolecules**, v. 11, p. 1-40, 2021.
98. KEHM, R.; BALDENSPERGER, T.; RAUPBACH, J.; HÖHN, A. Protein Oxidation – Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. **Redox Biology**, v. 42, p. 1-23, 2021.
99. LUCERI, C.; BIGAGLI, E.; FEMIA, A. P.; CADERNI, G.; GIOVANELLI, L.; LODOVICI, M. Aging related changes in circulating reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyls are indicative of liver injury. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 141-145, 2018.
100. ANDRIANOVA, N. V.; ZOROVA, L. D.; PEVZNER, I. B.; POPKOV, V. A.; CHERNIKOV, V. P.; SILACHEV, D. N.; PLOTNIKOV, E. Y.; ZOROV, D. B. Resemblance and differences in dietary restriction nephroprotective mechanisms in young and old rats. **Aging (Albany NY)**, v. 12, p. 18693-18715, 2020.
101. ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, p.463-499, 2000.

102. ÍNAL, M. E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**, v. 305, p. 75-80, 2001.

103. MORRIS, G. et al. The compensatory antioxidant response system with focus on neuroprogressive disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 95, p. 1-18, 2019.

104. GEERING, K. Functional roles Na^+/K^+ ATPase subunits. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.17, p. 526-532, 2008.

105. CHKADUA, G.; NOZADZE, E.; TSAKADZE, L.; SHIOSHVILI, L.; LELADZE, M.; DZNELADZE, S.; JAVAKHISHVILI, M. Effect of H_2O_2 on Na^+/K^+ ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, p. 1-9, 2022.

106. RAUCHOVÁ, H.; LEDVINKOVÁ, J.; KALOUS, M.; ZDENEV, D. The effect of lipid peroxidation on the activity of various membrane-bound ATPases in rat kidney. **The international Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 27, p. 251-255, 1995.

107. SAIO V.; SYIEM D.; SHARMA R.; DKHAR J. Amelioration of age - dependent increase in oxidative stress markers in male mice by extract of Potentilla fulgens. **Redox Rep.,** v.1, 2016.

108. GOMTSYAN, A. Heterocycles in drugs and drug discovery. **Chemistry of Heterocyclic Compounds,** v.48, p.7-10, 2012.