



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ALLAN JAMES DE CASTRO BUSSMANN

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FLAVONOIDES:
MECANISMOS ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA
NARINGENINA EM MODELO DE ARTRITE POR ZIMOSAN E
MECANISMO NEFROPROTETOR DA HESPERIDINA METIL
CHALCONA EM MODELO DE LESÃO RENAL POR
DICLOFENACO**

Londrina
2022

ALLAN JAMES DE CASTRO BUSSMANN

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FLAVONOIDES:
MECANISMOS ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA
NARINGENINA EM MODELO DE ARTRITE POR ZIMOSAN E
MECANISMO NEFROPROTETOR DA HESPERIDINA METIL
CHALCONA EM MODELO DE LESÃO RENAL POR
DICLOFENACO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Sergio Marques Borghi

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B981p BUSSMANN, Allan James de Castro.
Potencial terapêutico de flavonoides: mecanismos analgésico e anti-inflamatório da naringenina em modelo de artrite por zimosan e mecanismo nefroprotetor da hesperidina metil chalcona em modelo de lesão renal por diclofenaco / Allan James de Castro BUSSMANN. - Londrina, 2022. 110 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido VERRI JUNIOR. Coorientador: Sergio Marques BORGHI.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Mecanismos anti-inflamatórios e analgésicos - Tese. 2. Compostos fenólicos - Tese. 3. Lesão renal induzida por diclofenaco - Tese. 4. Artrite induzida por zimosan - Tese. I. VERRI JUNIOR, Waldiceu Aparecido . II. BORGHI, Sergio Marques. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

ALLAN JAMES DE CASTRO BUSSMANN

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FLAVONOIDES:
MECANISMOS ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA
NARINGENINA EM MODELO DE ARTRITE POR ZIMOSAN E
MECANISMO NEFROPROTETOR DA HESPERIDINA METIL
CHALCONA EM MODELO DE LESÃO RENAL POR
DICLOFENACO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Victor Fattori
Harvard Medical School

Dra. Larissa Staurengo Ferrari
Harvard Medical School

Dra. Camila Rodrigues Ferraz
University of Maryland

Dra. Marília Fernandes Manchope
University of Würzburg

Londrina, 14 de fevereiro de 2022.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, nosso salvador, que caminhou ao meu lado em todo percurso, a Ele, toda glória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior, que antes de orientador é um amigo, que apostou em mim e me ofertou uma possibilidade que evoluir sem igual, a quem sempre serei grato.

Meu co-orientador Prof. Dr. Sergio Marques Borghi, também um grande amigo, que sofreu ao meu lado e sempre esteve pronto a ajudar de todas as formas, gratidão eterna.

A todos os colegas do LADINC, que me ajudaram sempre, companheiros que jamais terei como agradecer.

Minha amada esposa, amiga, presente de Deus em minha vida Josiane Bussmann, que se não fosse por ela eu não teria nem ingressado no programa, quem dirá chegar ao fim da jornada. Presente em todos os momentos a mais certa das horas incertas.

Meus filhos, Vitor, Arthur e Natália, que ao longo da jornada conviveram com minha ausência de todas as formas, mas nem por isso sonegaram um sorriso a este velho.

Ao meu pai James Bussmann, que foi convocado por Deus em 2018, sempre um incentivador de meu trabalho e que sentado junto do Pai Celestial sei que está feliz.

Minha mãe, uma mulher de fibra e carinhosa, que me inspirou sempre a ser melhor e que me apoiou sempre.

Meu querido irmão Christian, sempre um incentivador e amigo.

Ao Dr. Kazuhiro Ito, meu chefe no Laboratório de Anatomia Patológica, que me ajudou institucionalmente de todas as formas, assim como a Dra. Alda Losi que o sucedeu.

Não posso me furtar de agradecer a todos os colegas do Laboratório de Anatomia Patológica por todo apoio e amizade durante a jornada.

Aos colegas da turma de pós-Graduação 2017, amigos que vida me trouxe e sempre estarão em meu coração.

Ao amigo Fernando Terziotti que por sua inestimável ajuda no capítulo sobre lesão renal.

Aos amigos Rodrigo do Prado, Priscila Pavezzi, Meriele Capeletti, Leda Mezzaroba, pessoas abençoadas que Deus trouxe a minha vida durante essa caminhada.

Ao grande Douglas Grion, que mais do que um amigo, devo gratidão por sua competência profissional e humanidade que possibilitou mais um ano de vida a meu pai e ter minha mãe ao meu lado hoje.

A família Palandrani Abreu que me recebeu em solo mineiro para concluir essa tese.

*“A tragédia da vida não é não alcançar as estrelas
e sim não ter estrelas para tentar alcançar”*

(James Bussmann)

RESUMO

BUSSMANN, Allan James de Castro. **Potencial terapêutico de flavonoides:** Mecanismos analgésico e anti-inflamatório da naringenina em modelo de artrite por zimosan e mecanismo nefroprotetor da hesperidina metil chalcona em modelo de lesão renal por diclofenaco. 2022. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, aumenta-se também o risco de ser acometido por condições inflamatórias crônicas, como as artrites. Como consequência, o consumo de fármacos para o tratamento dessas doenças tende a crescer paralelamente. A classe de medicamentos mais prescrita aos pacientes com quadros inflamatórios e álgicos são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), um grupo heterogêneo de compostos que agem com afinidades diferentes inibindo a enzima ciclo-oxigenase (COX) em suas duas isoformas, com efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. No entanto, os AINES podem apresentar efeitos colaterais amplamente descritos, como danos gastrointestinais, lesão renal aguda e disfunção cardiovascular, usualmente associados ao tempo de uso, seletividade para COX-1/COX-2 e a dose utilizada. As pesquisas buscando novas opções farmacológicas para o tratamento dessas condições usando compostos naturais que possam prevenir e tratar os danos causados pelas doenças e pelo uso dos medicamentos tradicionais vem ganhando importância, especialmente os estudos relacionados aos flavonoides. No presente estudo, foram avaliadas duas moléculas, a flavanona naringenina que foi testada em modelo de artrite induzida por zimosan, e a hesperidina metil chalcona (HMC), subproduto da flavanona hesperidina após processo de metilação, que foi testada em modelo de lesão renal induzida por diclofenaco sódico. A naringenina foi capaz de inibir a dor e edema articulares de maneira dose-dependente, sendo a dose de 50 mg/kg selecionada para os experimentos subsequentes. A HMC inibiu o recrutamento de leucócitos, alterações histopatológicas, ativação de NFκB e de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-33), assim como a expressão do RNAm para prepro-ET-1, adicionalmente levando ao aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10. A naringenina também inibiu a ativação do inflamassoma (expressão de RNAm para Nlrp3, ASC, caspase-1 e pró-IL-1β) e estresse oxidativo (redução da expressão de mRNA de gp91phox e produção de ânion superóxido, e aumento dos níveis de GSH), além de aumentar a expressão proteica de Nrf2 em células hematopoiéticas CD45+ e expressão do RNAm para Nrf2 e HO-1. A HMC foi capaz de reduzir os níveis de ureia e creatinina, estresse oxidativo (redução nos níveis de ânion superóxido e aumento na capacidade antioxidante), e produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN-γ e IL-33 no sangue na dose de 3 mg/kg. Ainda, foi observado que nos rins houve redução do estresse oxidativo (aumento da capacidade antioxidante), redução da produção de citocinas pro-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IFN-γ e IL-33), e aumento da produção de IL-10, além de redução das alterações histopatológicas e níveis urinários da enzima NGAL. Por fim, a HMC induziu a expressão do RNAm para Nrf2, e para seus genes-alvo HO-1 e Nqo1 no tecido renal. As duas moléculas avaliadas demonstraram resultados promissores em modelos pré-clínicos de artrite e lesão renal aguda, merecendo assim atenção clínica adicional.

Palavras-chave: naringenina; hesperidina metil chalcona; flavonoides; artrite reumatoide; lesão renal aguda; inflamação.

ABSTRACT

BUSSMANN, Allan James de Castro. **Therapeutic potential of flavonoids:** Analgesic and anti-inflammatory mechanisms of naringenin in zymosan-induced arthritis arthritis model and nephroprotective mechanism of hesperidin methyl chalcone in sodium diclofenac-induced acute kidney injury model. 2022. 54 p. Thesis (Doctorate in Health Sciences) – Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2022.

With the increase in life expectancy of the world population, the risk of being affected by inflammatory chronic conditions, such as arthritis, also increases. As a consequence, the consumption of drugs for the treatment of these diseases tends to grow in parallel. The class of drugs most prescribed to patients with inflammatory and painful conditions are non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), a group of compounds that act by inhibiting with varied selectivities the cyclooxygenase enzyme (COX) in its two isoforms, with anti-inflammatory and analgesic effects. However, side effects are well described, such as gastrointestinal damage, acute kidney injury and cardiovascular dysfunction, usually associated with the time of use, selectivity to COX-1/COX-2 and the dosage. Research seeking new pharmacological tools for the treatment of these conditions, specially approaching natural compounds that can prevent and treat the damage caused by diseases and the use of traditional medicine has been gaining importance, mainly studies related to flavonoids. In the present study, two molecules were analyzed, the flavanone naringenin, which was tested in a mouse model of zymosan-induced arthritis, and hesperidin methyl chalcone (HMC), a by-product of the flavanone hesperidin after the methylation process, which was tested in a mouse model of sodium diclofenac-induced acute kidney injury. Naringenin was able to inhibit articular pain and swelling in a dose-dependent manner and the dose of 50 mg/kg was selected for further experiments. HMC inhibited leukocyte recruitment, histopathological changes, activation of NF κ B and pro-inflammatory cytokines (including TNF- α , IL-1 β and IL-33), as well as mRNA expression for prepro-ET-1, additionally leading to increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Naringenin also inhibited inflammasome activation (mRNA expression for Nlrp3, ASC, caspase-1 and pro-IL-1 β) and oxidative stress (reduced gp91phox mRNA expression and superoxide anion production, and increased levels of GSH), in addition to increasing Nrf2 protein expression in CD45+ hematopoietic cells and mRNA expression for Nrf2 and HO-1. HMC was able to reduce blood urea and creatinine levels, oxidative stress (reduction in superoxide anion levels and increase in antioxidant capacity), and the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IFN- γ and IL-33 in the dose of 3 mg/kg. Furthermore, it was observed that in the kidneys there was a reduction in oxidative stress (increased antioxidant capacity), a reduction in the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN- γ and IL-33), and increased production of IL-10, in addition to reducing histopathological changes and urinary levels of the NGAL enzyme. Finally, HMC induced mRNA expression for Nrf2, and its target genes HO-1 and Nqo1 in the kidney tissue. The two molecules evaluated showed promising results in preclinical models of arthritis and acute renal injury, thus deserving additional clinical attention.

Key words: naringenin; hesperidin methyl chalcone; flavonoids; rheumatoid arthritis; acute kidney injury; inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AINEs	Anti-inflamatório não esteroidal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Artrite reumatoide
COX	Ciclo-oxigenase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
HMC	Hesperidina metil chalcona
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
INF	Interferon
KEAP 1	Proteína associada a ECH semelhante a Kelch
LOX	Lipoxigenase
LRA	Lesão renal aguda
LT	Leucotrieno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
Fne2	Fator nuclear eritroide 2
NFkB	Fator nuclear de transcrição Kappa B
NK	Natural killer
NOS	Óxido nítrico sintetase
O ₂ -	Ânion superóxido
ON	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PG	Prostanoides
SBR	Sociedade Brasileira de Reumatologia
TFG	Taxa de filtração glomerular
Th1	T helper 1
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	PROCESSO INFLAMATÓRIO	11
1.2	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	16
1.3	DOR INFLAMATÓRIA	19
1.4	ARTRITE REUMATOIDE	20
1.5	AINEs	22
1.6	LESÃO RENAL AGUDA	24
1.7	FLAVONOIDES	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVOS GERAIS	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.2	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	31
3.3	COMPOSTOS TESTADOS	32
3.4	INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO DO JOELHO, LESÃO RENAL E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO	32
3.5	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA ARTICULAR	32
3.6	AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR	33
3.7	RECRUTAMENTO LEUCOCITÁRIO PARA CAVIDADE SINOVIAL	33
3.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO	34
3.9	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	34
3.10	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO	35
3.11	ENSAIO DE ATIVIDADE DE GSH	35
3.12	PRODUÇÃO DE CITOCINAS	36
3.13	DETERMINAÇÃO DE ATIVAÇÃO DE NFkB	36
3.14	ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM MICROSCÓPIO CONFOCAL	37
3.15	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	38
3.16	AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	38
3.17	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NGAL NA URINA	39

3.18	AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE FRAP.....	39
3.19	TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DE ABTS.....	40
3.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4	RESULTADOS	42
4.1	ARTIGO 1 - THE CITRUS FLAVANONE NARINGENINA ATTENUATES ZYMOXAN INFLAMMATION: INDUCTION OF NRF2 EXPRESSION IN RECRUITED CD45+ HEMATOPOIETIC CELLS	42
	Introduction.....	44
	Materials and methods	47
	Results.....	56
	Discussion	60
	Conclusions	66
4.2	ARTIGO 2: THE FLAVONOID HESPERIDIN METHYL CHALCONE TARGETS CYTOKINES AND OXIDATIVE STRESS TO REDUCE DICLOFENAC-INDUCED ACUTE RENAL INJURY: CONTRIBUTION OF THE NRF2 REDOX-SENSITIVE PATHWAY	75
	Introduction.....	75
	Materials and Methods	77
	Results.....	81
	Discussion	87
	Conclusions	90
	References	90
5	CONCLUSÃO	93
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	ANEXOS	104
	ANEXO A - Aprovações comitê de ética de pesquisa em animais	104
	ANEXO B - Produção de artigo adicional sem vínculo com o projeto de doutoramento, intitulado: Association between IL-10 systemic and highest pain score in patients during symptomatic SARS-CoV-2 infection publicado pelo periódico Pain & Practice	107

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da existência da humana, sempre se buscou opções para amenizar a dor física, fazendo uso das opções disponíveis em cada época. Com os avanços científicos e tecnológicos foram desenvolvidos compostos com ação analgésica, bem como houve maior entendimento do processo nociceptivo. Hoje é sabido que a dor inflamatória é parte de uma pentologia chamada de sinais cardinais que indicam que um processo inflamatório está em curso, esses sinais clínicos que se instalam na região onde ocorreu a injúria são calor, rubor, inchaço, dor e perda funcional (FILHO, 2018)

O processo inflamatório, ou como comumente chamado, inflamação, é uma resposta do organismo a uma agressão ou agente invasor que tem por objetivo reconstituir a região lesionada e combater e expulsar o invasor se necessário. No entanto, há situações em que a resposta inflamatória ocorre de forma exacerbada e sua ação pode se tornar mais danosa ao organismo do que a injúria original, e por essa razão, na prática clínica essa resposta precisa ser monitorada, e por vezes controlada para evitar consequências que podem inclusive levar a morte do paciente.

Para agir no controle da resposta inflamatória existem os medicamentos anti-inflamatórios, compostos que atuam reduzindo o processo inflamatório. Atualmente a classe de fármacos mais utilizada para o tratamento de condições inflamatórias e dolorosas é a dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), uma classe de compostos que tem como alvo enzimas envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios (RANG et al, 2016; OLIVEIRA et al, 2019).

Os AINES agem inibindo a enzima ciclo-oxigenase (COX), em suas duas isoformas COX-1 e COX-2, com isso trazendo efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, pois essa atividade reduz a produção de prostanoídes como as diversas prostaglandias e tromboxano A₂. No entanto, a inibição das enzimas COX também causa o desenvolvimento de eventos adversos como disfunções hepáticas e renais, ulcerações gastrointestinais, insuficiência arterial e distúrbios de coagulação (RANG et al, 2016; OLIVEIRA et al, 2019).

Os compostos fenólicos são produtos de origem natural que apresentam potencial para substituir produtos sintéticos, inclusive para o tratamento e prevenção de doenças. Os flavonoides são um dos grupos de compostos

fenólicos mais importantes e variados, presentes em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, talos e flores (FERRAZ et al. 2020). Neste estudo, foram avaliados o potencial de ação da naringenina e da hesperidina metil chalcona (HMC).

No presente trabalho, a naringenina foi testada em modelo experimental de artrite reumatoide induzida por zimosan, sendo avaliada suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias. O composto pesquisado apresentou resultados que confirmaram seu poder analgésico e antioxidante no modelo, demonstrando sua capacidade de ser utilizado como opção anti-inflamatória e analgésica.

A HMC, por sua vez, foi avaliada em estudo de lesão renal induzida por diclofenaco, foi avaliada sua ação analgésica, anti-inflamatórias e de proteção tecidual. Os resultados demonstram que a HMC possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes no modelo, bem como conferiu proteção tecidual contra os danos induzidos pelo diclofenaco. Desta forma, também emergindo como opção para o tratamento da lesão renal induzida por fármacos.

1.1 Processo inflamatório

O processo inflamatório pode ser descrito como a habilidade do organismo em se proteger dos invasores e de remover do corpo tecidos que foram danificados ou que já apresentam morte celular extensa. Por estas características, a inflamação é uma resposta protetora (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

O principal mecanismo de defesa do organismo contra agressões são as proteínas plasmáticas e os leucócitos circulantes, a presença desses componentes no sangue confere a capacidade de alcançar qualquer ponto onde se fizer necessário (FILHO, 2018).

Clinicamente a inflamação é uma condição relevante porque em algumas situações ela pode ser inadequadamente iniciada ou não ser controlada com sucesso, tornando a resposta inapropriada convertendo-se na causa de injúrias e doenças (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018)

A inflamação pode ser aguda ou crônica, com o tipo da resposta dependendo da natureza do estímulo e de capacidade da reação inicial em abolir o estímulo e os tecidos danificados (DINTZIS e HANSEL, 2007).

Quando um tecido sofre injúria ou um processo infeccioso se inicia, o corpo apresenta uma reação rápida, que resulta no recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas para o local da lesão, sendo esta resposta inicial caracterizada como a fase aguda (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

Durante a inflamação aguda, os vasos sanguíneos passam por alterações que tem por objetivo facilitar o trânsito de proteínas plasmáticas e células circulantes entre a circulação sanguínea e o foco do estímulo inflamatório (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

Esse movimento de fluídos pode levar a formação de edema, que é um sinal do excesso de líquido no tecido intersticial ou nas cavidades serosas, podendo esse líquido ser um exsudato, transudato ou mesmo pus (DINTZIS e HANSEL, 2007).

Logo após o estímulo inflamatório têm início mudanças no fluxo e no calibre vascular, sendo a vasodilatação uma das primeiras alterações a surgir. Ela é induzida principalmente pela ação da histamina e do óxido nítrico (NO). O resultado é o aumento no fluxo sanguíneo que causa calor e vermelhidão (eritema) no local (FILHO, 2018).

O aumento da permeabilidade vascular e a vasodilatação propiciam a exsudação plasmática com o aumento do diâmetro do vaso gerando a lentificação do fluxo sanguíneo, a concentração de hemácias em pequenos vasos e aumento da viscosidade do sangue (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

Esse processo resulta em uma condição chamada de estase ou congestão vascular, caracterizada por dilatação dos pequenos vasos que estão cheios de hemácias se movimentando lentamente. Conforme essa condição se instala, os leucócitos sanguíneos, principalmente os neutrófilos, sobrem um processo de marginalização permitindo a interação entre os leucócitos e as células endoteliais (JI, CHAMESIAN e ZHANG, 2016)

Concomitantemente, as células endoteliais sofrem ativação por mediadores que são produzidos no local de ocorrência do estímulo inflamatório e passam a expressar altos níveis de moléculas de adesão, permitindo aos

leucócitos aderir ao endotélio vascular e sua transmigração pela parede vascular em direção ao tecido intersticial (POLUNHA e GROSSMANN, 2018).

O aumento de permeabilidade vascular permite a exsudação. Como o exsudato é rico em proteínas, há ampliação da hidrofilia extravascular que contribui para a formação do edema tecidual. O aumento da permeabilidade ocorre pela ação de diferentes mediadores químicos como histamina, bradicina, leucotrienos, o neuropeptídeo P e muitos outros mediadores químicos, levando a contração das células do endotélio resultando em espaços interendoteliais aumentados, um tipo de resposta transitória imediata que surge rapidamente após a exposição ao mediador e sua duração é curta (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

Um dos grandes eventos do processo inflamatório é a condução de leucócitos para o local da injúria, onde se ativam para eliminar os agentes agressores. Neutrófilos e monócitos (que se diferenciarão a macrófagos nos tecidos), por sua capacidade de fagocitar e eliminar organismos invasores são leucócitos de grande importância na reação inflamatória de fase aguda (FILHO, 2018)

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e a interleucina-1beta (IL-1 β) induzem a expressão de ligantes para integrinas no endotélio, favorecendo a migração dos leucócitos. No local da injúria são produzidos quimiocinas que também guiam a migração de leucócitos para o local da lesão (QUINTANS et al. 2019).

O aumento de leucócitos no local da inflamação forma o chamado infiltrado leucocitário, sendo que a natureza desse infiltrado muda dependendo do tempo da resposta e da característica do estímulo agressor. Os neutrófilos são hegemônicos nas primeiras 24 horas, sendo substituídos progressivamente após este período por monócitos (FILHO, 2018).

As razões que explicam o surgimento precoce dos neutrófilos são diversas, principalmente o fato de serem mais numerosos no sangue, apresentarem resposta mais rápida as quimiocinas e sua capacidade de se ligarem com maior firmeza as moléculas de adesão que são rapidamente induzidas no endotélio por células P- e E-selectinas (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

No entanto, uma vez no interior dos tecidos entram em apoptose em até 48 horas. Os monócitos, por sua vez, apresentam capacidade e sobreviver por mais tempo, e podem se proliferar nos tecidos e nas reações inflamatórias crônicas se tornando a população leucocitária dominante (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

Uma vez que os leucócitos foram recrutados e chegaram ao local da inflamação eles são ativados para começar a desempenhar suas funções, que consistem em dois eventos em sequência, o primeiro é o reconhecimento do agente causador da injúria, para realizar essa função os leucócitos se valem de ferramentas que permitem o identificar o estímulo (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

Adicionalmente, a fagocitose dos agentes agressores ou restos celulares depende da ligação com receptores na membrana dos leucócitos para o reconhecimento, na sequência o englobamento que consiste na união dos lisossomas com os vacúolos fagocíticos. Após essa etapa ocorre a destruição das partículas ingeridas no interior dos fagolisossomos pela ação das enzimas lisossômicas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RUBIN et al. 2006).

Há situações em que o processo inflamatório, agressão e tentativa de reparo ocorrem juntos, esse quadro ocorre na inflamação crônica, uma resposta de longa duração. Pode suceder a inflamação aguda ou ter seu início como uma resposta leve contínua e sem manifestação aguda. Este tipo de inflamação leva ao dano tecidual em algumas doenças incapacitantes como a artrite reumatoide (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

A inflamação crônica pode surgir em decorrência de infecções persistentes causadas por micro-organismos difíceis de serem eliminados que podem causar reações imunes de hipersensibilidade. A exposição prolongada a agentes tóxicos também é uma das causas desse tipo de resposta (FILHO, 2018).

Outra situação que pode levar ao quadro crônico são as doenças inflamatórias autoimunes. Nestas circunstâncias, ocorre ativação errônea do sistema imune contra antígenos próprios, associada à autoperpetuação, que resulta em danos ao próprio tecido, como observado na artrite reumatoide (POLUNHA e GROSSMANN, 2018).

Morfologicamente a inflamação crônica é caracterizada por infiltrado de células mononucleares incluindo macrófagos e linfócitos. Outro aspecto é a destruição tecidual causada pelo agressor ou pelas células inflamatórias e a ocorrência de angiogênese que leva a fibrose (KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

A inflamação crônica e aguda podem ser diferenciadas por algumas características como o tempo da resposta, nas condições crônicas a resposta é prolongada ao passo que na aguda o tempo de resposta é rápido. O infiltrado presente nas respostas crônicas é composto por monócitos, macrófagos e linfócitos e no quadro agudo formado principalmente por neutrófilos. O dano tecidual nas inflamações crônicas usualmente é acentuado e progressivo, ao passo que nas condições agudas normalmente é leve e autolimitado. Já os chamados sinais sistêmicos nos quadros crônicos costumam ser sutis e nos casos agudos bem proeminentes.

Apesar de inflamação crônica ser considerada um quadro severo, há situações onde a inflamação aguda pode se tornar mais danosa são as chamadas reações de hipersensibilidade, com ocorre, por exemplo, na artrite séptica.

A patogênese da doença é associada aos níveis elevados de *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que apresenta diversas estratégias de escape imunológico, incluindo resposta inflamatória complexa que envolve os dois sistemas imunológicos (inato e adaptativo), e a participação de citocinas pró-inflamatórias que induzem danos osseos nas articulações afetadas. (FARAH, 2018)

O processo chamado de reparo é a fase de cura e resolução da inflamação que se inicia antes mesmo do fim da resposta inflamatória. Por esse mecanismo ocorre a restauração da estrutura e da função do tecido o mais próximo possível ao tecido não lesionado a depender de alguns fatores. O reparo ocorre por dois mecanismos: regeneração e cicatrização.

O reparo por regeneração ocorre quando os tecidos lesionados são contrituídos por células lábeis ou estáveis e dependendo da intensidade e duração da lesão. As células lábeis proliferam normalmente e por isso, sua proliferação para reparar uma área lesionada ocorre sem grandes limitações como nos epitélios. As células estáveis não proliferam constantemente, mas

tem a capacidade de proliferar desde que sejam mantidas a estrutura da matriz extracelular com o arcabouço do órgão e células para repopulação da área lesionada.

O reparo por cicatrização ocorre quando os tecidos lesionados envolvem células permanentemente diferenciadas, ou seja, não tem capacidade de divisão e proliferação celular. Contudo, o reparo por cicatrização também ocorre em tecidos com células estáveis quando a lesão é muito extensa e com grande perda da matriz extracelular, pois a matriz extracelular cria o microambiente necessário para a proliferação de populações celulares específicas de cada tipo de tecido. No caso do reparo por cicatrização, o local lesionado é preenchido por tecido conjuntivo gerando a fibrose. Apesar do reparo por cicatrização não ter a capacidade de restabelecer as funções celulares perdidas, ele confere estabilidade estrutural para tornar o tecido hábil para exercer suas funções.

1.2 Mediadores inflamatórios

As citocinas compõem um grande grupo moléculas hidrossolúveis que desempenham diversas funções na regulação da inflamação, sendo descritas como células mensageiras do sistema imunológico. As citocinas são produzidas por diversas células na área de lesão inflamatória, com destaque para os linfócitos-T ativados, monócitos, histiócitos, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos. As citocinas exercem funções autócrinas, parácrinas e endócrinas (QUINTANS et al. 2019; CAMPOS et al. 2016).

As citocinas desempenham diversas funções biológicas, são mediadoras importantes na comunicação entre as células e entre o sistema imunológico e o sistema nervoso, além de serem fundamentais na condução de células imunológicas até o local de lesão. São também capazes de regular a resposta inflamatória dos estágios iniciais até a restauração do tecido (RUBIN et al. 2006; QUINTANS et al. 2019).

É possível destacar as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , que são liberadas por macrófagos e induzem a adesão leucocitária ao endotélio vascular, induzem a expressão e ativação de COX e a consequente produção

de prostaglandinas que por sua vez, regulam a contratilidade e permeabilidade vascular (COUTINHO et al, 2009; CAMPOS et al, 2016). Ademais, o TNF- α e IL-1 β induzem hiperalgesia inflamatória via produção de prostaglandinas (CUNHA TM et al., 2005).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas resultantes da ação de oxidação de enzimas que catalisam a transferência de elétrons de um substrato para outro. As ERO mais comuns são o ânion superóxido (O_2^-), o óxido nítrico (ON) o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). Esses radicais livres em concentrações fisiológicas intervêm nas reações metabólicas normais do organismo. No entanto, quando são gerados de forma excessiva, geram estresse oxidativo que causa lesões de proteínas, lipídios e DNA. Como resultado, há morte celular e perda de função celular. As ERO ativam fatores de transcrição como o NF κ B induzindo a produção de mais citocinas pró-inflamatórias e enzimas envolvidas na produção de ERO (RUBIN et al. 2006).

As ERO quando oriundas especialmente dos neutrófilos, atuam no processo inflamatório ampliando a permeabilidade vascular e secundariamente, causando danos endoteliais e das estruturas próximas quando liberados para o interstício celular (FILHO, 2018).

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é dos mais relevantes radicais livres nos processos inflamatórios podendo ser produzidos por diferentes vias, no entanto, nas reações inflamatórias os leucócitos bem como células endoteliais utilizam o complexo NADPH oxidase para gerar $O_2^{\bullet -}$ (Quintans et.al, 2019).

O complexo enzimático NADPH oxidase das células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, gera altas concentrações de ânion superóxido no meio intracelular, o $O_2^{\bullet -}$ interage com o NO, gerando o radical livre peroxinitrito. Ainda, o $O_2^{\bullet -}$ é metabolizado pela superóxido dismutase gerando o H_2O_2 , que por sua vez sofre a reação de Fenton gerando o radical hidroxila ($\bullet OH$) que é altamente reativo causando lesão e morte celular na resposta inflamatória (RUBIN et al. 2006; KUMAR, ABBAS, FAUSTO e ASTER, 2018).

O NF κ B foi descoberto em 1986, sendo encontrado na maioria das células. Tem sua ação relacionada com diversas ações biológicas como inflamação, imunidade, diferenciação e crescimento celular, gênese tumoral e

apoptose. A atividade do NF κ B é controlada pelo inibidor de κ B (I κ B) no citoplasma, o qual impede a translocação do NF κ B para o núcleo celular. Contudo, mediadores inflamatórios como citocinas e O₂^{•-} ativam o NF κ B (Quintans et.al, 2019).

O NF κ B é um dímero proteico composto por combinações das subunidades p65 (ou RelA), RelB, c-Rel, p50 e p52. Por exemplo, um dímero de p65 sobre dissociação do I κ B, sendo então, translocado do citoplasma para o núcleo, onde induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, mediadores lipídicos, componentes do inflamassoma e COX-2. Na inflamação, o NF κ B também induz a expressão de NADPH oxidase culminando na geração de O₂^{•-} e das ERO derivadas do O₂^{•-} ocasionando o oxidativo oxidativo (STAURENFO-FERRARI et al, 2019; QUINTANS et al, 2019)

Como forma de evitar os danos causados pelo estresse oxidativo, existem moléculas que agem como protetoras, sendo reguladas pelo próprio mecanismo do estresse (RUBIN et al. 2006). Entre as moléculas endógenas que fazem a proteção contra o estresse oxidativo existe o fator de transcrição Nrf2. O Nrf2 é codificado pelo gene NFE2L2 e atua regulando a resposta antioxidante quando há alterações na homeostase. O próprio estresse oxidativo induz a ativação do fator de transcrição Nrf2 que no citoplasma se desagrega de sua molécula inibitória, a proteína KEAP1, sendo translocada para o núcleo e atuando na transcrição de genes importantes para a proteção celular, como os genes da maquinaria antioxidante endógena (SAREMENTO, 2019). Entre as principais funções protetoras desempenhadas no processo de recomposição da homeostase estão à supressão das citocinas pró-inflamatórias e inibição da NADPH oxidase (SAREMENTO, 2019). De fato, o Nrf2 é o grande responsável pela expressão basal e indução de proteínas envolvidas na resposta do estresse oxidativo, proteção celular e metabolismo de drogas, mantendo assim a homeostase do sistema redox celular (QUINTANS et al. 2019). Como resultado, o Nrf2 é essencial para a limitação de e pode ser utilizado para o tratamento de neuropatias, artrites, colite, pneumonia, fibrose pulmonar, doenças de pele, fígado e lesão renal, e atuando também no desenvolvimento de tumores (STAURENFO-FERRARI et al, 2019; QUINTANS et al, 2019).

1.3 Dor inflamatória

O processo inflamatório se caracteriza por cinco sinais chamados de sinais cardinais, são eles rubor, calor, tumor, dor e perda funcional. A dor aguda também pode ser considerada uma resposta protetora contra injúrias ao organismo (JI, CHAMESIAN e ZHANG, 2016).

A maioria dos mediadores inflamatórios conhecidos causa dor ao se ligar aos receptores expressos por neurônios sensoriais nociceptivos no sistema nervoso periférico. No curso da inflamatória, a prostaglandina E_2 , aminas simpatomiméticas, ET-1, IL-1 β e TNF- α , contribuem para sensibilização do neurônio nociceptivo. Os neurônios nociceptivos expressam receptores para prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas, permitindo com que essas moléculas sensibilizem esses neurônios causando a hiperalgesia (FATTORI, et al. 2017). Ou seja, prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas facilitam a despolarização neuronal frente a outros estímulos que podem ser químicos como a bradicinina ou externos (e.g. mecânicos e térmicos). Outros mediadores como o TNF α , podem ativar os neurônios nociceptivos, pois a ativação dos seus receptores TNFR1 expressos por essas células resulta na ativação de MAPK como a p38 que ativa canais de sódio. A cronificação do processo inflamatório e a ação continuada desses mediadores inflamatórios nociceptivos causa mudanças plásticas nos neurônios nociceptivos em termos da expressão de receptores e de canais iônicos. Essa plasticidade resulta na cronificação da dor (VERRI et al., 2006; PINHO-RIBEIRO et al., 2017).

A sensibilização periférica em nociceptores é essencial para o desenvolvimento e manutenção de dor crônica, sensibilização central aprimorando respostas dos circuitos algésicos medulares e cerebrais regulam a cronicidade da dor, causando propagação da sensação dolorosa através do local da injúria e influenciando aspectos emocionais e afetivos da dor (JI, CHAMESIAN e ZHANG, 2016).

1.4 Artrite reumatoide

O ser humano é capaz de realizar movimentos com amplitude considerável em seus membros. Tal capacidade é possível graças ao sistema articular que permite movimento integrado entre peças ósseas com amplitude e resistência. Esse sistema compõe o aparelho locomotor e possui características morfológicas ímpares (MOORE, DALLEY e AGUR, 2019). As estruturas articulares são morfolologicamente classificadas com base na sua capacidade de movimentação e constituição estrutural. As articulações que suportam a maior amplitude de movimento são chamadas de articulações do tipo diartrose, e por sua composição estrutural são classificadas como sinoviais (MOORE, DALLEY e AGUR, 2019).

As articulações sinoviais são áreas de grande suprimento nervoso, e por essa razão doenças e traumas que atingem essas estruturas são potencialmente dolorosas, trazendo grande impacto na capacidade funcional do indivíduo (LENT, 2010; SCHNORBERGER, JORGE e WIBELINGER, 2017). Dados da Organização Mundial da Saúde revelaram que a expectativa de vida de população mundial vem crescendo com o passar das décadas. Com esse aumento da população idosa, a incidência de condições reumáticas crônicas como a artrite também apresentou elevação (CROSS et al., 2014).

Entre as doenças que acometem as articulações, uma das mais danosas é a artrite reumatoide, uma doença inflamatória, crônica, autoimune, que agride principalmente as articulações das regiões periféricas, com grande capacidade de degeneração irreversível dos tecidos que compõe a estrutura articular (CAMPOS et al. 2016).

O diagnóstico da artrite reumatoide é complexo. Os critérios foram estabelecidos em 1987 pela Associação Americana de Reumatologia. Sete evidências da doença foram definidas, entre elas, a rigidez matinal, artrite em três ou mais articulações, artrite em articulações das mãos, artrite simétrica, nódulos reumatoides, fator reumatoide no soro e alterações radiológicas. Para o diagnóstico é necessário à presença de no mínimo quatro das sete evidências (MOTA et al, 2013).

A doença ataca o tecido conjuntivo de diferentes órgãos, mas em especial a membrana sinovial das articulações diartrodiais, provocando

inflamação crônica desta estrutura, uma condição chamada de sinovite, com potencial de produzir destruição das articulações e anquilose. As lesões articulares usualmente são simétricas e geralmente progressivas. A evolução da artrite reumatoide ocorre alternando surtos com remissões e exacerbações, e por isso, não é raro a superposição de lesões na mesma estrutura (FILHO, 2018).

Como consequência da doença, principalmente quando não há tratamento adequado, os pacientes sofrem deformidade articular, incapacidade funcional, limitação das atividades cotidianas, condições que podem levar o indivíduo a dependência funcional. Com o avanço da doença a expectativa de vida torna-se reduzida (SCHNORBERGER, JORGE e WIBELINGER, 2017).

O processo inflamatório na articulação se inicia na membrana sinovial, uma estrutura que apresenta em sua superfície interna células sinoviais de dois tipos. As células do tipo A são similares aos macrófagos e as células do tipo B se assemelham aos fibroblastos (LOPES, 2013).

Na artrite reumatoide há resposta imune adaptativa contra um antígeno ainda desconhecido, mas concentrado nas articulações. Este antígeno ativa os linfócitos TCD4, que juntamente com linfócitos B e macrófagos desempenham papel patológico importante na doença causando inflamação local e em alguns casos em outros órgãos (FILHO, 2018).

Esses eventos na gênese da artrite reumatoide resultam em um processo inflamatório crônico. As diversas células inflamatórias presentes vão liberar quimiocinas, citocinas, ERO e outras substâncias pró-inflamatórias, tornando o processo cada vez mais complexo e destrutivo aos tecidos locais (MOTA et al, 2013).

Os neutrófilos presentes no líquido sinovial vão liberar espécies reativas de oxigênio e enzimas lisossômicas, iniciando a inflamação. As citocinas liberadas são importantes para os mecanismos de facilitação da resposta inflamatória, sendo responsáveis por diversos processos desencadeados durante a resposta (CAMPOS, 2016).

Os linfócitos T são capazes de produzir várias citocinas como o $IFN\gamma$ que ativa macrófagos que passam a expressar mais enzimas líticas e a produzir

mais mediadores inflamatórios como NO, prostaglandinas, IL-1 β e TNF- α (FILHO, 2018; CAMPOS, 2016).

O entendimento atual é que a artrite reumatoide abrange um grupo heterogêneo de doenças com antígenos diferentes e variações na resposta auto-imune (WOOLEY, 1995). Da mesma forma, existem diversos modelos para se investigar a patogênese e terapêutica das artrites. Modelos experimentais são válidos para testar mecanismos autoimunes da doença, e particularmente para prover ferramentas para elucidar a regulação imunogenética da artrite (WOOLEY, 1995). Experimentalmente, existem modelos para a indução de doença semelhante a artrite reumatoide em diversas espécies. No entanto, modelos utilizando roedores tem se mostrado importantes para a elucidação dos mecanismos de doença e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (WOOLEY, 1995).

Especificamente quanto ao modelo escolhido para o desenvolvimento desta tese, o modelo de artrite induzida por zimosan envolve a ativação dos receptores tipo toll 2, bem como a ativação da via alternativa do sistema de complemento. É realizada a administração intra-articular das partículas de zimosan. Este modelo é considerado útil no estudo pré-clínico para avaliar alterações nos tecidos, fisiopatologia da artrite e mecanismos de dor (Conde et al. 2008; Guerrero et al. 2006).

1.5 AINEs

Os AINEs estão entre as classes de fármacos mais prescritas no mundo. Esses compostos trazem alívio sintomático da febre, dor, edema. Existem formulações disponíveis para venda livre, o que amplia sua utilização indiscriminada (RANG et al, 2016; OLIVEIRA et al, 2019). Mesmo que entre os AINEs sejam descritas diferenças, farmacologicamente, o que une esses fármacos é sua capacidade de inibir a enzima COX, com isso inibindo a produção de prostaglandinas e tromboxanos. Existem duas isoformas de COX, a COX-1 e a COX-2 (RANG et al, 2016; OLIVEIRA et al, 2019).

A COX-1 é expressa de maneira constitutiva na maioria dos tecidos, incluindo as plaquetas no sangue, desempenha função relacionada à

manutenção da homeostase dos tecidos sendo responsável pela produção fisiologia de prostanoídes. A COX-2, por sua vez, é induzida por durante o processo inflamatório por mediadores como, por exemplo, IL-1 β e TNF- α (WHALEN, FINKEL e PAVANELIL, 2016). Contudo, a COX-2 também tem papéis endógenos como a regulação da irrigação sanguínea renal, e sua inibição pode causar lesão renal aguda (RANG et al, 2016; OLIVEIRA et al, 2019).

Segundo a recomendação da Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) para o tratamento farmacológico da artrite reumatoide, os AINES reduzem dor, atividade de doença e melhoram a capacidade funcional do paciente. Por isso, devem ser usados na fase inicial da doença. No entanto, a escolha do fármaco deve ser individualizada pelo fato que nenhum AINE se mostrou superior a outro (MOTA et al, 2018).

Via de regra, os AINES agem inibindo tanto COX-1 como a COX-2 com potencial de seletividade diferente para cada isoforma. Tanto AINES altamente seletivos para COX-1 ou COX-2, bem como os AINES com graus variados de seletividade entre COX-1 e COX-2 apresentam efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. No geral, isto se deve ao fato de que é necessária inibição de 80% de uma das isoformas para que se observe efeitos clínicos, e quando isso acontece, os AINES que não são altamente seletivos para uma das isoformas, estará inibindo as duas isoformas. Os AINES não seletivos COX-2 induzem efeitos relacionados a inibição da COX-1 que incluem a indução de ulcerações gastrointestinais. Esse é um efeito adverso importante e que limita a utilização dos AINES seletivos COX-1 ou não seletivos. Já os AINES altamente seletivos COX-2 apresentam efeitos adversos como o aumento de acidentes vasculares porque a COX-2 produz a PGI₂ em células endoteliais vasculares com função anti-agregante plaquetária. Outro efeito adverso importante relacionado a inibição da COX-2 é a lesão renal aguda devido ao papel da COX-2 de síntese de prostanoídes que regulam a homeostase renal. Contudo, não somente AINES altamente seletivos COX-2 induzem esses efeitos adversos, todos os AINES que inibem a COX-2 podem induzir esses efeitos (RANG et al, 2016; WHALEN, FINKEL e PAVANELIL, 2016).

Por isso, a SBR recomenda cautela no uso da AINEs, especialmente em pacientes com fatores de risco para os efeitos adversos do fármaco, nesse grupo são incluídos pacientes idosos, hipertensos, cardiopatas, com disfunções hepáticas e renais, doenças gastrointestinais e, insuficiência arterial e distúrbios de coagulação (MOTA et al, 2018).

1.6 Lesão renal aguda

Os rins foram descritos por Hall (2017), como órgãos pares, retroperitoniais, com peso aproximado de 150g, medindo 12cm em média no seu maior eixo. Fisiologicamente são responsáveis por um conjunto de funções orgânicas fundamentais, dentre elas, destacam-se a filtração sanguínea (para excreção de toxinas, ácido úrico, creatinina, amônia, ureia entre outros), secreção de substâncias essenciais (como a eritropoetina e vitamina D), manutenção da homeostasia eletrolítica (através da secreção e absorção de substâncias nos túbulos renais), contribuição no controle pressórico (balanço de água, produção de hormônio antidiurético, excreção de potássio), entre outras.

Lucas *et al* (2019), apontam que para executar sua função com eficiência, os rins recebem cerca de 25% do débito cardíaco. De forma a cumprir sua função esses órgãos dispõem de mecanismos de regulação como a síntese de prostaglandinas que atuam na manutenção da taxa de filtração glomerular (TFG) e da homeostase renal.

As prostaglandinas, em especial prostaciclina, PGE₂, PGD₂ desempenham papel de vasodilatação na arteríola aferente, ampliando a perfusão renal, aumentando o fluxo cortical para os néfrons na medula renal. Esse mecanismo age como uma contra regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso simpático, assegurando o fluxo sanguíneo adequado ao órgão (LUCAS, 2019).

A lesão renal aguda (LRA) se caracteriza por uma síndrome clínica descrita por declínio acelerado da função renal em curto período, levando ao desequilíbrio hidroeletrólítico e acidobásico, com conseqüente acúmulo de excretas nitrogenadas, condição conhecida como azotemia (BELLOMO, KELLUM e RONCO, 2012; WHELING, 2014).

A LRA é uma condição clínica complexa, inicialmente assintomática, e que pode advir de condições fisiopatológicas variadas. As etiologias mais comuns são lesões de isquemia-reperfusão, sepse e nefrotoxicidade endógena ou exógena, e são classificadas em três grandes grupos conforme o acometimento renal (BELLOMO, KELLUM e RONCO, 2012; WHELING, 2014).

A LRA é a forma mais simples e usual, e resulta da hipoperfusão renal, ocasionando uma pressão intra-glomerular insuficiente para manter a TFG. Nessa fase, normalmente não são descritas lesões parenquimatosas, e os distúrbios funcionais túbulo-glomerulares podem ser revertidos através da melhor perfusão renal. No entanto, a perpetuação deste quadro isquêmico leva à necrose do epitélio tubular e deterioração da função renal (LUCAS, 2019).

Medicamentos que bloqueiam seletivamente a síntese de angiotensina II, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ex.: enalapril, captopril) e bloqueadores do receptor de angiotensina (ex.: losartana, valsartana), ou ainda inibidores da síntese de prostaglandinas, como os anti-inflamatórios não esteroidais, podem causar LRA por hipofluxo arterial (LUCAS, 2019).

A LRA induzida por fármacos apresenta uma incidência entre 2% a 5% em pacientes hospitalizados (COSTA; VIEIRA-NETO; NETO, 2003), sendo os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) sua principal causa. É uma classe de compostos usualmente prescritos para o tratamento de analgesia e de condições inflamatórias, de alta eficácia. No entanto, seu uso prolongado ou altas doses podem levar a lesão renal (LUCAS et al. 2018).

Os AINEs inibem a cascata do ácido araquidônico, levando a um efeito negativo na formação de prostaglandinas. Considerando que a principal ação das prostaglandinas é a vasodilatação arteriolar para manter a perfusão renal, essa inibição acarretará uma perturbação na hemodinâmica renal, ocasionando isquemia medular e levando à LRA (PAZHAYATTIL e SHIRALI, 2014).

Além da inibição da síntese de prostaglandinas vasodilatadoras, os AINEs inibem a estimulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, com isso o fluxo renal fica comprometido acarretando hipoperfusão renal adicional. Também pode haver redução da ação antagônica do hormônio antidiurético (ADH) causando retenção de sódio e água, causando edema (BAKER e PERAZELLA, 2020).

Esse conjunto de eventos pode levar ao edema e hipertensão, sendo essas condições clínicas mais comumente observadas em usuários crônicos destas drogas. A Lesão orgânica do parênquima renal ou lesão intrínseca é causada por doenças parenquimatosas inflamatórias ou autoimunes, e também podem levar ao declínio ao TFG por meios fisiopatológicos complexos que envolvem diversos aspectos da imunidade inata, celular e humoral (LUCAS, 2019; FILHO, 2018).

Neste grande grupo encontram-se as glomerulonefrites agudas e nefrites intersticiais agudas, causadas por doenças infecciosas (glomerulonefrites pós-estreptocócicas, hepatite B e C, endocardite), doenças sistêmicas (lúpus sistêmicos, púrpura de Henoch-Schönlein, síndromes paraneoplásicas), medicamentos (alopurinol, hidralazina), doenças glomerulares (glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite membranosa, nefropatia por IgA) e idiopática (ABBAS, FAUSTO E KUMAR, 2018).

Por sua vez a LRA pós-renal é ocasionada por obstrução aguda do fluxo urinário em qualquer ponto do trato urinário capaz de levar a diminuição da taxa de filtração glomerular por aumento da pressão intra-tubular e consequente aumento retrógrado da pressão hidrostática. A dilatação do sistema pielo-calicial, condição denominada hidronefrose, é um achado clássico nesta condição. Suas principais causas são obstruções urinárias por litíase urinária, tumores do trato ginecológico ou gastrointestinal, hiperplasia prostática benigna e disfunções miccionais (BELLOMO, KELLUM e RONCO, 2012).

1.7 Flavonoides

Ungprasert et al. (2015) apontam que os AINES são os compostos mais utilizados na prática clínica. Devido à sua ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética sua utilização se torna corriqueira no tratamento de condições inflamatórias e da dor aguda. Realmente, os AINES são extremamente eficientes em sua ação, no entanto, seu uso de forma indiscriminada representa grande risco ao paciente.

Segundo Lucas et al. (2019) os maiores usuários de AINEs são indivíduos acometidos por quadros de dor crônica, usualmente associadas a

doenças reumatológicas. Dependendo da dose e do tempo de utilização, os AINES também induzem vários efeitos colaterais. Galesic et al (2008), descrevem danos gastrointestinais, lesão renal aguda e disfunção cardiovascular como os principais efeitos adversos dessa classe de fármacos.

Kumar e Pandey (2013) apontam que flavonoides são compostos polifenólicos que constituem uma importante classe de moléculas naturais presentes nos alimentos e plantas, entre eles, a naringenina (4',5,7-trihydroxflavonone). A naringenina é um flavonoide encontrado em frutas cítricas, surge como um componente com grande potencial para tratar tanto inflamação agudas como crônicas e condições neuropáticas.

Os flavonoides apresentam propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, e que apresentam menos efeitos colaterais ou até mesmo nenhum efeito colateral (FERRAZ et al. 2020).

Para compreender a farmacodinâmica dos flavonoides devemos lembrar que o processo inflamatório é induzido por mediadores que são produzidos por células imunes presentes nos tecidos e células que serão recrutadas pelo tecido atingido durante a resposta inflamatória, entre esses mediadores estão PGE₂, bradicinina, aminas simpáticas e citocinas pró-inflamatórias (WHALEN, FINKEL e PANAVELIL, 2016).

A ação dos flavonoides envolve a inibição das citocinas pró-inflamatórias, ativação do fator de transcrição Nrf2. Ou seja, os flavonoides são moléculas multialvo que embora inibam de maneira significativa vários alvos celulares durante a inflamação, não atuam abolindo um mecanismo. Por isso, as funções fisiológicas são parcialmente mantidas, o que explica os baixos níveis de efeitos adversos (FERRAZ et al. 2020).

A naringenina é um membro da classe flavanonas dentre os flavonoides. A naringenina é encontrada principalmente em frutas cítrica como tangerina, limão, laranja, toranja e tomates. Em humanos, a absorção da naringenina ocorre nos cólons com a biovariabilidade similar a outros flavonoides como os flavonóis ou flavonóis, a excreção urinária da naringenina na maioria das vezes ocorre completamente após 24h. (JEONG, et al. 2001)

As atividades biológicas descritas para naringenina incluem hepatoproteção, anticancerígena, analgésica, anti-inflamatória, e propriedades antioxidantes. Por exemplo, a naringenina foi capaz de bloquear vírus ativos de

hepatite C e replicação do vírus da dengue, e inibir a progressão do câncer de próstata humano, de pâncreas e de cólon (FERRAZ et al., 2020).

O composto também demonstrou eficiente ação terapêutica em modelos de indução de irradiação com raios ultravioleta B (UVB) para inflamação de pele. Evidências demonstram que a naringenina possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antioxidantes em nível periférico e espinhal nos modelos de dor inflamatória induzida por severo estímulo inflamatório, e condições de dor neuropática (MANCHOPE et al. 2016, FERRAZ et al. 2020).

Nessa classe de flavonoides também é encontrada a hesperidina, presente principalmente em frutas cítricas. A hesperidina é um composto com capacidade de reduzir a ação das citocinas pró-inflamatórias, a geração de ânion superóxido, bem como tem capacidade de modular a polarização de macrófagos (PINHO-RIBEIRO et al. 2015; FERRAZ et al. 2020). A hesperidina também tem a capacidade de ampliar a atividade de enzimas antioxidantes, apresentando efeitos farmacológicos descritos como anti-inflamatórios, analgésicos, antioxidantes e antialérgicos. No entanto, a hesperidina apresenta baixa solubilidade em água como consequência sua absorção intestinal é baixa (PINHO-RIBEIRO et al. 2015; FERRAZ et al. 2020).

Para que haja melhor aproveitamento é necessário ampliar a hidrossolubilidade da hesperidina. Para isso, é realizada a metilação da hesperidina sob condições alcalinas gerando a hesperidina metil chalcona (HMC). A HMC apresenta maior solubilidade em água sendo melhor distribuída nos tecidos (PINHO-RIBEIRO et al. 2015). A HMC também tem ação inibidora da produção das citocinas pró-inflamatórias, com ação anti-inflamatória e analgésica em modelos experimentais (PINHO-RIBEIRO et al. 2015; FERRAZ et al. 2020). Foi demonstrado que esta inibição ocorre através da interação molecular com a serina do p65 NFkB, HMC inibe hiperalgesia mecânica e térmica induzida por diversos compostos inflamatórios como a carragenina, capsaicina e CFA. Mecanicamente, a HMC inibe a produção de citocinas induzidas por carragenina (TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-10), estresse oxidativo e ativação do NFkB, isso proporciona inibição da sinalização inflamatória deste fator de transcrição, explicando a redução da produção de mediadores inflamatórios. (RASQUEL-OLIVEIRA et al, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

-Avaliar os efeitos dos tratamentos e mecanismos de ação da naringenina em modelo de artrite induzida por zimosan, e da hesperidina metil chalcona em modelo de lesão renal aguda induzida por diclofenaco sódico.

2.2. Objetivos específicos

-Avaliar os efeitos da naringenina sobre:

- Dor e edema articulares;
- Recrutamento de células inflamatórias;
- Modulação da produção de mediadores inflamatórios como a expressão de prepro-ET-1 e produção de citocinas e parâmetros de estresse oxidativo,
- Expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3 e dos fatores de transcrição NFκB e Nrf2 induzidos pela administração i.a. de zimosan.

-Avaliar os efeitos da HMC sobre:

- Os níveis de marcadores de função renal (ureia e creatinina);
- Parâmetros de estresse oxidativo e modulação da produção de citocinas no sangue, assim como parâmetros de estresse oxidativo;
- Modulação da produção de citocinas, edema e danos teciduais (histopatologia e níveis urinários da enzima NGAL);
- Ativação da via do fator de transcrição Nrf2 e expressão do KEAP-1 nos rins após administração oral do diclofenaco sódico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos machos da raça Swiss, com 1 mês de idade aproximadamente, pesando entre 20 e 25g provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

Os camundongos foram alojados no biotério do Departamento de Patologia, no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, em gaiolas de plásticas, com acesso livre a água e comida, com ciclos de claro e escuro de 12/12h, temperatura controlada e troca de ar constante.

Os animais foram usados apenas uma vez por experimento, e mantidos em ambiente livre de stress por dois dias antes dos experimentos. Para os procedimentos comportamentais, os animais eram aclimatados na sala de experimento pelo uma 1 h antes do teste, que sempre eram conduzidos durante o ciclo de claro.

Todos os animais foram utilizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA-UEL), registrado sobre os protocolos números 17427.2014.65, datado de 30 de setembro de 2014 e 15236.2015.73, datado de 08 d outubro de 2015.

Os procedimentos de cuidados com animais foram seguidos de acordo com Associação Internacional de Estudos de Dor (IASP), Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA), e EU Directive 2010/63/EU guia para experimentação animal.

Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento. Ao final de cada protocolo, camundongos eram anestesiados por inalação com overdose de 5% de isoflurano e eutanasiados por deslocamento cervical, seguido por decapitação.

3.2 Protocolos experimentais

Para o modelo de artrite induzida por zimosan, os camundongos foram tratados pela via oral com veículo ou três doses de naringenina (16.7, 50 ou 150mg/kg) 1h antes de injeção intra-articular (i.a) de veículo ou zimosan (100µg/10µL/ joelho).

A administração foi realizada sempre no joelho direito dos camundongos. Sete horas após a indução da artrite, amostras das articulações do joelho foram coletadas para determinar recrutamento leucocitário (total de leucócitos, neutrófilos, e células mononucleares) na cavidade sinovial.

Após definir a dose mais efetiva de naringenina, os seguintes experimentos foram realizados: (1) análise histopatológica; (2) avaliação do stress oxidativo (expressão do RNAm de gp91^{phox}, Nrf2, e heme-oxigenase-1 (HO-1), e produção de anión superóxido e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), bem como a expressão da proteína Nrf2 e CD45 por imunofluorescência no fluído sinovial; (3) as expressões do RNAm de moléculas do complexo multiproteico inflamassoma foram determinados 4h após injeção i.a. de zimosan (Nlrp3, ASC, caspase-1, e pro-interleucina (IL)-1β); (4) produção de citocinas por ELISA (TNF-α, IL-1β, IL-33 e IL-10) e ativação de NFκB (5 e 3 h) após injeção i.a. de zimosan, respectivamente.

Para o modelo de lesão renal induzida por diclofenaco os animais receberam dose de 200 mg/kg de diclofenaco de sódio v.o., 30 minutos após o estímulo foram tratados i.p com veículo ou quatro doses de HMC (1, 3, 10 e 30mg). Vinte e quatro horas após a indução amostras de sangue e tecido renal foram coletadas para determinar alterações morfológicas, estresse oxidativo e ação de citocinas.

Após a definição da dose mais efetiva, os seguintes experimentos foram conduzidos (1) análise histopatológica; (2) avaliação do estresse oxidativo e (3) produção de citocinas.

3.3 Compostos Testados

Os compostos utilizados no presente estudo foram solução salina (NaCl 0,9% da Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brazil.), naringenina (PubChem CID: 439246; MW: 272.245g/mol; ≥95% pureza, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), e zimosan (de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Também foram empregados no trabalho o HMC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e diclofenaco de sódio (Neutaren[®]) obtido da Novartis (São Paulo, SP).

3.4. Indução da inflamação do joelho, lesão renal e protocolos de tratamento

A inflamação na articulação do joelho foi induzida por uma injeção i.a. de 100µg/cavidade de zimosan em 10µL de salina estéril dentro da cavidade fêmur tibial direita como previamente descrita (Guerrero et al. 2006).

Camundongos foram pré-tratados (1h antes da injeção i.a de zimosan) com 100µl de veículo (salina) ou 16.7,50, e 150mg/kg de naringenina por via oral para procedimentos experimentais. Os animais do grupo controle receberam uma injeção i.a com volume equivalente de solução salina.

A lesão renal aguda foi induzida através da administração v.o. de 200mg/Kg de diclofenaco de sódio, diluído em solução salina trinta minutos antes da administração do tratamento.

3.5 Avaliação da hiperalgesia mecânica articular

A avaliação da hiperalgesia mecânica da articulação do joelho direito iniciou 1 h após a administração i.a. do veículo ou zimosan e continuou nos

períodos de 1,3,5 e 7h após o estímulo i.a. Medidas foram realizadas utilizando uma versão eletrônica dos filamentos do Von Frey.

Um medidor de pressão eletrônico acoplado a um transdutor de força, equipado com ponta de polipropileno. (Insight instruments, Ribeirão Preto, SP, Brazil), foi usado para avaliar para limite de dor nos animais.

Para o registro, camundongos foram colocados em gaiolas acrílicas individuais, com piso em grade 15-30 minutos antes dos testes. Uma força perpendicular ampliada foi aplicada na área central da superfície plantar da pata homolateral para estimulação dos joelhos (sempre para direita no presente estudo), utilizando uma ponta grande com 4.15mm² de área para os efeitos subcutâneos e induzir a flexão da articulação do joelho, seguida pela retirada da pata sensibilizada. A força mecânica foi aplicada apenas quando animais estavam calmos e descansados com as quatro patas no piso de grade. Os resultados foram expressos em gramas (g) (Guerrero et al. 2006).

3.6 Avaliação do edema articular

Edema femurotibial foi avaliado 1, 3, 5 e 7h após injeção de veículo ou zimosan foi mensurando pela medida do diâmetro transversal da articulação do joelho utilizando paquímetro analógico.

Valores da espessura da articulação femurotibial foram expressos pela diferença entre os diâmetros medidos antes (basal) e após indução de inflação articular em milímetros (mm). (CONTE et al. 2008).

3.7 Recrutamento leucocitário para cavidade sinovial.

O recrutamento leucocitário para cavidade sinovial foi avaliado 7h após injeção de veículo ou zimosan. A Cavidade Articular foi lavada três vezes com uma solução de 3.3µL estéril salina com 1mM ácido etilenodiamino tetracético (EDTA).

O número total de leucócitos foi determinado na câmara de Rosenfeld. Contagem diferencial de células foi determinado pelos cortes Rosenfeld usando um microscópio óptico, os resultados foram expressos como número total de leucócitos, neutrófilos, e células mononucleares por cavidade (CONTE et al. 2008).

3.8 Análise histopatológica da articulação do joelho.

Todas as amostras de articulação do joelho (porção distal do fêmur, capsula articular, e porção proximal da tíbia) foram coletadas 7h após as injeções i.a de zimosan ou veículo, dissecadas, e fixadas em formalina à 10% por 12 h.

Após a descalcificação em solução salina tamponada de fosfato 10% (PBS) por duas semanas, as amostras foram processadas para serem emblocadas em parafina. Cortes de tecido (5 μ m) foram coradas em H&E., montadas em lâmina histológicas de vidro permanente e analisadas em microscópio óptico (Olympus OX31, Tokyo, Japan), acoplado a uma câmera digital (Lumenera Infinity 1, Ottawa, Canada). Os scores histopatológicos de infiltração de células inflamatórias na cavidade sinovial nos grupos experimentais foram realizados utilizando dimensionamento de 279x195 pixels por campo.

3.9 PCR quantitativo em tempo real

Todas as amostras de articulação de joelho (porção distal do fêmur, capsula articular, e porção proximal da tíbia) dos animais foram coletadas e homogeneizadas utilizando reagente Trizol nos momentos indicados.

RNA total foi extraído utilizando o SV Total RNA Isolation System (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA). A pureza do RNA total foi avaliada com um espectrômetro (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland), e amostras com comprimento de onda de absorção entre 1.8 e 2.0 foram usadas para todas as preparações.

O processo de transcrição reversa do RNA total para DNAC foi realizado utilizando GoScript™ Reverse Transcriptase System (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA). PCR quantitativo foi realizado usando Go Taq®qPCR Master Mix (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA) e primers específicos.

Todas as reações foram conduzidas no StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystem ®). A expressão relativa do gene foi avaliada utilizando a metodologia comparativa $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Manchope et al. 2016; Ruiz-Miyazawa et al. 2018). Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) expresso no RNAm foi utilizado como referência para normalizar os dados.

3.10 Avaliação da produção de ânion superóxido

Todas as amostras de articulação de joelho (porção distal do fêmur, capsula articular, e porção proximal da tíbia) foi coletada em KCl tamponado 3h após administração i.a. de zimosan ou veículo para determinação da produção de ânion superóxido através da redução do corante redox nitrobluetetrazólio (NBT).

Solução de NBT (1mg/mL) foi adicionado as amostras, seguindo por incubação por 1h à 37°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, e o precipitado de formazan foi então solubilizando por 2m OH e dimetilsulfóxido (DMSO).

A densidade óptica foi medida utilizando um fotoespectrometro (Multisan GO microplate, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia) at 600 nm. Os resultados foram representados pela redução de NBT (OD/mg por amostra).

3.11 Ensaio de atividade de GSH

Os níveis de GSH foram determinados em todas as amostras de articulação (porção distal do fêmur, capsula articular, e porção proximal da

tíbia) 3 horas após a administração i.a de veículo ou zimosan utilizando o método de espectrofotometria.

As amostras foram homogeneizadas em solução 0,002 M de EDTA, o homogenato foi tratado com 50% de ácido tricloroacético para subsequente centrifugação de 1500g por 15 minutos. Após, 100 μ L da amostra foi misturada com 200 μ L de 0,4 M de Tris-HCl, ph 8.9 e 10 μ L de 10 mM ácido ditiobisnitrobenzóico em metanol foi adicionado.

A absorbância a 42 nm foi utilizada para leituras (Multiskan GO microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finlândia), após cinco minutos. A curva padrão foi preparada com 0,50 μ M de GSH e os resultados foram apresentados como nanomols (nmol) de GSH/mg de amostra (Manchope et al. 2016; Ruiz-Miyazawa et al. 2018).

3.12 Produção de citocinas

Todas as amostras de articulação de joelho (porção distal do fêmur, capsula articular, e porção proximal de tíbia) foram coletadas 5h após a injeção i.a de veículo ou zimosan e processado para determinar níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-33, e IL-10 kits comerciais para ensaio de imunabsorbância enzimática da eBioscience (Affymetrix, San Diego, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante (Manchope et al. 2016).

3.13 Determinação de ativação de NF κ B

Todas as amostras de articulação de joelho (porção distal de fêmur, capsula articular, e porção proximal da tíbia), foram coletadas 3h após a injeção i.a. de veículo e zimosan e homogeneizada em tampão de lise gelado (Cell Sgning Technology, Beverly, MA, USA).

O homogenato foi centrifugado a 16.000g, por 10 min por 10 min, e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de fosforilado e o NFB total em

subunidade p65 por ELISA usando kit de PathScan® (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) seguindo as instruções do fabricante.

As leituras foram realizadas espectrofotometricamente a 450 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finlandia). Os resultados são apresentados como a proporção da amostra da ativação de NFkB (total p65/phospho-p65) por miligrama (mg) de amostra (Ruiz-Miyazawa et al. 2018).

3.14 Ensaio de imunofluorescência em microscópio confocal

Os fluidos articulares foram coletados 7 horas após a injeção i.a. utilizando solução de paraformaldeído 1% (40µL). As células foram então centrifugadas (5 min, 4° C, 300g) e incubados em blocos tamponados. (PBS, 2% BSA, 0,1% Triton) por 1 hora no gelo.

Após a centrifugação, células foram encubadas e conjugadas com anticorpos específicos por mais 1 hora no gelo. Após duas lavagens em PBS, células foram recuperadas em PBS, fixadas em lâmina silanizadas e secas em temperatura ambiente durante a noite. Os anticorpos secundários para as moléculas-alvo foram adicionados para se ligar as células e incubados por duas horas na temperatura ambiente.

A escolha das imagens representativas e análise quantitativa foram realizadas utilizando o microscópio confocal (SP8, Leica, Microsystems, Mannheim, Alemanha). A intensidade da fluorescência foi quantificada em campos randomicamente escolhidas em diferentes grupos por um avaliador externo.

Os resultados foram apresentados como intensidade de fluorescência (pixels em tom de cinza), para a proteína alvo e para a relação de intensidade de fluorescência pelo número de células em cada campo (Ruiz-Miyazawa et al. 2018).

3.15 Avaliação da função renal

Vinte e quatro horas após a administração da dose tóxica de diclofenaco, os níveis plasmáticos de ureia, creatinina e proteinúria foram avaliados em amostras de sangue e urina. O sangue coletado foi adicionado em microtúbulos com anticoagulante ácido etilenodiamina tetracético (EDTA, 5000 IU/ml, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, EUA).

Após centrifugação (200xg, 10 min, 4°C), amostras de plasma foram processadas seguindo as instruções do fabricante para determinar os níveis de ureia e creatinina usando kit comerciais (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) como indicadores de LRA. Os resultados são apresentados em miligramas por decilitro (mg/dL) de ureia ou creatinina plasmática.

Para análise de proteinúria, amostras de urina também foram coletadas 24h após o estímulo de diclofenaco através de compressão moderadas da região pélvica do animal em adicionado em microtúbulos esterilizados para análise utilizando o métodos de Lowry.

3.16 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica em amostras de rim e plasma de animais intoxicados com diclofenaco foi determinada 24h após o estímulo por meio da avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para este ensaio foi adicionado ácido ticloroacético (TCA; 10%) ao tecido homogenato ou amostras de plasma, visando precipitação de proteínas.

Após esta etapa, amostras foram centrifugadas (1000xg, 3 min, 4°C), e sobrenadante resultante foi separado por meio da adição de ácido tiobarbitúrico (TBA; 0,67%), seguido por incubação por 15 minutos em banho de água fervente (100°C) para posterior transferência para banho gelado.

Um produto intermediário da peroxidação lipídica, chamado de malondialdeído (MDA) foi quantificado nas amostras de rim e plasma pela

diferença entre absorvância obtida espectrofotometricamente a 535 e 572 nm (Multiskan GO Microplate Spectrometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland).

Resultados são apresentados como peroxidação lipídica (nanomols [nmol] de MDA por mL de plasma) e (nmol de MDA por mg de tecido) nas amostras de rim.

3.17 Avaliação da concentração de NGAL na urina

Amostras de urina para avaliação da concentração de NGAL, um biomarcador da LRA foram coletados através compressão moderada da região pélvica dos animais e acondicionados em microtubulos 24h após a administração do diclofenaco, Amostras foram colocadas em placas pré-revestidas com NGAL e processadas utilizando kit ELISA seguindo a instruções do fabricante (SEB388Mu, Cloud-Clone Corp, Katy, TX, EUA).

Concentração de NGAL foi determinada espectrofotometricamente a 450nm (Multiskan GO Microplate Spectrometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland), resultados foram apresentados como NGAL urinário (ng/mL).

3.18 Avaliação da quantificação de FRAP

A capacidade endogena de oposição ao estresse oxidativo foi verificada espectrofotometricamente pelo teste de quantificação de FRAP. Amostras de tecido renal foram coletadas 24h após o estímulo com diclofenaco, homogeneizada com 500µL de 1.15% de KCl e centrifugada (200xg, 10min, 4°C).

Após esse passo, 15µL do sobrenadante foi misturado com 45µL de água desionizada e 200µL de reagente FRAP (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA), para posterior incubação a 37°C por 30 min. Resultados foram assimilados usando TROLOX (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA) curva padrão (1.5-30 micromoles [µmol]/L, concentração final). Os niveis de proteínas foram utilizados para normalizar os resultados. As leituras foram realizadas em

595 nm, e os resultados apresentados como nmol de Trolox equivalente por mg de proteína.

3.19 Teste de quantificação de ABTS

As amostras de tecido renal do grupo controle e dos grupos diclofenaco foram coletadas 24h após o estímulo para determinar a capacidade de eliminação de radicais livres. Para o teste de ABTS, 15 μ L do mesmo sobrenadante foi obtido durante o processamento das amostras para quantificação de FRAP foram adicionados a 200 μ L de uma solução contendo reagente 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína - 6 - ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA), misturado com salina tamponada com fosfato a pH 7, para absorvância de 0,80 a 730 nm.

Após período de 6 minutos a absorvância foi lida a 730 nm. A curva padrão de Trolox (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA) foi utilizada (com as mesmas características apresentadas no teste de quantificação de FRAP). Resultados foram apresentados como nmol de Trolox equivalente por mg de tecido renal.

3.20 Análise estatística

Resultados foram apresentados como significância \pm SEM das avaliações realizadas em seis camundongos de cada grupo em cada experimento e foram representativos de dois experimentos independentes.

ANOVA Two-way seguindo pelo teste post hoc de Newman-Keuls foram utilizados para comparar os dois grupos em nos diversos momentos. ANOVA One-way seguido pelo teste de Turkey post hoc foi realizado para determinar diferenças estatísticas. Por outro lado, teste de Kruskal-Wallis seguindo por teste de Dunn post-hoc foi utilizado para variáveis categóricas.

Os dados foram analisados utilizando software de estatística GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados gerados a partir do período de doutoramento resultaram na produção de dois artigos científicos que serão apresentados a seguir: o primeiro foi publicado no periódico *Inflammopharmacology*; e o segundo publicado no periódico *Antioxidants*.

4.1 Artigo 1 **The citrus flavanone naringenin attenuates zymosan inflammation: induction of Nrf2 expression in recruited CD45+ hematopoietic cells**

Allan J. C. Bussmann^{a#}, Sergio M. Borghi^{a#}, Tiago H. Zaninelli^a, Telma S. dos Santos^a, Carla F.S. Guazelli^a, Victor Fattori^a, Talita P. Domiciano^a, Felipe A. Pinho-Ribeiro^a, Kenji W. Ruiz-Miyazawa^a, Antonio M. B. Casella^b, Josiane A. Vignoli^c, Doumit Camilios-Neto^c, Rubia Casagrande^d, Waldiceu A. Verri, Jr^{a,*}

^aDepartment of Pathology, Biological Science Center, Londrina State University, 86057-970, Londrina, Paraná State, Brazil.

^bDepartment of Clinical Medicine, Health Science Center, Londrina State University, University Hospital, 86039-440, Londrina, Paraná State, Brazil.

^cDepartment of Biochemistry and Biotechnology, Exact Sciences Center, Londrina State University, 86057-970, Brazil.

^dDepartment of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Londrina State University, University Hospital, 86039-440, Londrina, Paraná State, Brazil.

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Waldiceu A Verri Jr, Department of Pathology, Biological Science Center, Londrina State University, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, zip code: 86051-990, Londrina, Paraná State, Brazil. Tel.: + 55 43 3371-4979; fax: + 55 43 3371 4387. E-mail address: waverri@uel.br or waldiceujr@yahoo.com.br (W.A. Verri).

Abstract

Background: Naringenin is a biologically active analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant flavonoid. Naringenin targets in inflammation-induced articular pain remains poorly explored. **Methods:** The present study investigated the cellular and molecular mechanisms involved in the analgesic/anti-inflammatory effects of naringenin in zymosan-induced arthritis. Mice were pre-treated orally with naringenin (16.7-150 mg/kg), followed by intra-articular injection of zymosan. Articular mechanical hyperalgesia and edema, leukocyte recruitment to synovial cavity, histopathology, expression/production of pro- and anti-inflammatory mediators and NFκB activation, inflammasome components expression and oxidative stress were evaluated. **Results:** Naringenin inhibited articular pain and edema in a dose-dependent manner. The dose of 50 mg/kg inhibited leukocyte recruitment, histopathological alterations, NFκB activation and NFκB-dependent pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, and IL-33), and prepro-ET-1 mRNA expression, increased anti-inflammatory IL-10. Naringenin also inhibited inflammasome upregulation (reduced Nlrp3, ASC, caspase-1, and pro-IL-1β mRNA expression), oxidative stress (reduced gp91^{phox} mRNA

expression and superoxide anion production, increased GSH levels, induced Nrf2 protein in CD45⁺ hematopoietic recruited cells and induced Nrf2 and HO-1 mRNA expression). Conclusions: Naringenin presents analgesic and anti-inflammatory effects in zymosan-induced arthritis by targeting its main physiopathological mechanisms. These data highlight this flavonoid as an interesting therapeutic compound to treat joint inflammation, deserving additional pre-clinical and clinical studies.

Keywords: Naringenin; arthritis; zymosan; pain; inflammation; NFκB; and Nrf2.

Introduction

Recent statistics from the World Health Organization (WHO) reveal that life expectancy has gradually increased worldwide in the past decades. This global scenario translates in a growth in the population of elderly individuals, which correlates with higher incidence of age-related chronic rheumatic conditions like arthritis. Rheumatic diseases are progressive and accompanied by pain, deformity, and physical disability with a direct impact on the quality of life and sociability of affected patients (Cross et al. 2014). The current clinical treatment of arthritis relies mainly on corticoids, methotrexate, and immunobiological agents alone or in combination. However, these pharmacological approaches often present serious adverse effects. The cost of immunobiological treatment is also a factor to consider (Kesselheim et al. 2016; Laev and Salakhutdinov 2015). Thereby, pre-clinical studies focusing on the development of novel pharmacological options for the treatment of arthritis with less adverse effects and lower costs are encouraged.

Flavonoids are polyphenolic compounds that constitute an important class of natural molecules present in foods and plants (Kumar and Pandey 2013). Among them,

the citrus flavonoid naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanone) arises as a compound with a great potential to treat both acute and chronic inflammatory and neuropathic conditions (Hu and Zhao 2014; Lim et al. 2017; Manchope et al. 2016; Martinez et al. 2015; Park et al. 2017; Pinho-Ribeiro et al. 2016a; Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Ruiz-Miyazawa et al. 2018). Naringenin is a member of the flavanone class of flavonoids and is mainly found in citrus fruits such as tangerine, lemon, orange, grapefruit, and tomatoes (Figure 1) (Manchope et al. 2016; Manchope et al. 2017; Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Ruiz-Miyazawa et al. 2018). In humans, absorption of flavanones including naringenin occurs in the colon with a bioavailability similar to other flavonoids such as flavonols or flavanols. The urinary excretion of naringenin is almost complete within 24 h (Manach et al. 2003). Naringenin is a rich flavanone-glycoside known by the bitter taste in grapefruit, and following ingestion is broken down by gut flora to form the aglycone compound naringenin (Shulman et al. 2011). In healthy men, the relative bioavailability (measured by area under the curve; $AUC_{0-48\text{ h}}$) and plasma concentration (C_{max}) of naringenin after the consumption of a flavonoid juice mix are significantly higher than that observed for quercetin and hesperidin (Krogholm et al. 2010). In mice, oral ingestion of an extract containing naringenin leads to the detection of plasma concentration within 60 min, and complete elimination after 24 h (Sun et al. 2013).

The biological activities described for naringenin include hepatoprotective, anti-cancer, analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant properties (Lim et al. 2017; Manchope et al. 2016; Nahmias et al. 2008; Park et al. 2017; Pinho-Ribeiro et al. 2016a; Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Ruiz-Miyazawa et al. 2018; Zhao et al. 2016). For instance, naringenin is able to block hepatitis C virus activity (Nahmias et al. 2008), dengue virus replication (Frabasile et al. 2017), and inhibit the progression of human prostatic, pancreatic and colon cancers (Lim et al. 2017; Park et al. 2017; Zhao et al. 2016).

Naringenin also showed efficient therapeutic actions in a model of ultra-violet B (UVB) irradiation-induced skin inflammation (Martinez et al. 2015). Evidence shows that naringenin possesses analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant activities at peripheral and spinal levels in models of inflammatory pain induced by several inflammatory stimuli (Manchope et al. 2016; Pinho-Ribeiro et al. 2016a; Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Ruiz-Miyazawa et al. 2018) and neuropathic pain conditions (Al-Rejaie et al. 2015; Hu and Zhao 2014; Kaulaskar et al. 2012). In a model of complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats, an extract containing naringenin together with other flavonoids reduced blood systemic inflammatory parameters and alterations of histopathological and imaging exams of joints (Ananth et al. 2016). Naringenin alone reduced CFA-induced pro-inflammatory cytokine production (Zhu et al. 2015) and dendritic cell maturation in collagen-induced arthritis (CIA) (Li et al. 2015) models. Our group has recently demonstrated the analgesic and anti-inflammatory potential of naringenin to inhibit MSU crystals-induced joint pain and inflammation in mice (Ruiz-Miyazawa et al. 2018). Zymosan is a fungi wall component widely used to investigate inflammatory mechanisms and drug effect. In fact, zymosan-induced arthritis is considered a useful pre-clinical model to study the tissue alterations in the joints, arthritis pathology, and pain mechanisms (Conte Fde et al. 2008; Guerrero et al. 2006). Despite the importance of determining the effect of a novel anti-inflammatory candidate in zymosan-induced arthritis (Asquith et al. 2009), it remains to be determined the effect of naringenin in this model. Therefore, the present study aims to determine whether naringenin would inhibit zymosan-induced arthritis. We evaluated the effects of the flavanone naringenin in the zymosan-induced arthritis model (Guerrero et al. 2006) focusing on the role of leukocytes, oxidative stress, inflammasome, cytokines, endothelin-1, and nuclear factor κ B (NF κ B). Further, we investigated whether

naringenin would interfere with Nrf2 expression by leukocytes recruited to the synovial fluid represented by CD45⁺ hematopoietic cells.

Materials and methods

General experimental procedures

Mice were treated by per oral route (p.o.) with vehicle or three titrated doses of naringenin (16.7-150 mg/kg) 1 h before vehicle or zymosan (100 µg/10 µL/ knee joint) i.a. injection in the right knee joint of mice. Articular mechanical hyperalgesia and edema were evaluated 1-7 h after zymosan. Seven hours after the induction of arthritis, knee joint samples were collected for the determination of leukocyte recruitment (total leukocytes, neutrophils, and mononuclear cells) to the synovial cavity. After defining the most effective dose of naringenin, the following set of experiments were conducted: 1) histopathological (hematoxylin and eosin, H&E) analysis of the knee joint 7 h after zymosan i.a. injection; 2) Oxidative stress and mRNA expression of molecules regulating oxidative stress responses: knee joint samples 3 h after zymosan injection to evaluate gp91^{phox}, nuclear factor erythroid-2-related factor (Nrf2) and heme-oxygenase-1 (HO-1) mRNA expression, superoxide anion production, and reduced glutathione (GSH) levels; as well as Nrf2 protein expression and CD45 immunofluorescence double staining in synovial fluids; 3) Inflammasome components mRNA expression was determined 4 h after zymosan injection by qPCR evaluating nucleotide-binding oligomerization leucine-rich repeat and pyrin-domains containing protein 3 (Nlrp3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), caspase-1 and pro-interleukin (IL)-1β mRNA expression; 4) Pro-inflammatory molecules and transcription

factor were determined at indicated time points by ELISA in the case of cytokine production [tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-33, and IL-10, at 5 h], qPCR for preproendothelin (ET)-1 mRNA expression (at 4 h) and ELISA for NF κ B activation (at 3 h). The doses of zymosan i.a. injection, naringenin p.o. administration and collection time points for the varied tests performed were based on previous studies of our group and standardizing experiments aiming to determine the peak of each parameter that would allow detection of pharmacological effect (Conte Fde et al. 2008; Guerrero et al. 2006; Pinho-Ribeiro et al. 2016a; Pinho-Ribeiro et al. 2016b).

Animals

The study was performed on male Swiss mice, 1 month-old with approximate weight between 20-25g. The animals were acquired from the Londrina State University, Paraná State, Brazil. Mice were housed in the vivarium of the Department of Pathology, Center of Biological Sciences of Londrina State University in standard clear plastic cages with access to water and food *ad libitum*, light-dark cycle of 12/12 h, controlled temperature and constantly air exchanges. Mice were used merely for one experiment and were maintained under stress-free conditions at least two days before the experimental protocols. For behavioral procedures, mice were acclimatized into the experimental room at least one hour before testing, which was conducted always during the light cycle. At the end of each protocol, mice were anesthetized by inhalation overdose with isoflurane 5% (Abbott Park, IL, USA) and, terminally euthanized by cervical dislocation proceeded by decapitation.

Ethics statement

All animals were used according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal Use of the State University of Londrina (CEUA-UEL), registered under the process number 17427.2014.65, dated from September 30, 2014. Animal's care and handling procedures were carried out following the International Association for Study of Pain (IASP), Brazilian Council on Animal Experimentation (CONCEA), and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments guidelines. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Test compounds

The compounds used in the present study were saline solution (NaCl 0.9% from Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brazil), naringenin (PubChem CID: 439246; MW: 272.256 g/mol; $\geq 95\%$ purity, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and zymosan (from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Naringenin was diluted in saline solution immediately before p.o. administration.

Induction of knee joint inflammation and treatment protocol

Knee joint inflammation was induced by i.a. injection of 100 μg /cavity of zymosan in 10 μL of sterile saline into the right femur-tibial joint cavity as previously described (Guerrero et al. 2006). Mice were pre-treated (1 h before zymosan i.a. injection,) with 100 μL of vehicle (saline) or 16.7, 50 and 150 mg/kg of naringenin p.o. for experimental procedures. Control animals received an i.a. injection of an equal volume of vehicle (sterile saline).

Evaluation of articular mechanical hyperalgesia

The right knee joint mechanical hyperalgesia evaluation started 1h after i.a. administration of vehicle or zymosan and was also performed 1, 3, 5 and 7 hours after i.a. stimulus. Measurements were performed using an electronic version of von Frey filaments. An electronic pressure-meter coupled to a force transducer, fitted with polypropylene tip (Insight instruments, Ribeirão Preto, SP, Brazil) was used to evaluate pain threshold in animals. For the assessment, mice were placed in individual acrylic cages with wire grid floor during 15–30 min prior testing. An increasing perpendicular force was applied on the central area of plantar surface of the homolateral paw of stimulated joint (always right paw in the present study) using a large tip with 4.15 mm² of area to exclude subcutaneous effect and induce knee joint flexion followed by paw withdraw when animals present hyperalgesia to mechanical stimulation. The mechanical force was applied only when animals were quiet and resting with the four paws on the grid floor. The results were expressed in grams (g) (Guerrero et al. 2006).

Evaluation of articular edema

Femorotibial joint edema was evaluated 1, 3, 5 and 7 hours after vehicle or zymosan injection by measuring the transverse diameters of the knee joints using an analog caliper. Values of femorotibial joint thickness are expressed as the difference between the diameter measured before (basal) and after induction of articular inflammation in millimeters (mm) (Conte Fde et al. 2008).

Leukocyte recruitment to the synovial cavity

The recruitment of leukocytes to the synovial cavity was evaluated 7 hours after vehicle or zymosan injection. The articular cavity was washed 3 times with 3.3 μ L of sterile saline with 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The total number of leukocytes was determined in a Neubauer chamber. Differential cell counts were determined by Rosenfeld stained slices using a light microscope and results were expressed as the number of total leukocytes, neutrophils and mononuclear cells per cavity (Conte Fde et al. 2008).

Histopathological analysis of the knee joint

Whole knee joints samples (distal portion of femur, joint capsule and proximal portion of tibia) were collected 7 h after vehicle or zymosan i.a. injection, dissected and fixed in 10% formalin for 12 h. After decalcification in 10% EDTA in phosphate buffered saline (PBS) solution for 2 weeks, the samples were processed for paraffin embedding. Tissue section (5 μ m) were stained with H&E and mounted in permanent glass slides and analyzed under a light microscope (Olympus OX31, Tokyo, Japan), coupled with a digital camera (Lumenera Infinity 1, Ottawa, Canada) (Conte Fde et al. 2008). Histopathological score regarding inflammatory cells infiltration to the synovial cavity in experimental groups was performed using the dimension of 279 X 195 pixels per field.

Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Whole knee joints samples (distal portion of femur, joint capsule and proximal portion of tibia) of animals were collected and homogenized using Trizol reagent at indicated time points. Total RNA was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA). Total RNA purity was assessed in a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland), and the samples with wavelength absorption ratio (260/280) between 1.8 and 2.0 were used for all preparations. Reverse transcription process of total RNA to cDNA was conducted using GoScript™ Reverse Transcriptase System (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA). Quantitative PCR was carried out using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA) and specific primers. All reactions were conducted in StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem®). The relative gene expression was evaluated using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methodology (Manchope et al. 2016; Ruiz-Miyazawa et al. 2018). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression was used as a reference gene to normalize data. The primers used were: gp91^{phox}, forward: 5'-AGCTATGAGGTGGTGATGTTAGTGG-3', reverse: 5'-CACAATATTTGTACCAGACAGACTTGAG-3'; Nrf2, forward: 5'-TCACACGAGATGAGCTTAGGGCAA-3', reverse: 5'-TACAGTTCTGGGCGGCGACTTTAT-3'; HO-1, forward: 5'-CCCAAACTGGCCTGTAAA-3', reverse: 5'-CGTGGTCAGTCAACATGGAT-3'; Nlrp3, forward: 5'-GAGTTCTTCGCTGCTATGT-3', reverse: 5'-ACCTTCACGTCTCGGTTC-3'; ASC, forward: 5'-ATGGGGCGGGCAGAGATG-3', reverse: 5'-GCTCTGCTCCAGGTCCATCAC-3'; pro-caspase-1, forward: 5'-TGGTCTTGTGACTTGGAGGA-3', reverse: 5'-TGGCTTCTTATTGGCAGAT-3'; pro-IL-1 β , forward: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3', reverse: 5'-

TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'; preproET-1, forward: 5'-TGTGTCTACTTCTGCCACCT-3', reverse: 5'-CACCAGCTGCTGATAGATAC-3'; GAPDH, forward: 5'-CATAACCAGGAAATGAGCTTG-3', reverse: 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG-3'.

Superoxide anion production assay

Whole knee joints samples (distal portion of femur, joint capsule and proximal portion of tibia) were collected in KCl buffer 3 h after i.a. administration of vehicle or zymosan for superoxide anion production determination through the reduction of the redox dye nitrobluetetrazolium (NBT). NBT solution (1 mg/mL) was added to the samples followed by incubation for 1 h at 37° C. The supernatant was carefully removed, and the formazan precipitated was then solubilized by 2 M KOH and dimethylsulfoxide (DMSO). The optical density was measured using a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland) at 600 nm. The results were presented as NBT reduction (OD/mg of tissue) (Manchope et al. 2016; Ruiz-Miyazawa et al. 2018).

GSH activity assay

GSH levels were determined on whole knee joints samples (distal portion of femur, joint capsule and proximal portion of tibia) 3 h after i.a. administration of vehicle or zymosan using a spectrophotometric method. The samples were homogenized in EDTA 0,02 M solution, and homogenates were treated with 50% trichloroacetic acid for subsequent centrifugation at 1,500 g for 15 minutes. Then, 100 µL of sample was mixed

with 200 μ L of 0.4 M Tris-HCl, pH 8.9, and 10 μ L of 10 mM dithiobisnitrobenzoic (DTNB) acid in methanol was added. The absorbance at 412 nm was used for readings (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland) after 5 min. The standard curve was prepared with 0.50 μ M of GSH, and the results were presented as nanomol (nmol) of GSH/mg of tissue (Manchope et al. 2016; Ruiz-Miyazawa et al. 2018).

Cytokine production

Whole knee joints samples (distal portion of femur, joint capsule and proximal portion of tibia) were collected 5 h after vehicle or zymosan i.a. injection and processed to determine the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-33, and IL-10 using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) commercial kits from eBioscience (Affymetrix, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions (Manchope et al. 2016; Pinho-Ribeiro et al. 2016b).

NF κ B activation determination

Whole knee joints samples (distal portion of femur, joint capsule and proximal portion of tibia) were collected 3 h after vehicle or zymosan i.a. injection and homogenized in ice-cold lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). The homogenates were centrifuged at 16,000 g for 10 min, and the supernatants were used to assess the levels of phosphorylated and total NF κ B p65 subunit by ELISA using PathScan[®] kits (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Readings were performed spectrophotometrically at 450

nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland). The results are presented as the sample ratio of NFκB activation (total p65/phospho-p65) per milligram (mg) of tissue (Ruiz-Miyazawa et al. 2018).

Confocal immunofluorescence assay

Articular fluids of mice were collected 7 h after zymosan i.a. injection into the knee joint using a solution of paraformaldehyde 1% (40 μL). Cells were then centrifuged (5 min, 4°C, 300g) and were incubated with blocking buffer (PBS, 2% BSA, 0.1% Triton) for 1h on ice. After centrifugation cells were incubated with conjugated rat PE-Cy5 anti-mouse CD45 (1:200, Biolegend, #103110) and rabbit anti-mouse Nrf2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, sc-722) for additional 1 h on ice. After two washes in PBS cells were resuspended in PBS and placed on sterile slides and let to dry out on room temperature overnight. The secondary antibody for Nrf2 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:500, Invitrogen, A11008) was added to the attached cells and incubated 2 h on room temperature. The chosen representative images and quantitative analysis were performed using a confocal microscope (SP8, Leica, Microsystems, Mannheim, Germany). The intensity of fluorescence was quantified in randomly selected fields of different groups by a blind evaluator. The results are presented as fluorescence intensity (grey scale pixels) for targets protein and as a ratio of fluorescence intensity per number of cells in each field (Ruiz-Miyazawa et al. 2018).

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM of measurements made on six mice in each group in each experiment and are representative of two independent experiments. Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* was used to compare the groups in multiple time points after the injection of vehicle or stimulus. Analyzed factors were treatments, time and time versus treatment interaction. On the other hand, one-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* were performed for data of single time point. Categorical variables were analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post hoc*. Data were analyzed using the statistical software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Naringenin inhibits zymosan-induced articular mechanical hyperalgesia and edema as well as leukocyte recruitment to the synovial cavity in a dose-dependent manner

Mice were treated with naringenin (16.7-150 mg/kg, p.o.) 1 h before intra-articular (i.a.) injection of vehicle or zymosan. Articular mechanical hyperalgesia and edema measurements were performed from 1-7 h and leukocyte recruitment to the synovial cavity evaluation was performed at 7 h after the stimulus (Figure 2). Zymosan-induced mechanical hyperalgesia and edema were inhibited by the dose of 16.7 mg/kg at 3 h and 3-7 h, respectively. On the other hand, the doses of 50 and 150 mg/kg of naringenin inhibited mechanical hyperalgesia from 3-7 h and edema from 1-7 h. Among these two highest doses, 50 mg/kg was the most effective being significantly different when

compared to the dose of 16.7 mg/kg at 7 h in mechanical hyperalgesia and from 3-7 h in edema. Naringenin at 150 mg/kg produced a significantly different effect when compared to the lower dose (16.7 mg/kg) regarding edema inhibition only between 5-7 h (Figure 2A and B). Zymosan also increased the recruitment of total leukocytes, neutrophils and mononuclear cells to the synovial cavity 7 h after its i.a. injection. Naringenin at the dose of 50 mg/kg reduced zymosan-induced recruitment of leukocytes while 150 mg/kg reduced only mononuclear cells counts without effects upon total leukocytes and neutrophils (Figure 2C-E). Thus, naringenin presented a U-shaped curve for some parameters, and the dose of 50 mg/kg was selected for the continuity of experimental procedures. Altogether, these results highlight the analgesic and anti-inflammatory effects of naringenin in the zymosan-induced arthritis model.

Naringenin inhibits zymosan-induced knee joint histopathological alterations

Mice received naringenin (50 mg/kg, p.o.) 1 h before i.a. injection of vehicle or zymosan. Histopathological analyses were performed using H&E staining of knee joint samples collected 7 h after arthritis induction (Figure 3). Zymosan induced prominent damage to tissue integrity characterized by morphological alterations as well as an increase in the recruitment of inflammatory cells compared to the vehicle group. Naringenin treatment reduced zymosan-induced histopathological alterations (Figure 3A-C) corroborating the data on leukocyte recruitment to the synovial cavity (Figure 2C-E). The naringenin inhibition of inflammatory cell infiltration was statistically significant as presented in Figure 3D depicting the analysis of total number of cells per field.

Naringenin inhibits zymosan-induced knee joint oxidative stress and induces of Nrf2 signaling

Mice were treated with naringenin (50 mg/kg, p.o.) 1 h before i.a. injection of vehicle or zymosan and diverse oxidative stress parameters were evaluated in knee joint samples 3 h after the stimulus (Figure 4). Zymosan increased gp91^{phox} mRNA expression and its downstream effector superoxide anion (NBT reduction assay), as well as reduced GSH levels in comparison to vehicle-treated group (Figure 4A-C). On the other hand, treatment with naringenin inhibited the increase of gp91^{phox} mRNA expression and superoxide anion production induced by zymosan and restored GSH levels (Figure 4A-C). Zymosan did not modify the Nrf2/HO-1 mRNA expression, however, naringenin treatment induced the expression of Nrf2/HO-1 mRNA (Figure 4D and E). Immunofluorescence analysis showed that zymosan increased leukocyte recruitment when compared to the saline group, which was inhibited by naringenin treatment (CD45+ cells fluorescence intensity; Figure 4F, I, J, M, N, Q, and R), which confirms data presented in Figure 2A-C. It was also demonstrated that these cells are expressing Nrf2 (Figure 4M and Q). Regarding Nrf2 staining, zymosan increased the protein levels of Nrf2 compared to the saline group, however, it was not detected difference between vehicle- and naringenin-treated groups (Figure 4G, K, O, and S). However, by comparing the proportion of Nrf2 fluorescence per number of cells, we observed an increase in the naringenin-treated group (Figure 4L, P, and T), corroborating mRNA expression data (Figure 4D). These data indicate that inhibiting oxidative stress and inducing antioxidant pathways contribute to the analgesic/anti-inflammatory effects of naringenin in the present model. Furthermore, enhancing Nrf2

protein levels in CD45⁺ hematopoietic cells recruited to the knee joint synovial fluid is a mechanism of action of naringenin in zymosan arthritis.

Naringenin inhibits zymosan-induced mRNA expression of inflammasome components in the knee joint

Mice received naringenin (50 mg/kg, p.o.) 1 h before i.a. injection of vehicle or zymosan and the mRNA expression of inflammasome components Nlrp3, ASC, pro-caspase-1, and pro-IL-1 β were investigated in knee joint samples (Figure 5). The induction of Nlrp3, ASC, pro-caspase-1, and pro-IL-1 β mRNA expression by zymosan was inhibited by naringenin treatment (Figure 5A-D). These data suggest that, at least in part, the therapeutic actions of naringenin in zymosan-induced arthritis depend on down-modulating the mRNA expression of NLRP3 inflammasome platform.

Naringenin inhibits zymosan-induced production of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-33 as well as preproET-1 mRNA expression and NF κ B activation and increases the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 in the knee joint

Mice were treated with naringenin (50 mg/kg, p.o.) 1 h before i.a. injection of vehicle or zymosan and the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-33, IL-10, and preproET-1 mRNA expression were determined in knee joint samples (Figure 6). Zymosan induced TNF- α , IL-1 β , and IL-33 production as well as preproET-1 mRNA expression, which were significantly inhibited by naringenin treatment (Figure 6A-C and E). Given these cytokines are produced in a NF κ B-dependent manner, we next wondered whether

naringenin could reduce NF κ B activation. We observed that zymosan induced activation of NF κ B signaling pathway (demonstrated by total-p65/phospho-p65 ratio), which was also reduced by naringenin (Figure 6F). Additionally, naringenin prevented the reduction of IL-10 levels observed after stimulus with zymosan (Figure 6D). These data evidenced that the mechanism of action of naringenin in zymosan-induced arthritis includes the reduction of pro-inflammatory mediators and increasing the anti-inflammatory cytokine IL-10. In addition, our data revealed that naringenin targets NF κ B signaling pathway explaining, at least in part, the therapeutic effects of this flavanone in zymosan-induced arthritis.

Discussion

Recent studies with different approaches, experimental models and goals showed beneficial effects of an extract containing naringenin together with other flavonoids or naringenin alone in models of CFA-induced arthritis in rats and CIA- and MSU-induced arthritis in mice (Ananth et al. 2016; Li et al. 2015; Ruiz-Miyazawa et al. 2018; Zhu et al. 2015). The present data demonstrate for the first time, to our knowledge, a therapeutic role of naringenin in a model of experimental arthritis induced by zymosan focusing on inflammation-induced articular pain in mice. Furthermore, the present data also demonstrate for the first time that naringenin enhances Nrf2 protein expression in CD45⁺ hematopoietic cells recruited to the synovial fluid of zymosan arthritic mouse.

Naringenin inhibits hyperalgesia and edema, leukocyte recruitment to the synovial tissue (total leukocyte count and immunofluorescence analysis) and histopathological alterations in the zymosan inflamed knee joint. The present findings of the analgesic and anti-inflammatory effects of naringenin are consistent with previous evidence in

models of inflammatory and neuropathic pain. For instance, naringenin inhibits both spontaneous pain and hyperalgesia induced by a wide array of inflammatory stimuli such as intraperitoneal (i.p.) phenyl-*P*-benzoquinone (PBQ) and acetic acid; and intraplantar (i.pl.) CFA, formalin, capsaicin, superoxide anion, lipopolysaccharide (LPS) and carrageenan; and i.a. MSU (Manchope et al. 2016; Pinho-Ribeiro et al. 2016a; Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Ruiz-Miyazawa et al. 2018). Furthermore, naringenin also presents analgesic effect in models that involve nerve injury (neuropathies), such as diabetic neuropathy, spinal nerve ligation, and chronic constriction injury (CCI) (Al-Rejaie et al. 2015; Hu and Zhao 2014; Kaulaskar et al. 2012). The anti-inflammatory properties of naringenin reported herein corroborate previous studies in models of joint, skin, nervous system, hepatic, and lung inflammation (Ali et al. 2016; Chtourou et al. 2015; Esmaili and Alilou 2014; Martinez et al. 2015; Vafeiadou et al. 2009; Zhu et al. 2015). Therefore, we and others have shown that naringenin inhibits disease mechanisms triggered by varied stimuli, which reinforces the wide applicability and therapeutic potential of this flavanone.

Oxidative stress can contribute to the development of inflammatory hyperalgesia (Manchope et al. 2017; Salvemini et al. 2011). In general, flavonoids are widely studied as classical antioxidants due to their inherent ability to interfere with oxidative stress through hydrogen donation and electron stabilization in their phenolic rings (Manchope et al. 2017). Naringenin inhibited the gp91^{phox} mRNA expression, a component of the enzymatic complex nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and consequently its product, superoxide anion. In agreement with the present data, the administration of potassium superoxide (KO₂, a superoxide anion donor) in mice induces superoxide anion release and inflammatory pain, which was inhibited by the superoxide dismutase (SOD) mimetic agent tempol (Bernardy et al. 2017) and also by

naringenin (Manchope et al. 2016). These *in vivo* data are in accordance with previous *in vitro* evidence that naringenin scavenges superoxide anion and reduces NADPH oxidase activation through the inhibition of protein kinase C (PKC)-dependent p47^{phox} phosphorylation (Kongpichitchoke et al. 2015). Moreover, naringenin also possesses moderate inhibitory activity upon xanthine oxidase, an enzymatic system that generates superoxide anion (Liu et al. 2016). Thus, the inhibition of the upstream molecule gp91^{phox} by naringenin corroborates the inhibition of superoxide anion production and inflammatory pain induced by zymosan. Naringenin also induced the mRNA expression of Nrf2 and its downstream effectors HO-1 and GSH (Manchope et al. 2016) in arthritic joints. The induction of Nrf2/HO-1 axis is described to suppress hyperalgesia and confers protection to tissues against oxidative stress damages in other experimental settings (Esmaeili and Alilou 2014; Manchope et al. 2016; Manchope et al. 2017; Pinho-Ribeiro et al. 2016a; Ramprasath et al. 2014). To confirm the participation of the upstream antioxidant molecule Nrf2 at the protein level in the zymosan model and its cellular source, confocal immunofluorescence analysis was conducted using synovial fluid cells. We observed that naringenin reduced leukocyte mobilization to articular fluid by CD45 staining; a major transmembrane glycoprotein expressed by hematopoietic cells except by megakaryocytes/platelets and erythrocytes (Craig et al. 1994). Interestingly, Nrf2 fluorescence per cell was enhanced by naringenin treatment, indicating that naringenin enhances Nrf2 pathway to induce antioxidant effects in zymosan-induced arthritis. Thus, it is rational to suggest that the inhibition of oxidative stress associated with the induction of Nrf2/HO-1 pathway accounted to naringenin control of articular pain and inflammation induced by zymosan. To our knowledge, this is the first demonstration that naringenin treatment enhanced Nrf2 expression in hematopoietic CD45⁺ cells, highlighting the enhancement of an antioxidant

transcription factor in recruited leukocytes. Another relevant endogenous role of reactive oxygen species in inflammation is the activation of the inflammasome platform (Zhou et al. 2010). Evidence shows that the physiopathology of zymosan inflammation involves the induction of inflammasome platform components in immune cells (Lamkanfi et al. 2009). Corroborating the current understanding of zymosan inflammatory mechanisms, we observed that zymosan induced the mRNA expression of inflammasome components Nlrp3, ASC, caspase-1 and pro-IL-1 β in affected knee joints. On the other hand, naringenin treatment inhibited zymosan-induced inflammasome components mRNA expression.

Cytokines and ET-1 together with the redox system contribute to most of the painful conditions (Fattori et al. 2016; Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Verri et al. 2006). In models of arthritis, cytokines (including TNF- α and IL-1 β) and ET-1 play crucial roles in the inflammatory response and the consequent sensitization and/or activation of peripheral nociceptor sensory neurons, which support central sensitization in spinal sites (Donate et al. 2012; Schaible 2014; Teixeira et al. 2016). Corroborating previous results, zymosan i.a. injection induces the production of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β as well as preproET-1 mRNA expression (Conte et al. 2010; Guerrero et al. 2012). Naringenin inhibited zymosan-induced cytokine production. In fact, naringenin enhances intracellular TNF- α degradation (Jin et al. 2017), which might be a contributing mechanism to the analgesic effects observed here, since TNF- α can both induce the production of additional hyperalgesic molecules as well as activate the nociceptor sensory (Verri et al. 2006). Naringenin also inhibited zymosan-induced IL-33 production in the knee joint. Importantly, this is the first report indicating that zymosan i.a. injection increases IL-33 levels in the knee joint. IL-33 triggers an inflammatory cascade involving other mediators such as TNF- α , IL-1 β , and ET-1

during the pathophysiology of experimental arthritis accounting to pain, neutrophil recruitment and edema (Verri et al. 2008; Verri et al. 2010). In this sense, the inhibition of IL-33 production by naringenin explains the abrogation of the release of other inflammatory molecules resulting in diminished pain and inflammation in arthritis. Opposing to the data on inflammatory cytokines, zymosan reduced the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the knee joints. These data are in accordance with previous work demonstrating the inhibition of IL-10 signaling and function in macrophages after zymosan stimulus via a protein kinase C β (PKC β)-dependent mechanism and internalization of IL-10 receptor (IL-10R) (Du et al. 2006). In the absence of IL-10 signaling, macrophages do not shift into M2 alternative profile and do not produce IL-10 *de novo*. Naringenin recovered IL-10 levels. It is possible that naringenin treatment favors the shifting towards an M2 anti-inflammatory macrophage profile. The M2 shifting can be achieved by inducing HO-1 via the Nrf2/Bach1 and the IL-10/STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)/PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) axis (Naito et al. 2014).

The present data also show that naringenin inhibits zymosan-induced NF κ B activation/phosphorylation in the knee joints, which was observed by the reduction of total-p65 NF κ B/phosphorylated-p65 NF κ B ratio. The induction of NF κ B signaling is recognized to mediate and maintain inflammatory and neuropathic pain in pre-clinical studies (Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Souza et al. 2015; Zarpelon et al. 2016). The clinical relevance of NF κ B is supported by the efficacy of corticosteroids (Aletaha and Smolen 2018). Our data showing that naringenin targets NF κ B activation corroborates with previous studies using different experimental approaches, indicating that this is a possible mechanism by which this flavanone reduces pain, inflammation and up-regulation of oxidative stress producing systems (Bai et al. 2014; Chtourou et al. 2015;

Li et al. 2015; Pinho-Ribeiro et al. 2016b; Yen et al. 2015). In mammals, the NFκB transcription factor family is composed of five proteins that dimerize in varied combinations to form transcriptionally active complexes. NFκB p65 activation occurs upon a wide variety of signals including infections, antigen receptors, TNFα, IL-1β (a downstream effector of inflammasome) and physiological or genotoxic stresses. NFκB p65 regulates multiple inflammatory genes. Following this rationale, naringenin treatment inhibits oxidative stress, inflammasome, IL-1β, and TNF-α production. Thus, it is conceivable that the protective knee joint effects of this flavonoid are related to inhibiting the activation of NFκB. Targeting NFκB explains the reduction of oxidative stress (e.g. gp91^{phox}) and pro-inflammatory molecule production (e.g. cytokines and inflammasome platform components). Reactive oxygen species and pro-inflammatory molecules also work as positive feedback to activate NFκB, thus, perpetuating the inflammation towards a chronic stage (Oeckinghaus and Ghosh 2009; Schroder and Tschopp 2010). Naringenin acts targeting these inter-related signaling pathways in the knee joint, inhibiting hyperalgesia and conferring tissue protection.

It is noteworthy that in the present study the highest dose of naringenin (150 mg/kg) tested did not show better therapeutic effect than the dose of 50 mg/kg. This bell-shaped dose-response effect is important considering that depending on the dose, antioxidant may act as pro-oxidants. This can happen with high doses of antioxidants and in the presence of transition metal ions such as iron and copper (Bouayed and Bohn 2010; Decker 1997; Raza and John 2005; Watjen et al. 2005). A pro-oxidant action results in deleterious effects including DNA, protein and lipid damage and consequently cell dysfunction and death (Aruoma 2003). In fact, in a isolated rat liver nuclei *in vitro* model, naringenin induced a concentration-dependent peroxidation of nuclear membrane lipids together with DNA damage (Sahu and Gray 1997). Therefore, the

aforementioned data suggest attention to the need of fine tuning antioxidant dose for human treatment.

Conclusions

Taken together, the present study shows that the flavonoid naringenin possesses analgesic and anti-inflammatory properties in zymosan-induced arthritis in mice. The mechanisms of action of naringenin were attributed to the inhibition of a) leukocyte recruitment to the synovial cavity and synovitis; b) oxidative stress; c) mRNA expression of inflammasome platform components; d) pro-inflammatory/hyperalgesic mediator production and mRNA expression and NFκB activation. Furthermore, naringenin acted by inducing Nrf2 and IL-10, which are a transcription factor involved in the regulation of antioxidant molecules expression and analgesic/anti-inflammatory pathways. We also observed that naringenin enhanced Nrf2 protein levels in CD45⁺ hematopoietic cells recruited to the inflamed synovia. Given the fact naringenin is safe in experimental settings using *in vivo* and *in vitro* assays (Pinho-Ribeiro et al. 2016a; Ruiz-Miyazawa et al. 2018; Wang et al. 2014), it could be added as a possible candidate to control arthritis-induced pain and inflammation. As demonstrated in the present work and by other, naringenin presents multiple biological targets, which might be an advantage when compared to clinically active drugs, whose single mechanism of action, high price, and prominent adverse effects limit their long-term use.

Authors' contributions

Rubia Casagrande and Waldiceu A. Verri Jr designed the study. Allan J. C. Bussmann, Sergio M. Borghi, Tiago H. Zaninelli, Telma S. dos Santos, Carla F. S. Guazelli, Victor Fattori, Talita P. Domiciano, Felipe A. Pinho-Ribeiro, and Kenji W. Ruiz-Miyazawa conducted the experiments. Antônio M. B. Casella, Josiane A. Vignoli, Doumit Camilios-Neto, Rubia Casagrande and Waldiceu A. Verri Jr contributed with reagents, analytical tools, interpretation of data and intellectual support for the study. Allan J. C. Bussmann, Sergio M. Borghi, Tiago H. Zaninelli, Telma S. dos Santos, Carla F. S. Guazelli, Victor Fattori, Talita P. Domiciano, Felipe A. Pinho-Ribeiro, and Kenji W. Ruiz-Miyazawa performed data analysis. Sergio M. Borghi, Rubia Casagrande, and Waldiceu A. Verri Jr wrote the paper. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundação Araucária and Paraná State Government, Brazil. Sergio M. Borghi received a post-doctoral fellowship from CAPES and CNPq (152792/2016-3). The authors also thank the support of Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (CMLP-UEL).

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

References

- Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Abuhashish HM, Parmar MY, Ola MS, Al-Hosaini AA, Ahmed MM (2015) Naringenin neutralises oxidative stress and nerve growth factor discrepancy in experimental diabetic neuropathy *Neurological research* 37:924-933 doi:10.1179/1743132815Y.0000000079
- Aletaha D, Smolen JS (2018) Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review *Jama* 320:1360-1372 doi:10.1001/jama.2018.13103
- Ali R, Shahid A, Ali N, Hasan SK, Majed F, Sultana S (2016) Amelioration of Benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and pulmonary toxicity by Naringenin in Wistar rats: A plausible role of COX-2 and NF-kappaB *Human & experimental toxicology* doi:10.1177/0960327116650009
- Ananth DA, Rameshkumar A, Jeyadevi R, Aseervatham GS, Sripriya J, Bose PC, Sivasudha T (2016) Amelioratory effect of flavonoids rich *Pergularia daemia* extract against CFA induced arthritic rats *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 80:244-252 doi:10.1016/j.biopha.2016.03.019
- Aruoma OI (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods *Mutation research* 523-524:9-20
- Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY (2009) Animal models of rheumatoid arthritis *European journal of immunology* 39:2040-2044 doi:10.1002/eji.200939578
- Bai X et al. (2014) Protective effect of naringenin in experimental ischemic stroke: down-regulated NOD2, RIP2, NF-kappaB, MMP-9 and up-regulated claudin-5 expression *Neurochemical research* 39:1405-1415 doi:10.1007/s11064-014-1326-y
- Bernardy CCF et al. (2017) Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice *BioMed research international* 2017:9584819 doi:10.1155/2017/9584819
- Bouayed J, Bohn T (2010) Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses *Oxidative medicine and cellular longevity* 3:228-237 doi:10.4161/oxim.3.4.12858
- Chtourou Y, Fetoui H, Jemai R, Ben Slima A, Makni M, Gdoura R (2015) Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor kappaB pathway *European journal of pharmacology* 746:96-105 doi:10.1016/j.ejphar.2014.10.027
- Conte Fde P, Barja-Fidalgo C, Verri WA, Jr., Cunha FQ, Rae GA, Penido C, Henriques M (2008) Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB4, TNF-alpha, and CXCL-1 *J Leukoc Biol* 84:652-660 doi:10.1189/jlb.1207827
- Conte FP, Menezes-de-Lima O, Jr., Verri WA, Jr., Cunha FQ, Penido C, Henriques MG (2010) Lipoxin A(4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects *British journal of pharmacology* 161:911-924 doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00950.x
- Craig W, Poppema S, Little MT, Dragowska W, Lansdorp PM (1994) CD45 isoform expression on human haemopoietic cells at different stages of development *British journal of haematology* 88:24-30
- Cross M et al. (2014) The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study *Annals of the rheumatic diseases* 73:1316-1322 doi:10.1136/annrheumdis-2013-204627
- Decker EA (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition reviews* 55:396-398
- Donate PB et al. (2012) Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: the role of TNF-alpha in the induction of endothelin system genes *Inflamm Res* 61:337-348 doi:10.1007/s00011-011-0415-5
- Du Z, Kelly E, Mecklenbrauker I, Agle L, Herrero C, Paik P, Ivashkiv LB (2006) Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan *Journal of immunology* 176:4785-4792

- Esmaeili MA, Alilou M (2014) Naringenin attenuates CCl₄ -induced hepatic inflammation by the activation of an Nrf2-mediated pathway in rats *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 41:416-422 doi:10.1111/1440-1681.12230
- Fattori V et al. (2016) Differential regulation of oxidative stress and cytokine production by endothelin ETA and ETB receptors in superoxide anion-induced inflammation and pain in mice *Journal of drug targeting*:1-27 doi:10.1080/1061186X.2016.1245308
- Frabasile S, Koishi AC, Kuczera D, Silveira GF, Verri WA, Jr., Duarte Dos Santos CN, Bordignon J (2017) The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells *Scientific reports* 7:41864 doi:10.1038/srep41864
- Guerrero AT, Cunha TM, Verri WA, Jr., Gazzinelli RT, Teixeira MM, Cunha FQ, Ferreira SH (2012) Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF-alpha, IL-1beta and CXCL1/KC *European journal of pharmacology* 674:51-57 doi:10.1016/j.ejphar.2011.10.023
- Guerrero AT et al. (2006) Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening *Pharmacol Biochem Behav* 84:244-251 doi:10.1016/j.pbb.2006.05.008
- Hu CY, Zhao YT (2014) Analgesic effects of naringenin in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathic pain *Biomed Rep* 2:569-573 doi:10.3892/br.2014.267
- Jin L, Zeng W, Zhang F, Zhang C, Liang W (2017) Naringenin Ameliorates Acute Inflammation by Regulating Intracellular Cytokine Degradation *Journal of immunology* 199:3466-3477 doi:10.4049/jimmunol.1602016
- Kaulaskar S, Bhutada P, Rahigude A, Jain D, Harle U (2012) Effects of naringenin on allodynia and hyperalgesia in rats with chronic constriction injury-induced neuropathic pain *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 10:1482-1489 doi:10.3736/jcim20121223
- Kesselheim AS, Avorn J, Sarpatwari A (2016) The High Cost of Prescription Drugs in the United States: Origins and Prospects for Reform *JAMA : the journal of the American Medical Association* 316:858-871 doi:10.1001/jama.2016.11237
- Kongpichitchoke T, Hsu JL, Huang TC (2015) Number of Hydroxyl Groups on the B-Ring of Flavonoids Affects Their Antioxidant Activity and Interaction with Phorbol Ester Binding Site of PKCdelta C1B Domain: In Vitro and in Silico Studies *Journal of agricultural and food chemistry* 63:4580-4586 doi:10.1021/acs.jafc.5b00312
- Krogholm KS, Bredsdorff L, Knuthsen P, Haraldsdottir J, Rasmussen SE (2010) Relative bioavailability of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin given simultaneously through diet *European journal of clinical nutrition* 64:432-435 doi:10.1038/ejcn.2010.6
- Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview *TheScientificWorldJournal* 2013:162750 doi:10.1155/2013/162750
- Laev SS, Salakhutdinov NF (2015) Anti-arthritis agents: progress and potential *Bioorganic & medicinal chemistry* 23:3059-3080 doi:10.1016/j.bmc.2015.05.010
- Lamkanfi M, Malireddi RK, Kanneganti TD (2009) Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome *The Journal of biological chemistry* 284:20574-20581 doi:10.1074/jbc.M109.023689
- Li YR, Chen DY, Chu CL, Li S, Chen YK, Wu CL, Lin CC (2015) Naringenin inhibits dendritic cell maturation and has therapeutic effects in a murine model of collagen-induced arthritis *The Journal of nutritional biochemistry* 26:1467-1478 doi:10.1016/j.jnutbio.2015.07.016
- Lim W, Park S, Bazer FW, Song G (2017) Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways *Journal of cellular biochemistry* 118:1118-1131 doi:10.1002/jcb.25729
- Liu K et al. (2016) Chemical Evidence for Potent Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Ethyl Acetate Extract of Citrus aurantium L. Dried Immature Fruits *Molecules* 21:302 doi:10.3390/molecules21030302
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Remesy C (2003) Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice *European journal of clinical nutrition* 57:235-242 doi:10.1038/sj.ejcn.1601547
- Manchope MF et al. (2016) Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATPChannel Signaling Pathway *PloS one* 11:e0153015 doi:10.1371/journal.pone.0153015
- Manchope MF, Casagrande R, Verri WA, Jr. (2017) Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone *Oncotarget* 8:3766-3767 doi:10.18632/oncotarget.14084

- Martinez RM et al. (2015) Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice *J Nat Prod* 78:1647-1655 doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00198
- Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML (2008) Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin *Hepatology* 47:1437-1445 doi:10.1002/hep.22197
- Naito Y, Takagi T, Higashimura Y (2014) Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages *Archives of biochemistry and biophysics* 564:83-88 doi:10.1016/j.abb.2014.09.005
- Oeckinghaus A, Ghosh S (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a000034 doi:10.1101/cshperspect.a000034
- Park HJ, Choi YJ, Lee JH, Nam MJ (2017) Naringenin causes ASK1-induced apoptosis via reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 99:1-8 doi:10.1016/j.fct.2016.11.008
- Pinho-Ribeiro FA, Zarpelon AC, Fattori V, Manchope MF, Mizokami SS, Casagrande R, Verri WA, Jr. (2016a) Naringenin reduces inflammatory pain in mice *Neuropharmacology* 105:508-519 doi:10.1016/j.neuropharm.2016.02.019
- Pinho-Ribeiro FA et al. (2016b) The citrus flavanone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF-kappaB activation *The Journal of nutritional biochemistry* 33:8-14 doi:10.1016/j.jnutbio.2016.03.013
- Ramprasath T, Senthamizharasi M, Vasudevan V, Sasikumar S, Yuvaraj S, Selvam GS (2014) Naringenin confers protection against oxidative stress through upregulation of Nrf2 target genes in cardiomyoblast cells *Journal of physiology and biochemistry* 70:407-415 doi:10.1007/s13105-014-0318-3
- Raza H, John A (2005) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments *Toxicology and applied pharmacology* 207:212-220 doi:10.1016/j.taap.2005.01.004
- Ruiz-Miyazawa KW et al. (2018) The citrus flavanone naringenin reduces gout-induced joint pain and inflammation in mice by inhibiting the activation of NFκB and macrophage release of IL-1β *Journal of Functional Foods* 48:106-116 doi:10.1016/j.jff.2018.06.025
- Sahu SC, Gray GC (1997) Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 35:443-447
- Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL (2011) Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain *Free radical biology & medicine* 51:951-966 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026
- Schaible HG (2014) Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis *Arthritis research & therapy* 16:470
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes *Cell* 140:821-832 doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- Shulman M et al. (2011) Enhancement of naringenin bioavailability by complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. [corrected] *PloS one* 6:e18033 doi:10.1371/journal.pone.0018033
- Souza GR et al. (2015) Involvement of nuclear factor kappa B in the maintenance of persistent inflammatory hypernociception *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 134:49-56 doi:10.1016/j.pbb.2015.04.005
- Sun H et al. (2013) Pharmacokinetics of hesperetin and naringenin in the Zhi Zhu Wan, a traditional Chinese medicinal formulae, and its pharmacodynamics study *Phytotherapy research : PTR* 27:1345-1351 doi:10.1002/ptr.4867
- Teixeira JM, Bobinski F, Parada CA, Sluka KA, Tambeli CH (2016) P2X3 and P2X2/3 Receptors Play a Crucial Role in Articular Hyperalgesia Development Through Inflammatory Mechanisms in the Knee Joint Experimental Synovitis *Molecular neurobiology* doi:10.1007/s12035-016-0146-2
- Vafeiadou K, Vauzour D, Lee HY, Rodriguez-Mateos A, Williams RJ, Spencer JP (2009) The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury *Archives of biochemistry and biophysics* 484:100-109 doi:10.1016/j.abb.2009.01.016
- Verri WA, Jr., Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2006) Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 112:116-138 doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.001
- Verri WA, Jr. et al. (2008) IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2723-2728 doi:10.1073/pnas.0712116105

- Verri WA, Jr. et al. (2010) IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy *Ann Rheum Dis* 69:1697-1703 doi:10.1136/ard.2009.122655
- Wang W et al. (2014) The inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of p38 signaling pathway by naringenin and attenuation of titanium-particle-induced osteolysis *International journal of molecular sciences* 15:21913-21934 doi:10.3390/ijms151221913
- Watjen W et al. (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis *The Journal of nutrition* 135:525-531 doi:10.1093/jn/135.3.525
- Yen HR, Liu CJ, Yeh CC (2015) Naringenin suppresses TPA-induced tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells *Chemico-biological interactions* 235:1-9 doi:10.1016/j.cbi.2015.04.003
- Zarpelon AC et al. (2016) Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30:54-65 doi:10.1096/fj.14-267146
- Zhao Y et al. (2016) 6-C-(E-phenylethenyl)naringenin induces cell growth inhibition and cytoprotective autophagy in colon cancer cells *European journal of cancer* 68:38-50 doi:10.1016/j.ejca.2016.09.001
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation *Nature immunology* 11:136-140 doi:10.1038/ni.1831
- Zhu L, Wang J, Wei T, Gao J, He H, Chang X, Yan T (2015) Effects of Naringenin on inflammation in complete freund's adjuvant-induced arthritis by regulating Bax/Bcl-2 balance *Inflammation* 38:245-251 doi:10.1007/s10753-014-0027-7

Figure captions

Fig. 1. Chemical structure of flavanone naringenin. Illustration of the naringenin molecule obtained from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Fig. 2. Naringenin inhibits zymosan-induced articular pain, edema, and leukocyte recruitment to the synovial cavity in a dose-dependent manner. Mice were treated with naringenin (16.7-150 mg/kg, p.o.) or vehicle (saline, p.o.) 1 h before zymosan i.a. injection. (A) Articular mechanical hyperalgesia and (B) edema were measured between 1-7 h. (C) Total leukocyte, (D) neutrophils, and (E) mononuclear cells counts in the

synovial tissue of knee joint were evaluated 7 h after zymosan stimulus. Results are presented as mean \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared to the saline group; $\#p < 0.05$ compared to the vehicle-treated group; $**p < 0.05$ compared to the vehicle and naringenin (16.7 mg/kg)-treated groups (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test for intensity of hyperalgesia and edema and one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test for total leukocytes, neutrophils and mononuclear)].

Fig. 3. Naringenin reduces zymosan-induced articular histopathological alterations.

Mice were treated with naringenin (50 mg/kg, p.o.) or vehicle (saline, p.o.) 1 h before zymosan i.a. injection. (A-C) Histopathological analysis and (D) inflammatory cell infiltrate per field analysis for the histopathological score were performed in samples collected 7 h after arthritis induction. Arrows in panels A-C demonstrate the inflammatory cells counted and presented in a separate bar graph (D). Saline (A), zymosan treated with vehicle (B) and zymosan treated with naringenin (C). The samples were stained with H&E. Original magnification 40x. Results are representative of two separate experiments and present as mean \pm SEM of six mice per group per experiment. [$*p < 0.05$ compared to the saline group; $\#p < 0.05$ compared to the naringenin treated group (Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post hoc*)].

Fig. 4. Naringenin inhibits zymosan-induced oxidative stress and induces Nrf2-dependent antioxidant signaling. Mice were treated with naringenin (50 mg/kg, p.o.) or vehicle (saline, p.o.) 1 h before zymosan i.a. injection. (A) gp91^{phox} mRNA, (B) superoxide anion production (NBT reduction assay), (C) GSH levels, (D) Nrf2 mRNA and (e) HO-1 mRNA expression were determined after 3 h. Confocal

immunofluorescence analysis in synovial fluid cells was performed 7 h after zymosan stimulus to determine CD45 and Nrf2 staining. (F, J, and N) CD45, (G, H, K, L, O, and P) Nrf2 and (I, M, Q) double-staining for co-localization representative images. (R) CD45, (S) Nrf2 and (T) Nrf2/cells ratio quantitative analyzes. Results are presented as mean \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared to the saline group; $\#p < 0.05$ compared to the naringenin treated group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)].

Fig. 5. Naringenin inhibits zymosan-induced mRNA expression of inflammasome platform components. Mice were treated with naringenin (50 mg/kg, p.o.) or vehicle (saline, p.o.) 1 h before zymosan i.a. injection. (A) Nlrp3, (B) ASC, (C) pro-caspase-1, and (D) pro-IL-1 β mRNA expression was determined after 4 h by qPCR. Results are presented as mean \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared to the saline group; $\#p < 0.05$ compared to the naringenin treated group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)].

Fig. 6. Naringenin inhibits zymosan-induced TNF- α , IL-1 β , IL-33 production, preproET-1 mRNA expression and NF κ B activation as well as prevents zymosan-induced IL-10 reduction. Mice were treated with naringenin (50 mg/kg, p.o.) or vehicle (saline, p.o.) 1 h before zymosan i.a. injection. (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-33, (D) IL-10 production and (E) preproET-1 mRNA expression were determined 5 h after, and (F) NF κ B activation (total-p65/phosphorylated-p65 ratio) was evaluated 3 h after zymosan injection. Results are presented as mean \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared to the saline

group; # $p < 0.05$ compared to the naringenin treated group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)].

4.2 Artigo 2: The flavonoid hesperidin methyl chalcone targets cytokines and oxidative stress to reduce diclofenac-induced acute renal injury: contribution of the Nrf2 redox-sensitive pathway

Allan J. C. Bussmann¹, Tiago H. Zaninelli¹, Telma Saraiva-Santos¹, Victor Fattori¹, Carla F. S. Guazelli¹, Mariana M. Bertozzi¹, Ketlem C. Andrade¹, Camila R. Ferraz¹, Doumit Camilios-Neto², Antônio M. B. Casella³, Rubia Casagrande⁴, Sergio M. Borghi^{1,5,*} and Waldiceu A. Verri, Jr.^{1,*}

¹ Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy, and Cancer, Department of Pathology, Londrina State University, Londrina, Paraná State 86057-970, Brazil; bussmann@uel.br (A.J.C.B.); tzaninelli@uel.br (T.H.Z.); telma.saraiva.santos@uel.br (T.S.-S.); vfattori@outlook.com (V.F.); carlafsg@yahoo.com.br (C.F.S.G.); marianambertozzi@gmail.com (M.M.B.); ketlem Andrade94@gmail.com (K.C.A.); camila_ferraz96@hotmail.com (C.R.F.)

² Department of Biochemistry and Biotechnology, Center of Exact Sciences, Londrina State University, Londrina, Paraná State 86057-970, Brazil; camiliosneto@uel.br

³ Department of Internal Medicine, Center of Health Sciences, Londrina State University, Londrina, Paraná State 86039-440, Brazil; casella@uel.br

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Londrina State University, Londrina, Paraná State 86039-440, Brazil; rubiacasa@uel.br

⁵ Center for Research in Health Sciences, University of Northern Paraná, Londrina, Paraná State 86041-140, Brazil

* Correspondence: sergio.borghi@kroton.com.br (S.M.B.); waverri@uel.br (W.A.V.J.); Tel.: +55-43-3371-9848 (S.M.B.); Tel.: +55-43-3371-4979 (W.A.V.J.); Fax: +55-43-3371-4387

Citation: Allan J.C. Bussmann; Zaninelli, T.H.; Saraiva-Santos, T.; Fattori, V.; Carla F.S. Guazelli; Bertozzi, M.M.; Andrade, K.C.; Ferraz, C.R.; Camilios-Neto, D.; Antônio M.B. Casella; et al. The Flavonoid Hesperidin Methyl Chalcone Targets Cytokines and Oxidative Stress to Reduce Diclofenac-Induced Acute Renal Injury: Contribution of The Nrf2 Redox-Sensitive Pathway. *Antioxidants* **2022**, *11*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Hesperidin is derived from citrus fruits among other plants. Hesperidin was methylated to increase its solubility, generating hesperidin methyl chalcone (HMC), an emerging flavonoid that possess anti-inflammatory and antioxidant properties. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a powerful regulator of cellular resistance to oxidant products. Previous data evidenced HMC can activate Nrf2 signaling, providing antioxidant protection against diverse pathological conditions. However, its effects on kidney damage caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have not been evaluated so far. Mice received a nephrotoxic dose of diclofenac (200 mg/kg) orally followed by intra-peritoneal (i.p.) administration of HMC (0.03–3 mg/kg) or vehicle. Plasmatic levels of urea, creatinine, oxidative stress, and cytokines were assessed. Regarding the kidneys, oxidative parameters, cytokine production, kidney swelling, urine NGAL, histopathology, and Nrf2 mRNA expression and downstream targets were evaluated. HMC dose-dependently targeted diclofenac systemic alterations by decreasing urea and creatinine levels, and lipid peroxidation, as well as IL-6, IFN- γ , and IL-33 production, and restored antioxidant properties in plasma samples. In kidney samples, HMC re-established antioxidant defenses, inhibited lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines and upregulated IL-10, reduced kidney swelling, urine NGAL, and histopathological alterations. Additionally, HMC induced mRNA expression of Nrf2 and its downstream effectors HO-1 and Nqo1, as well as reduced the levels of Keap1 protein detected in renal tissue. The present data demonstrate HMC is a potential compound for the treatment of acute renal damage caused by diclofenac, a routinely prescribed non-steroidal anti-inflammatory drug.

Keywords: citrus flavonoid; hesperidin methylchalcone; Nrf2; diclofenac; acute renal injury; oxidative stress

1. Introduction

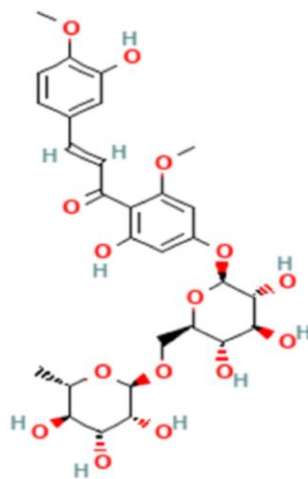
The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is a common approach due to their analgesic, anti-inflammatory, and anti-pyretic effects [1]. Based

on their recognized effectiveness for the treatment of inflammatory diseases and pain, their prescription is preferred in primary health care. However, NSAIDs can induce acute kidney injury (AKI) [2,3], a condition with potential health risks. Increased risk of AKI is observed in older individuals and in patients with chronic kidney disease [2]. Even in healthy patients, long term NSAID use may cause subclinical kidney dysfunction [4,5]. Diclofenac represents the most prescribed and used NSAID in low-, middle-, and high-income countries worldwide [6,7]. As a phenylacetic acid derivative, diclofenac is classified as a non-selective NSAID applied to treat pain, fever, and inflammation [1]. It is one of the main options for the treatment of acute and chronic pain, related mainly to the musculoskeletal system, including myalgia, lower back pain, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and ankylosing spondylitis [8–10]. Unfortunately, diclofenac has many adverse effects, such as gastrointestinal injury, hepatotoxicity, cardiovascular pathology, and AKI [1,3,9,11].

The main mechanism related to NSAID-induced AKI is prostaglandin inhibition, which in turn, has a fundamental role in the control of renin release, electrolytic dysfunction, and vasoconstriction [4,12]. At standard treatment doses, cyclooxygenase (COX)-2 selective and non-selective COX-2 NSAIDs induce a similar risk of AKI, depending on the study, and findings also suggest a higher risk upon the use of COX-2 NSAIDs with < 5-fold selectivity compared to > 5-fold selectivity [2]. Despite being considered as possessing equivalent inhibition of all COX enzymes, evidence also suggests diclofenac is more selective for COX-2 [7,13]. We previously demonstrated diclofenac does not alter COX-2 levels in renal tissue [9]. This particular aspect highlights the fact that diclofenac may induce AKI via a different primary pathological mechanism. It is postulated that a mechanism related to the induction of oxidative stress and/or reduction of antioxidant capacity may be determinant for diclofenac-induced nephrotoxicity [14,15]. In this sense, investigations have shown that through oxidative stress, increased cytokine release, and nuclear factor κ B (NF κ B) activation, diclofenac may induce AKI [1,9,16]. Therefore, the search for compounds that target these effector mechanisms, especially oxidative stress, is pertinent.

Hesperidin methyl chalcone (HMC; C₂₉H₃₆O₁₅; Figure 1) is a product of methylation of the flavanone hesperidin (hesperidin-7-rhamnoglucoside), a flavonoid found in plants and foods, for instance, Rutaceae and citrus fruits, respectively [17,18]. Hesperidin presents poor water solubility, resulting in unsatisfactory absorption in the small intestine; however, its solubility is improved after a methylation reaction under alkaline conditions, which promotes hesperidin isomerization, and the generation of the HMC. Thus, the higher solubility of HMC confers enriched bioavailability, metabolic stability, and tissue absorption [19,20]. Methods applied to obtain HMC from hesperidin include methylation with dimethylsulfate [21]. Chromatography analysis indicates HMC is composed of both fully and partially methoxylated hesperidin, generated from methylation of the hydroxyl substituents on aglycon and linked sugars, characterizing this compound as a mixture of chalcones and flavanones species [21]. HMC peaks in the blood 1–2 h after oral administration and is excreted in both urine and feces within the first 24 h after administration [20]. In models of inflammation and pain, the biological properties of HMC include vasoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic effects [19,22–25]. HMC can both inhibit the major pro-inflammatory transcription factor nuclear factor κ B (NF κ B) [19,22,24] as well as induce nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling [23]. After the release of the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-Nrf2 complex in the cytoplasm, Nrf2 translocates to the nucleus where it activates nuclear antioxidant responsive elements (ARE) that regulate the dynamic expression of phase II genes, triggering the transcription of several detoxification enzymes and cytoprotective genes [26,27]. In humans, the efficacy of HMC in combination with other molecules for the treatment of vascular dysfunction, including hemorrhoid and chronic venous insufficiency, is supported by clinical trials [25,28–30]. Importantly, experimental and clinical data demonstrated that HMC is safe, even during long term use and high

doses [31,32]. Thus, the eventual repurposing of HMC is feasible. Nevertheless, an investigation of its effects in kidney tissue stimulated with toxic doses of diclofenac, which mimics AKI induced by NSAIDs, has yet to be conducted. The present study aims to explore the beneficial therapeutic properties of HMC on experimental NSAID-induced AKI and the mechanisms underlying these effects.



Hesperidin methyl chalcone (HMC)

Figure 1. Chemical structure of HMC (compound CID: 6436550; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on April 7, 2022).

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Experimental Design

The study was carried out on Swiss mice (male, 30–35 g, aged 6–8 weeks) obtained through the State University of Londrina (Paraná State, Brazil). The conditions of the facility in which mice were maintained were as follows: ad libitum feed, twelve/twelve hours light/dark cycle, regular thermal comfort (21 °C), and circulation of air (15–30 cubic feet per minute/square feet). Animals were maintained in pathogen-free conditions. During the process of euthanasia for sample collection, animals were exposed to a lethal dose of 5% isoflurane, followed by cervical dislocation, and subsequent decapitation. The experimental protocol was carried out according to previous studies by our group [1,9]. Mice received a standard toxic dose of diclofenac (200 mg/kg, 100 μ L, per oral), and 30 min later, were administered HMC (0.03, 0.3, and 3 mg/kg; 200 μ L) or vehicle (saline; 200 μ L) via the intra-peritoneal (i.p.) route. Blood, kidney, and urine samples were analyzed 24 h after NSAID (sodium diclofenac, SDCF) administration. Blood samples were collected after a dose-response experiment for the assessment of urea and creatinine levels to determine the best dose of HMC, and a dose of 3 mg/kg of HMC was chosen for all subsequent experiments in the study. After this initial analysis, blood samples were collected for a new round of experiments that included evaluations of oxidative stress (antioxidant capacity parameters and lipid peroxidation) and cytokine production (both described in detail below). Renal tissue and urine samples were collected to evaluate the following parameters: oxidative stress (antioxidant capacity parameters and lipid peroxidation), cytokine production, swelling, histopathological changes, and mRNA expression of Nrf2 and its downstream effectors, as well as the concentration of a well-known urinary marker of AKI (NGAL). The experiments using kidney samples were conducted on the entire organ (one kidney per analysis).

2.2. Compounds Used in the Study

SDCF (Neutaren®) was purchased from Novartis (São Paulo, SP, Brazil); HMC was acquired from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); and saline was acquired from Gaspar Viana S/A (Fortaleza, CE, Brazil). The dilution of SDCF and HMC using saline was performed immediately before administration via the oral (p.o.) and i.p. routes, respectively.

2.3. Evaluation of Renal Function Markers

The evaluation of plasma concentrations of urea and creatinine were performed in blood samples after p.o. administration of SDCF (24 h). Samples were collected into heparinized tubes with posterior centrifugation (200× g, 10 min, 4 °C), and subsequently processed for determination of renal function markers using commercial kits (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil). The data are shown as milligram per deciliter (mg/dL) of plasma.

2.4. Ferric-Reducing Ability Potential (FRAP), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) Radical Cation, and Reduced Glutathione (GSH) Assays

FRAP, ABTS and GSH assays were performed to evaluate antioxidant capacity during the protocols in the present model [1,9]. Kidney and blood samples (EDTA microtubes) were collected 24 h after SDCF administration and homogenized with 500 µL of 1.15% KCl, subsequently centrifuged (10 min × 200× g × 4 °C), and the ability of the sample to resist oxidative damage was determined by measuring ferric-reducing ability with the FRAP assay and free radical scavenging ability with the ABTS assay. FRAP determination used 50 µL of supernatant, together with 150 µL of deionized water and 1.5 mL of freshly prepared FRAP reagent. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and subsequently, the absorbance was measured at 595 nm. The ABTS test was conducted by using ABTS solution diluted with phosphate-buffered saline at pH 7.4 to an absorbance of 0.80 at 730 nm. After this step, 1.0 mL of diluted ABTS solution was mixed with 20 µL of supernatant (as prepared for the FRAP assay). After 6 min, the absorbance was measured at 730 nm. The results were equated against a Trolox standard curve (1.5–30 µmol/L, final concentrations). The results are expressed as nanomoles (nmol) of Trolox equivalents per milliliter (mL) or milligram (mg) of tissue for plasma and kidney, respectively, for both analyses. For the GSH assay, kidney samples were harvested 24 h after SDCF administration. Samples were homogenized in 0.02 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) reagent and treated with 2 mL of water plus 0.5 mL of 50% TCA (trichloroacetic acid). Next, homogenates underwent centrifugation (1500× g, 15 min, 4 °C) and the resultant supernatants were carefully removed for subsequent addition to 2 mL of Tris 0.4 M (pH 8.9) plus 50 mL of dithionitrobenzoic acid (DTNB) solution. After 5 min, spectrophotometric readings were carried out at 412 nm. Data are expressed as nmol of GSH per mg of tissue. For the three analyses, a Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) was used.

2.5. Assessment of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)

Lipid peroxidation in kidney and blood samples (EDTA microtubes) was assessed 24 h after the administration of SDCF via TBARS determination using an adapted methodology described previously [9]. In brief, TCA (10%) was included in the tissue homogenate or plasma samples to precipitate the proteins. Subsequently, samples underwent centrifugation (1000× g, 3 min, 4 °C) and the supernatant was removed for the next step. The supernatants were then mixed with thiobarbituric acid (TBA; 0.67%), incubated for 15 min in a boiling water bath (100 °C), then transferred to an ice bath. Malondialdehyde (MDA) was then quantitated as an indicator of lipid peroxidation in kidney and plasma samples by measuring the absorbance by spectrophotometry (572–

535 nm). Data are presented as TBARS (nmol of MDA per mL) for plasmatic samples, and as TBARS (nmol of MDA per mg of tissue) for renal samples.

2.6. Evaluation of Cytokines and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Production

The following cytokines were assessed in blood and kidney samples 24 h after the administration of SDCF: interleukin (IL)-1 β , IL-6, interferon (IFN)- γ , IL-33, and IL-10. Considering plasmatic assay, after collection (EDTA microtubes), samples were centrifuged (800 \times g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C), and the generated supernatants were used to assess the levels of cytokines. Kidney samples were homogenized in 500 μ L of saline. Cytokine levels in both tissues were then measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, CA, USA) and analyzed spectrophotometrically. Data are expressed as mg/dL for plasma samples and as picograms (pg) per 100 mg of tissue for kidney samples [1,9]. NGAL urine level was also evaluated by ELISA 24 h after the administration of SDCF. Urine samples were collected into EDTA microtubes after applying moderate compression of the pelvic region of mice. Samples were then transferred into anti-mouse NGAL pre-coated plates and processed according to the manufacturer's instructions (Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA). The levels of NGAL were analyzed by spectrophotometry at 450 nm, and the data are presented as nanogram (ng) per mL of urine [1].

2.7. Histopathological and Swelling Evaluations

For histopathological analysis, kidneys were collected 24 h after the administration of SDCF. Kidneys initially underwent a fixation process using 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, the kidneys were dehydrated in a graded series of ethanol solutions and finally processed for paraffin embedding. The process of sectioning the cortical portions of the organs was carried out using a cryostat (CM1520, Leica Biosystem, Richmond, IL, USA) with a thickness of 5 μ m. After this step, for the sections underwent hematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS) staining. Stained sections from the control group, model group (SDCF) treated with vehicle, and model group treated with HMC were analyzed in a blinded manner through the use of light microscopy at 40 \times magnification. A semi-quantitative assessment of kidney damage was carried out in 10 high-power fields randomly selected as described previously with modifications [1,9,33] with scoring for each animal. Summed histopathological scores of different experimental groups were determined by the morphological analysis of the following parameters: (1) glomerular pathology; (2) impairment of the cortical brush border; and (3) the presence of vacuoles in tubular cells. A four-point scale was used to describe the level of pathological change: 0, normal; 1, mild; 2, moderate; 3, severe. The score for each parameter were combined into a total histopathological score (9 maximum). Kidney swelling was also evaluated 24 h after SDCF administration by using the organ wet weight as an indicator. After collection, the kidneys were weighed on a precision balance and the results presented as mg of renal tissue per gram (g) bodyweight.

2.8. Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) Assay

RT-qPCR was performed as previously described [34]. Kidneys were collected 24 h after the administration of SDCF, homogenized in TRIzolTM Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), and total RNA was isolated according to the manufacturer's guidelines. The purity of total RNA was measured spectrophotometrically (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland), and the wavelength absorption ratio (260/280) was between 1.8 and 2.0 for all preparations. Reverse transcription of total RNA to cDNA and qPCR were performed using the GoTaq[®] 2-Step RT-qPCR System (Promega,

Madison, Wisconsin, EUA) and target primers with the Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Waltham, Massachusetts, USA). The relative gene expression was measured using the comparative $2^{-(\Delta\Delta C_q)}$ method. The primers used in this study were as follows: Nrf2—forward, 5'-TCACACGAGATGAGCTTAGGGCAA-3'; reverse, 5'-TACAGTTCTGGGCGGCGACTTTAT-3' (gene accession number 18024); heme-oxygenase-1 (Ho-1)—forward, 5'-CCCAAAACTGGCCTGTAAAA-3'; reverse, 5'-CGTGGTCAGTCAACATGGAT-3' (gene accession number 15368); NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1) (Nqo1)—forward, 5'-TGGCCGAACACAAGAAGCTG-3'; reverse, 5'-GCTACGAGCACTCTCTCAAACC-3' (gene accession number 18104). The expression of β -actin (forward, 5'-AGCTGCGTTTTACACCCT TT-3'; reverse, 5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3' (gene accession number 11461) mRNA was used as a control for tissue integrity in all samples.

2.9. Immunofluorescence Assay in Confocal Microscopy

Twenty-four hours after the administration of SDCF, animals underwent a perfusion process using 4% PFA in PBS injected via the ascending aorta artery. Next, the kidney was carefully removed and immersed in 4% PFA and remained in this solution for the next 24 h. After this period, samples were placed in 30% saccharose and incubated for 3 days. Once embedded (Tissue-Tek® reagent, Torrance, California, USA), the kidneys were sectioned to a thickness of 10 μ m using cryostat equipment (CM1520, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Four samples per animal per slide and five animals per group were analyzed. Antigenic recovery was performed (exposure to 90 °C followed by immediate cooling until 30 °C) then the sections passed through a blocking stage (200 μ L/slide; 0.5% tween 20 and 5% bovine serum albumin in PBS) for 2 h, followed by overnight incubation at 4 °C with the primary antibody (Keap1, D6B12, rabbit IgG mAb, #8047, 1:100 dilution, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EUA). A solution containing the secondary antibody (anti-rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor® 647, #4414S, 1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EUA) was applied to the slides the next day for 1 h. Treatment with secondary antibody alone was used to test for non-specific staining. For assembly of the slides, DAPI mounting media reagent (ProLong™ Gold Antifade Mountant, #P36931, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) was used. Immunofluorescence analysis of aleatory fields using a confocal microscope (TSC SP8 Leica microsystem, Wetzlar, Germany) were performed on different portions of the cortical region of kidneys with a magnification of 40 \times . Representative images from each group are presented with a 50 μ m scale. Keap1 fluorescence intensity were analyzed by a blinded experimenter and measured using confocal microscope software to provide quantitative data for the experiment.

2.10. Statistical Methodology

Statistical methods were applied to 6 animals per group (5 animals for immunofluorescence) in individual experiments. For histopathological evaluations, the final score considered 12 animals per group in individual experiments. The results are representative of two independent experiments. One-way analysis of variance with Tukey's post hoc test was used for the determination of statistical interpretations. Additionally, the non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc tests was applied to the analysis of categorical variables. The analyses were carried out with GraphPad Prism 7.00 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) software. All data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). Results with values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. HMC Reduces SDCF-Triggered Renal Dysfunction: Urea and Creatinine Levels, and Oxidative Stress in Plasma

Our first approach was designed to determine the most effective dose of HMC to inhibit SDCF-induced renal dysfunction. SDCF was administered to the mice orally, and after 30 min, they received i.p. treatment with HMC (0.03, 0.3, and 3 mg/kg). The plasmatic levels of urea and creatinine (Figure 2A and 2B, respectively) were determined 24 h later. HMC treatment inhibited the elevation of renal dysfunction markers induced by SDCF in a dose-dependent manner. For urea, it was observed that only a dose of 3 mg/kg inhibited the increase induced by SDCF. For creatinine, intermediate and high doses of HMC (0.3, and 3 mg/kg, respectively) inhibited the effect of SDCF. Since 3 mg/kg was the only dose able to inhibit both markers of impaired renal function, this dose was selected for the following experiments. Thereafter, we investigate the antioxidant properties of HMC upon SDCF-induced oxidative stress (Figure 2C–E). HMC treatment restored the impaired plasmatic antioxidant status induced by SDCF, seen as increased FRAP and ABTS levels compared to the vehicle control, and inhibited lipid peroxidation levels, seen as a reduced concentration of TBARS. These results indicate HMC protects renal tissue from the toxic effects of SDCF. Further, HMC reduces systemic oxidative parameters in AKI mice, which reflects its potential antioxidant actions in response to increased free radical activity.

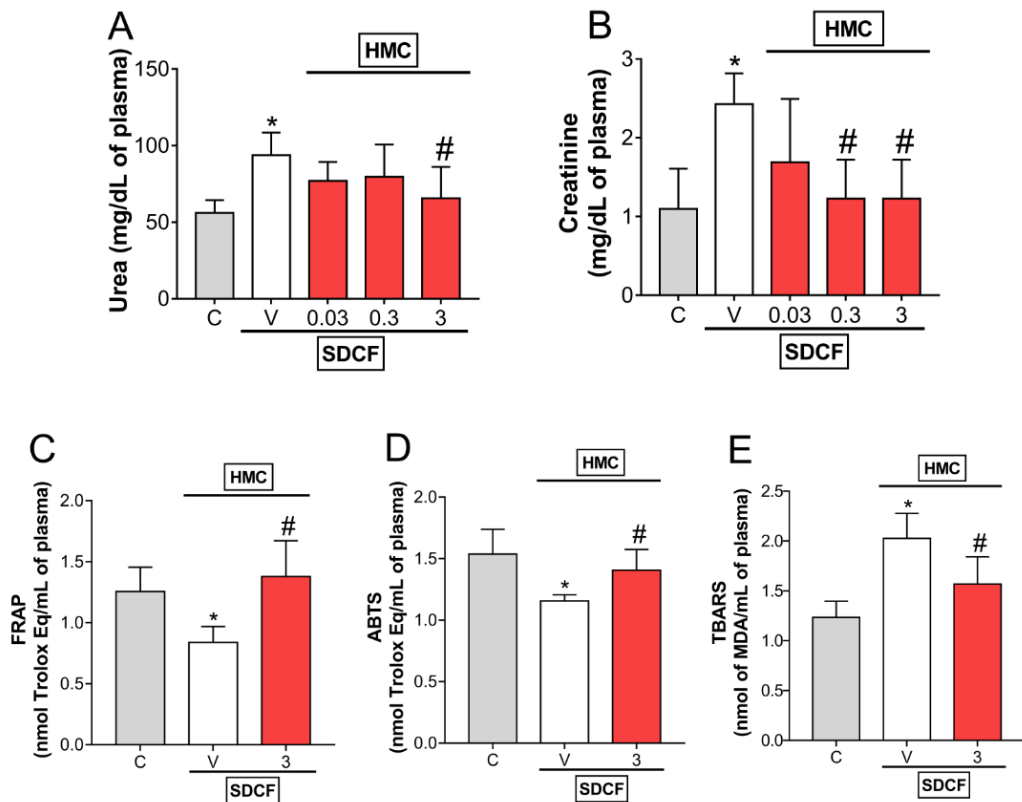


Figure 2. HMC inhibits SDCF-induced increase of plasmatic levels of urea, creatinine, and oxidative stress. Blood samples were collected 24 h after the administration of SDCF for the evaluation of urea (A), creatinine (B), FRAP (C), ABTS (D), and TBARS (E) levels. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 6$ mice per group per experiment, and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control (C) group; # $p < 0.05$ vs. vehicle (V) treated group; one ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.2. HMC Reduces IL-6, IFN- γ , and IL-33, but Does Not Modify IL-1 β and IL-10 Levels in Plasma

The next investigation aimed to evaluate the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma. For this approach, SDCF was administrated to the mice orally, and after 30 min, they received i.p. treatment with HMC (3 mg/kg) for the evaluation of plasmatic levels of IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-33, and IL-10 (Figure 3A–E). SDCF did not interfere with IL-1 β and IL-10, however, it induced a significant increase in IL-6, IFN- γ , and IL-33 levels in plasma. HMC treatment did not affect IL-1 β and IL-10, but inhibited SDCF-induced IL-6, IFN- γ , and IL-33 (Figure 3A–E). These data suggest HMC may modulate some pro-inflammatory cytokines systemically in AKI mice.

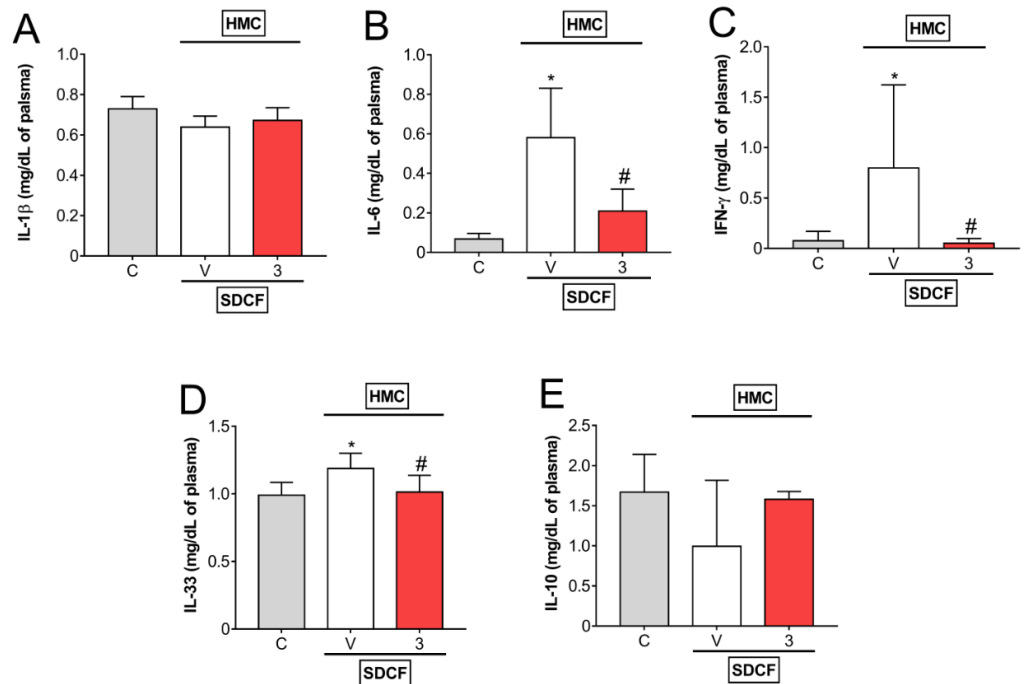


Figure 3. HMC inhibits SDCF-induced IL-6, IFN- γ , and IL-33, but does not change IL-1 β and IL-10 plasmatic levels. Blood was collected 24 h after the administration of SDCF for the evaluation of IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-33 (D), and IL-10 (E) levels. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 6$ mice per group per experiment, and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control (C) group; # $p < 0.05$ vs. vehicle (V) treated group; one ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.3. HMC Reduces Oxidative Stress in Renal Tissue

Antioxidant parameters and lipid peroxidation levels were measured in the kidneys, the target organ for oxidative stress induced by SDCF, to investigate the effects of HMC. SDCF was administrated to the mice orally, and after 30 min, they received i.p. treatment with HMC (3 mg/kg) for the evaluation of FRAP, ABTS, GSH, and TBARS levels (Figure 4A–D). The toxic dose of SDCF impaired antioxidant defenses, observed as reduced FRAP, ABTS, and GSH levels, and increased lipid peroxidation, observed as increased TBARS levels in renal tissue. HMC treatment re-established all antioxidant parameters, and even inhibited lipid peroxidation in kidneys (Figure 4A–C). These data demonstrate HMC can effectively counteract the oxidative stress induced by SDCF in renal tissue.

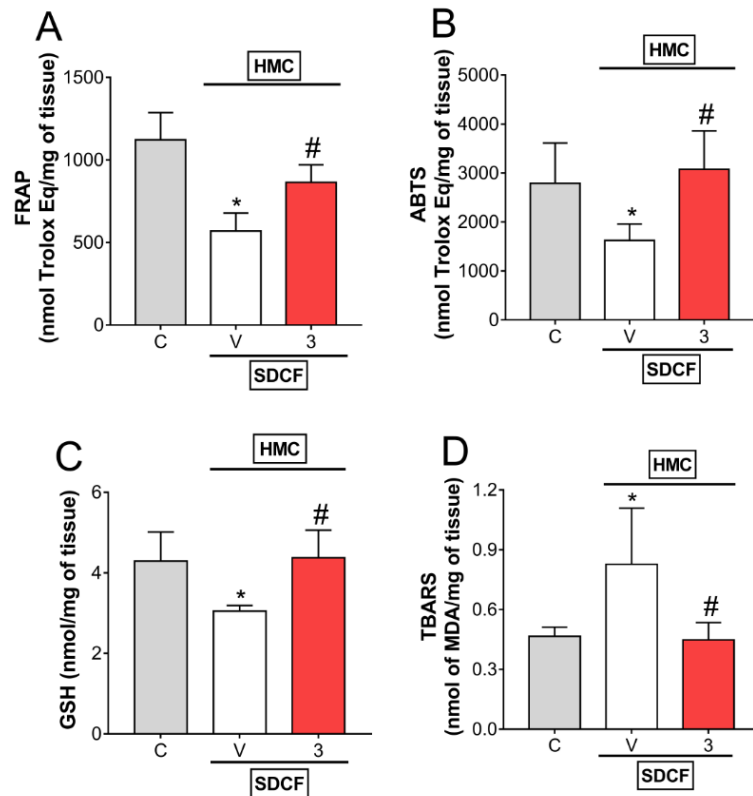


Figure 4. HMC inhibits SDCF-induced oxidative stress in renal tissue. Kidney was collected 24 h after the administration of SDCF for the evaluation of FRAP (A), ABTS (B), GSH (C), and TBARS (D) levels. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 6$ mice per group per experiment, and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control (C) group; # $p < 0.05$ vs. vehicle (V) treated group; one ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.4. HMC Reduces IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and IL-33, as well as Increases IL-10 Levels in Renal Tissue

After determining the systemic modulation of cytokines by HMC in SDCF-induced AKI, our next objective was to evaluate the modulation of cytokines by HMC in renal tissue. Therefore, SDCF was administrated to the mice orally, and after 30 min, they received i.p. treatment with HMC (3 mg/kg) and IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-33, and IL-10 levels were determined in renal tissue (Figure 5A–E). SDCF increased the production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and IL-33, and reduced the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Treatment with HMC efficiently inhibited the increased levels of IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and IL-33 induced by SDCF, and restored the levels of IL-10 significantly (Figure 5A–D). These results indicate that in addition to inhibiting oxidative stress, HMC acts by inhibiting pro-inflammatory and inducing anti-inflammatory cytokines to combat the toxic effects of SDCF in the kidney.

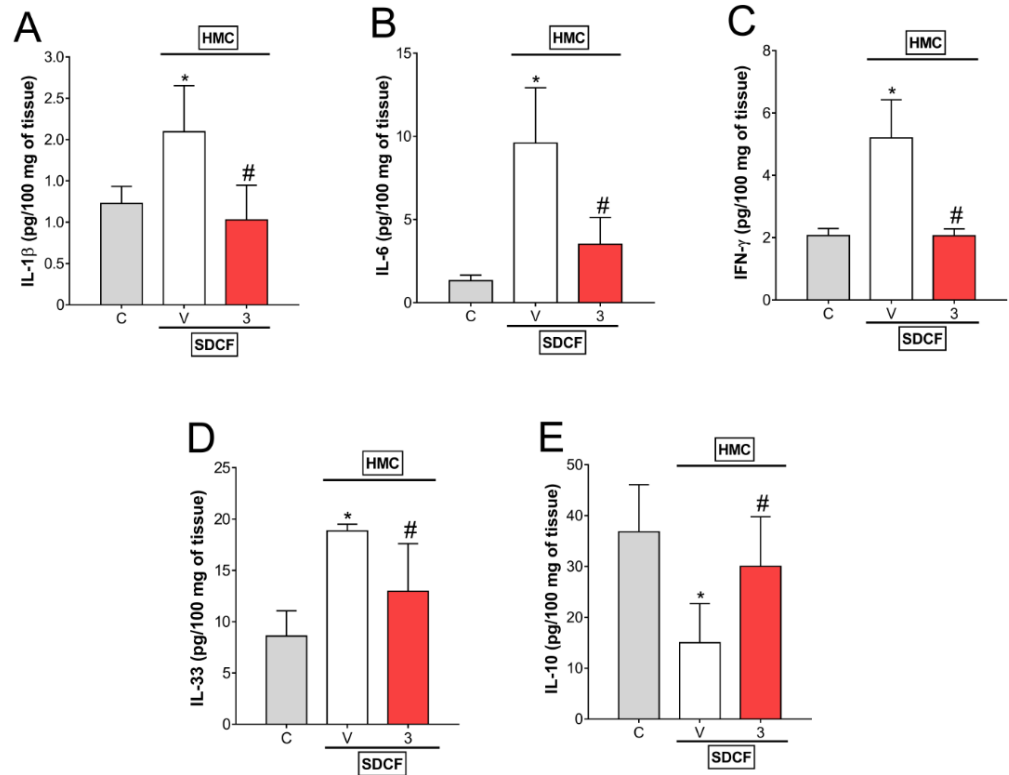


Figure 5. HMC inhibits SDCF-induced IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and IL-33, and reverses SDCF-induced depletion of IL-10 levels in renal tissue. Kidney was collected 24 h after the administration of SDCF for the evaluation of IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-33 (D), and IL-10 (E) levels. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 6$ mice per group per experiment, and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control (C) group; # $p < 0.05$ vs. vehicle (V) treated group; one ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.5. HMC Reduces SDCF-Induced Renal Histopathology, Swelling and Tubular Cells Cytotoxicity

Our next goal was to investigate the protective effects of HMC upon tissue inflammatory pathology induced by SDCF. For this approach, SDCF was administrated to the mice orally, and after 30 min, they received i.p. treatment with HMC (3 mg/kg) for the evaluation of renal histopathology and swelling, and NGAL urinary levels (Figure 6). SDCF altered the regular morphology of the cortical layer of renal tissue, observed as tubular cell dilatation together with flattening of the renal epithelium and disruption of the brush borders in the proximal convoluted tubes, as well as deformation in glomeruli shape and Bowman's capsule injury (Figure 6C and 6D, respectively), which were not observed in control mice (Figure 6A and 6B, respectively). HMC treatment reduced this altered morphology, conferring protection on the kidney (Figure 6E and 6F). Besides reducing the histopathology in renal tissue (Figure 6G), HMC treatment also inhibited kidney swelling and reduced NGAL levels in urine (Figure 6H and 6I, respectively), which denotes a reduction in organ inflammation and tubular cells damage. Altogether, these data show HMC can act as a powerful therapeutic compound for SDCF-induced AKI-related tissue pathology.

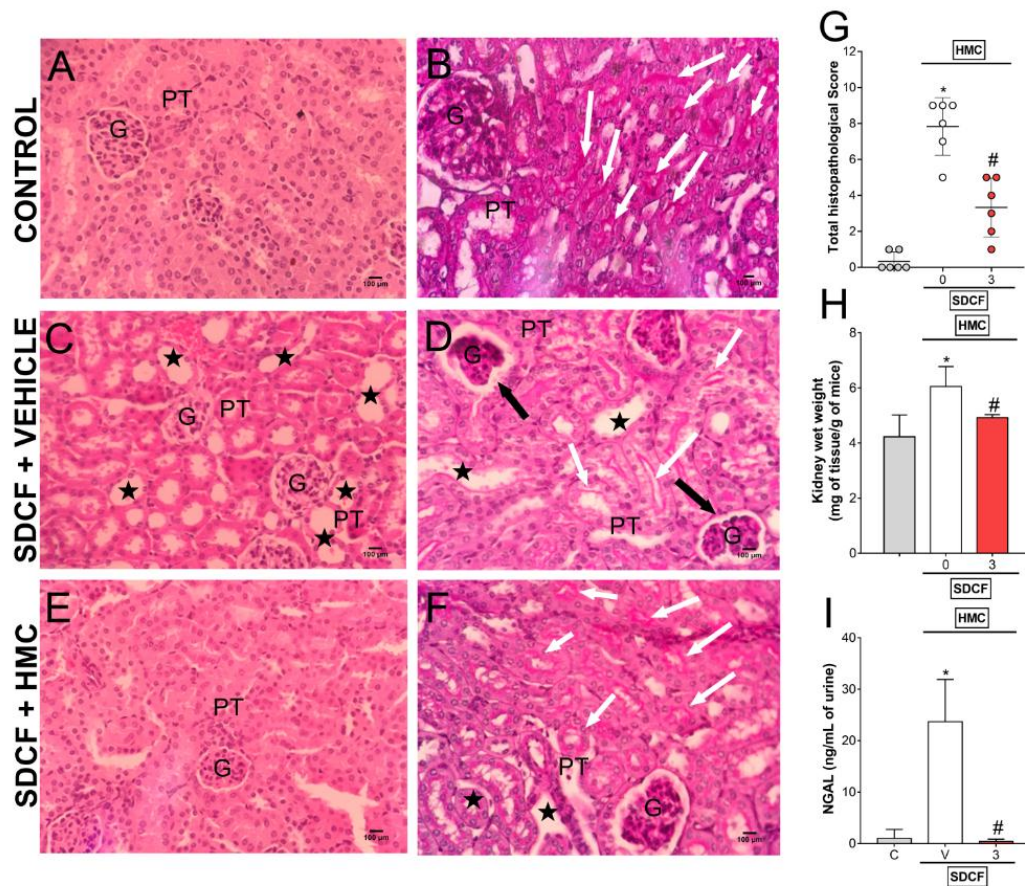


Figure 6. HMC inhibits SDCF-induced renal histopathology, swelling and tubular cells cytotoxicity. Kidney samples were collected 24 h after the administration of SDCF for the evaluation of histopathology with H&E (A, C, E), and PAS (B, D, F) staining, total histopathological score(G), swelling (H), and NGAL urinary levels (I). Original magnification 40×; 100 μm scale. Stars show tubular dilatation; black arrows show glomeruli/Bowman’s capsule lesions; and white arrows show brush border differences in varied experimental groups. Data are shown as mean ± SD, $n = 12$ and $n = 6$ mice per group per experiment for histopathological analysis and swelling/NGAL, respectively, and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control (C) group; # $p < 0.05$ vs. SDCF+vehicle (V) treated group; Kruskal-Wallis followed by Dunn’s post hoc test (G) and one ANOVA followed by Tukey’s post hoc test (H, I). G, glomerulus; PT, proximal tubule.

3.6. HMC induces Nrf2 Signaling to Reduce SDCF-Induced AKI

Considering the importance of oxidative stress to SDCF-triggered AKI and HMC activity, we investigated whether the HMC protective mechanism involves the activation of the major antioxidant pathway, Nrf2/ARE. Therefore, SDCF was administered to the mice orally, and after 30 min, they received i.p. treatment with HMC (3 mg/kg) for the evaluation of Nrf2, HO-1, and Nqo1 mRNA expression (Figure 7). Nrf2 and Nqo1 mRNA expression were not altered by SDCF administration (Figure 7A and 7C, respectively), however Ho-1 expression was increased by SDCF (Figure 7B). Treatment with HMC significantly increased Nrf2 and Nqo1 mRNA expression compared to control mice, and more robustly, increased Ho-1 mRNA expression in comparison to both control and SDCF administered mice (Figure 7A–C). These results demonstrate the induction of the Nrf2 pathway by HMC, and consequently, its downstream signaling effectors, contributing to the mechanism that reduces SDCF-induced AKI.

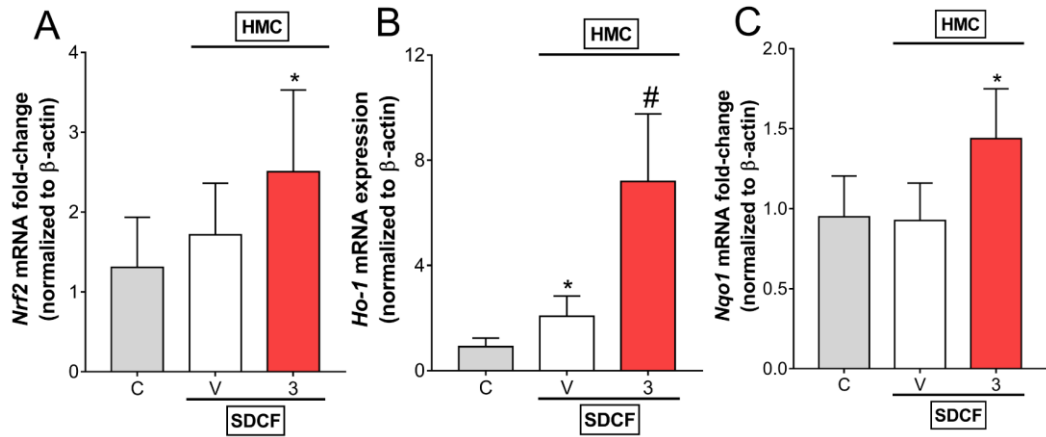


Figure 7. HMC induces Nrf2 signaling in renal tissue. Kidney samples were collected 24 h after the administration of SDCF for the evaluation of Nrf2 (A), Ho-1 (B), and Nqo1 (C) mRNA expression. Results are expressed as mean ± SD, $n = 6$ mice per group per experiment, and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control (C) group; # $p < 0.05$ vs. vehicle (V) treated group; one ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.7. HMC Reduces Keap1 in the Kidney

The results in Figure 7 indicate that the Nrf2 system is stimulated by HMC treatment. Keap1 is a negative regulator of Nrf2 present in the cytoplasm. Keap1 favors cullin-based E3 ubiquitin ligase-mediated ubiquitination of Nrf2 [26]. Control and SDCF+vehicle groups presented similar renal staining for Keap1 indicating that Nrf2 is under control (Figure 8A, 8B, and 8D). HMC treatment reduced Keap1 fluorescence detection (Figure 8C and 8D), and Nrf2 would be able to translocate to the nucleus and activate ARE-dependent gene expression in these mice. Thus, these data line up with the previous results indicating HMC reduces oxidative stress and enhances endogenous antioxidant defenses as well as stimulating the Nrf2 pathway and its downstream targets.

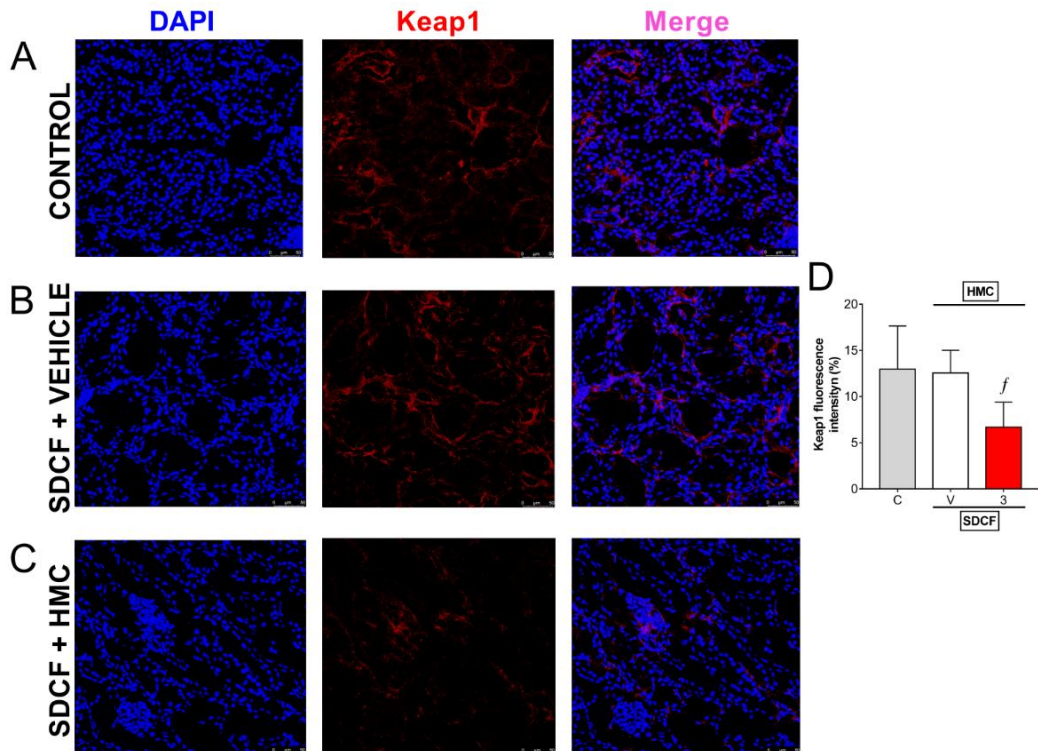


Figure 8. HMC reduces Keap1 protein expression in renal tissue. Kidney samples were collected 24 h after the administration of SDCF for the evaluation of immunofluorescence detection of Keap1 (A–D). Original magnification 40×; 50 μm scale. DAPI was used for nuclear detection in samples. Data are showed as mean ± SD, *n* = 5 mice per group per experiment, and are representative of two independent experiments. $^{\dagger}p < 0.05$ vs. control (C) and SDCF+vehicle treated (V) groups; one ANOVA followed by Tukey’s post hoc test.

4. Discussion

Although considered an effective pharmacological tool for the treatment of fever, acute and chronic pain, and inflammatory diseases, the clinical applicability of diclofenac is frequently hampered by adverse effects related to its use [1,3,9,11]. Kidneys represent the master human organ related to diclofenac excretion [35]. For this reason, renal tissue is frequently exposed to diclofenac and its metabolites, such as diclofenac acyl glucuronide (diclofenac beta-D-glucosiduronic acid; C₂₀H₁₉Cl₂NO₈), and thus, is especially vulnerable to their toxic effects [36]. The nephrotoxic effects of diclofenac are dose-dependent, increasing concomitantly with higher doses [37]. Moreover, the interaction of diclofenac with other drugs, including the nucleotide analogue inhibitor of reverse transcriptase, tenofovir disoproxil, substantially boosts the risk of acute kidney injury [38]. Evidence also indicates that long-term use together with the analgesic drug paracetamol (acetaminophen) leads to drug-induced chronic kidney disease [39]. All these data highlight the need for new alternative therapies to treat AKI.

The present study demonstrates for the first time the nephroprotective effects of the flavonoid HMC in diclofenac-induced AKI in mice. HMC reversed the dysfunctional pathological aspects of AKI since we observed an improvement in the levels of the renal function markers urea and creatinine. The magnitude of inflammation in acute kidney injury may vary according to some aspects, including age and weight of animals [40,41]. Kidney inflammation caused by SDCF was also counteracted by HMC, reducing kidney swelling and modulating systemic and renal cytokine production. Mechanistically, we showed HMC presents a remarkable antioxidant effect in blood and kidney (restoration of antioxidant capacity and reduction of lipid peroxidation), with this effect being attributed to the structural antioxidant activity of HMC [23] and activation of the Nrf2 pathway. The outcomes observed in the present model indicated diminished damage to kidney tissue after SDCF administration (attenuation of renal histopathological score and NGAL urinary levels in HMC treated mice). The HMC dose needed to achieve these effects in the present intoxication model was 3 mg/kg. In other models studied by our group, including those of inflammation and pain, treatment effects were obtained with higher doses [19,22,24,35,42]. The difference among these models is a major point for the difference in HMC action. Models in which an inflammatory stimulation activated tissue resident and recruited immune cells through receptors to cause inflammation and pain characterizes our previous studies. The current SDCF-induced AKI is a different condition because it is not related to the primary mechanism of action for SDCF, that is, the inhibition of COX isoforms. SDCF does not induce oxidative stress at therapeutic doses. However, there is overuse and intentional intoxication on some occasions. Thus, it is essential to note that in previous studies we adopted models based on pharmacology principles in which the recruitment and activation of leukocytes was higher, and consequently, oxidative stress was also higher. It is hypothesized that SDCF and its metabolites cause kidney damage via interaction with renal organic anion transporters (OATs) [36], a different mechanism to that induced by inflammatory stimuli. Furthermore, our previous studies were of arthritis, skin inflammation and colitis, thus, the targets tissues involved and the physiopathological mechanisms in each model were different, as were the stimuli. Additionally, the routes used for the administration of HMC varied between these studies (oral and i.p.), which modifies the pharmacokinetics of the drug, as well as its bioavailability. In addition to

all these differences, it is important to highlight that HMC is excreted in the urine [20], likely allowing more abundant accumulation of the compound in the kidney. Thus, we speculate that it may reach higher concentrations in the kidney than in other organs, such as joints and skin, which were used in previous studies. Therefore, these variables (different stimuli, physiopathological mechanisms, affected tissues, disease duration, route of excretion, and routes of HMC administration of) may explain the different dosages needed for a treatment effect among these studies.

Acute renal failure is clinically observed as a rapid elevation in serum creatinine and urea concentrations above the limits considered normal. The main rationale characterizing the use of urea and creatinine levels as markers of AKI concerns glomerular filtration rate (GFR) status, a fundamental aspect for clinical diagnosis of AKI. As GFR declines, the excretion of urea and creatinine in urine decreases and blood concentrations increase [43]. We observed a clear glomerular architectural change after SDCF administration together with increased urea and creatinine levels in the blood, indicating glomerulus injury and reduced GFR, respectively. These changes were inhibited in mice that received HMC treatment, indicating this flavonoid targets SDCF toxicity to prevent functional deficits in renal tissue. Importantly, although frequently used, urea and creatinine serum levels may not be as sensitive for identifying AKI [1,43]. Thus, we are also concerned with evaluating the most reliable markers for kidney damage. Preclinical studies were very important for the discovery of more specific markers of kidney injury [44]. NGAL protein is considered a sensitive and predictive early molecule of AKI [45], and its urinary increase reflects damage, especially to the glomeruli and proximal tubules [46,47]. In a previous study by our group, we demonstrated for the first time that NGAL is also an important marker of SDCF-induced AKI [1]. In this sense, we evaluated the effects of HMC on SDCF-induced increased NGAL urinary levels. HMC treatment efficiently mitigated the rise in NGAL levels, which is consistent with the improvement in renal function (reduced urea and creatinine levels) and histopathological score (reduced glomerular and proximal tubular cells damage) observed in HMC-treated mice.

After observing that HMC leads to reduced SDCF toxicity in renal tissue, the mechanisms by which HMC confers such protection were investigated. As mentioned earlier, HMC is known for its anti-inflammatory and antioxidant effects. SDCF induces the activation of NF κ B in the kidney [1,9,48] and leads to an increase in the production of inflammatory mediators, including cytokines [1,9]. In AKI, cytokines may be released by recruited and/or resident leukocytes as well as by renal tubular cells, promoting kidney inflammation (as observed by kidney swelling in the present study). Cytokines are also released into the blood, thus reflecting potential urine and blood biomarkers of AKI [1,9,49,50]. Their systemic release during AKI may even promote damage to distant organs, raising the importance of inhibiting cytokine production to avoid both kidney and distant organ injury [49]. We observed that HMC inhibited pro-inflammatory cytokine production and stimulated an anti-inflammatory cytokine after SDCF administration. In plasma samples, HMC inhibited IL-6, IFN- γ , and IL-33 levels, whereas it did not affect IL-1 β and IL-10 levels since they were not altered in SDCF AKI. In the kidney, the inhibition detected after HMC treatment included IL-6, IFN- γ , IL-33, and IL-1 β . The profile for IL-10 levels in plasma and renal tissue differed between the experimental groups. In the plasma, there was only a tendency for a reduction in IL-10 in the SDCF vehicle-treated group, and for an increase in the HMC-treated group, which contrasts with the significant changes observed in renal tissue. This apparent incongruence in the data may represent differences in the dynamics of cytokine production and release after SDCF stimulus. Regardless, HMC inhibited all evaluated pro-inflammatory cytokines altered by SDCF, and at the same time, it induced IL-10 in the kidney. In renal tissue, an increase in IL-10 production is interesting considering that besides being a fundamental cytokine for controlling excessive inflammation through inhibition of pro-inflammatory cytokines, IL-10 may positively regulate HO-1 [51]. In turn, HO-1 promotes adaptive antioxidant cellular

response to reduce or prevent damage resulting from oxidative stress. In SDCF-induced AKI, we demonstrated that in addition to inducing IL-10 production, HMC also activated another decisive signaling cascade that mediates HO-1 production, the Nrf2/ARE antioxidant pathway, which is discussed below.

Mice that were treated with HMC presented increased antioxidant capacity in both plasma and renal samples, as indicated by FRAP and ABTS tests. Reduced levels of lipid peroxidation were also detected in both tissues in animals treated with HMC. Moreover, HMC induced increased production of the non-enzymatic antioxidant GSH in renal tissue. These data are extremely important, since oxidative stress accounts for the impairment in GFR [52,53]. In fact, in a reactive oxygen species-dependent manner, cytokines such as IL-1 β and IL-6 may promote dysfunction of glomerular permeability to impair the GFR rate [53]. These latter data highlight the intimate link between cytokines and oxidative stress in renal damage caused by SDCF. The present results corroborate previous studies which demonstrated potential antioxidant effects of HMC in other models involving different pathological mechanisms [19,22–24,54]. For instance, in ultraviolet B (UVB)-irradiated mouse skin, HMC restored impaired GSH production and inhibited the expression of gp91^{phox} subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase that generates superoxide anions [23,54]. Increased production of cellular superoxide anion is a contributing mechanism to the perpetuation of an oxidant cascade that ultimately leads to lipid peroxidation. The restoration of GSH levels and inhibition of oxidative stress by HMC were also demonstrated in models of zymosan-induced arthritis [22] and experimental ulcerative colitis [42]. In the present experimental model, HMC efficiently reduced lipid peroxidation in blood and renal tissues. HMC has the structural ability to act as an antioxidant [23]; however, the activation of the Nrf2/ARE signaling pathway might also account for the effects of HMC. HMC can induce Nrf2 signaling in inflamed skin [23], and here, we demonstrate this modulation can also occur in the kidney after suffering the toxic effects of SDCF. ARE-dependent gene expression drives the canonical expression of HO-1, NQO1, glutamatecysteine ligase (GCL), glutathione S-transferases (GSTs), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and thioredoxin, among others [26], which mediate powerful antioxidant effects. Through GCL induction, Nrf2 can upregulate GSH levels [55]. Therefore, the upregulation of GSH observed here after HMC treatment is consistent with an effect on Nrf2 activity. In addition to increasing GSH levels in renal tissue, HMC effectively enhanced mRNA expression for *Nrf2* and its downstream effectors *Nqo1* and *Ho-1* in the kidney, further contributing to the antioxidant effects observed. We also observed that Keap1 immunostaining was reduced in the kidneys after HMC treatment, which is also consistent with the notion that Nrf2 signaling was enhanced by this flavonoid [26]. The inhibition of NF κ B by HMC is possibly an additional mechanism for containing oxidative stress in SDCF-induced AKI, as this pro-inflammatory transcription factor is redox sensitive [1,9,26,34].

Besides being a potent inducer of antioxidant responses, Nrf2 can also contribute to reducing inflammation [26,56]. This concept is supported by several preclinical studies evaluating Nrf2 during the modulation of inflammatory states. For instance, Nrf2 activity may reduce the expression of pro-inflammatory cytokines (including tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6) in immune cells, such as neutrophils and macrophages. High Nrf2 expression counteracts the expression of pro-inflammatory genes by inhibiting NF κ B and Nrf2 disruption aggravates the inflammatory response in models of sepsis, pleurisy, emphysema, and autoimmune diseases [56]. Through GATA binding protein-3 (GATA-3) induction, Nrf2 can simultaneously suppress the production of IFN- γ and increase the production of Th2 cytokines IL-4, IL-5, and IL-13 [57] and CD4⁺ T cells from Nrf2 knockout mice produce more IFN- γ and less Th2 cytokines [57]. Finally, Nrf2 can promote the production of IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β) in FoxP3-expressing Treg cells [56]. Thus, this robust body of evidence indicates Nrf2 per se is crucial for the control of inflammation.

5. Conclusions

Although considered a drug of first choice for many clinical conditions related to pain and inflammation, SDCF may induce kidney toxicity. One relevant pathological mechanism of SDCF for the induction of renal damage involves the depletion of antioxidant defenses together with increased oxidative stress. Therefore, alternative pharmacological tools with antioxidant properties and no adverse reactions for renal tissue need to be validated to reduce the potential negative impacts of this condition. Data obtained from this study indicates HMC improves antioxidant status, as measured by total antioxidant capacity in blood and renal tissue, and GSH levels in the kidney. Reduced lipid peroxidation in kidney and blood was also observed after HMC treatment. The alleviation of SDCF-induced nephrotoxicity by HMC was not limited to redox state modulation since it also inhibited pro-inflammatory cytokines in blood and kidney and increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the kidney. These antioxidant and anti-inflammatory properties of HMC in the present model reduced the damage in renal tissue caused by SDCF with a contribution from the activation of the Nrf2/ARE redox-sensitive pathway and a reduction in Keap1. Thus, the present study supports clinical investigation of HMC as an effective therapeutic option for the treatment of SDCF-induced AKI.

Author Contributions: Conceptualization, W.A.V.J.; formal analysis, A.J.C.B., T.H.Z., T.S.-S., V.F., C.F.S.G., M.M.B., K.C.A., C.R.F., D.C.-N., A.M.B.C., R.C. and S.M.B.; funding acquisition, A.M.B.C., R.C. and W.A.V.J.; investigation, A.J.C.B., T.H.Z., T.S.-S., V.F., C.F.S.G., M.M.B., K.C.A., C.R.F. and S.M.B.; resources, D.C.-N., A.M.B.C. and R.C.; supervision, W.A.V.J.; validation, W.A.V.J.; writing—review & editing, S.M.B. and W.A.V.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, finance code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Grupos de Excelência (PRONEX) grant supported by Araucária Foundation, SETI (Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) and MCTI (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação)/CNPq; Paraná State Government (agreement 014/2017, protocol 46.843), and Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS) grant supported by Araucária Foundation, MCTI, and SESA-PR. S.M.B. acknowledges Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (FUNADESP) research fellowship. R.C. and W.A.V.J. acknowledge CNPq productivity research fellowships.

Institutional Review Board Statement: The animal protocol used in this study was approved (protocol code 15236.2015.73) by the Institutional Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Universidade Estadual de Londrina (UEL) and all animal experiments were carried out in accordance with the Brazilian Council on Animal Experimentation (CONCEA).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Borghi, S.M.; Fattori, V.; Ruiz-Miyazawa, K.W.; Bertozzi, M.M.; Lourenco-Gonzalez, Y.; Tatakihara, R.I.; Bussmann, A.J.C.; Mazzuco, T.L.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits mouse acute kidney injury induced by diclofenac by targeting oxidative damage, cytokines and NF-kappaB activity. *Life Sci.* **2018**, *208*, 221–231.
2. Zhang, X.; Donnan, P.T.; Bell, S.; Guthrie, B. Non-steroidal anti-inflammatory drug induced acute kidney injury in the community dwelling general population and people with chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol.* **2017**, *18*, 256.
3. Ungprasert, P.; Cheungpasitporn, W.; Crowson, C.S.; Matteson, E.L. Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur. J. Intern. Med.* **2015**, *26*, 285–291.
4. Ejaz, P.; Bhojani, K.; Joshi, V.R. NSAIDs and kidney. *J. Assoc. Physicians India* **2004**, *52*, 632–640.
5. Lucas, G.N.C.; Leitao, A.C.C.; Alencar, R.L.; Xavier, R.M.F.; Daher, E.F.; Silva Junior, G.B.D. Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Bras. Nefrol.* **2019**, *41*, 124–130.

6. McGettigan, P.; Henry, D. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: An examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLoS Med.* **2013**, *10*, e1001388.
7. Altman, R.; Bosch, B.; Brune, K.; Patrignani, P.; Young, C. Advances in NSAID development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs* **2015**, *75*, 859–877.
8. Emery, P.; Koncz, T.; Pan, S.; Lowry, S. Analgesic effectiveness of celecoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis of the hip requiring joint replacement surgery: A 12-week, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, double-dummy, noninferiority study. *Clin. Ther.* **2008**, *30*, 70–83.
9. Fattori, V.; Borghi, S.M.; Guazelli, C.F.; Giroldo, A.C.; Crespigio, J.; Bussmann, A.J.; Coelho-Silva, L.; Ludwig, N.G.; Mazzuco, T.L.; Casagrande, R.; et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF-kappaB activation in mice. *Pharmacol. Res.* **2017**, *120*, 10–22.
10. Dreiser, R.L.; Marty, M.; Ionescu, E.; Gold, M.; Liu, J.H. Relief of acute low back pain with diclofenac-K 12.5 mg tablets: A flexible dose, ibuprofen 200 mg and placebo-controlled clinical trial. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, *41*, 375–385.
11. Schmidt, M.; Sorensen, H.T.; Pedersen, L. Diclofenac use and cardiovascular risks: Series of nationwide cohort studies. *BMJ* **2018**, *362*, k3426.
12. Cheng, H.F.; Harris, R.C. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension* **2004**, *43*, 525–530.
13. Gan, T.J. Diclofenac: An update on its mechanism of action and safety profile. *Curr. Med. Res. Opin.* **2010**, *26*, 1715–1731.
14. Abiola, T.S.; Adebayo, O.C.; Babalola, O.O. Diclofenac-Induced Kidney Damage in Wistar Rats: Involvement of Antioxidant Mechanism. *J. Biosci. Med.* **2019**, *7*, 44–57.
15. Alkuraishy, H.M.; Al-Gareeb, A.I.; Hussien, N.R. Diclofenac-induced acute kidney injury is linked with oxidative stress and pro-inflammatory changes in sprague-dawley rats. *J. Contemp. Med. Sci.* **2019**, *5*, 140–144.
16. Hickey, E.J.; Rajee, R.R.; Reid, V.E.; Gross, S.M.; Ray, S.D. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 139–152.
17. Nizamutdinova, I.T.; Jeong, J.J.; Xu, G.H.; Lee, S.H.; Kang, S.S.; Kim, Y.S.; Chang, K.C.; Kim, H.J. Hesperidin, hesperidin methyl chalcone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, *8*, 670–678.
18. Ferraz, C.R.; Carvalho, T.T.; Manchope, M.F.; Artero, N.A.; Rasquel-Oliveira, F.S.; Fattori, V.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. *Molecules* **2020**, *25*, 762.
19. Pinho-Ribeiro, F.A.; Hohmann, M.S.; Borghi, S.M.; Zarpelon, A.C.; Guazelli, C.F.; Manchope, M.F.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-kappaB. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *228*, 88–99.
20. Chanal, J.L.; Cousse, H.; Sicart, M.T.; Bonnaud, B.; Marignan, R. Absorption and elimination of (14C) hesperidin methylchalcone in the rat. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1981**, *6*, 171–177.
21. Gastillo, J.; Benavente, O.; Borrego, F. Analysis of commercial hesperidin methylchalcone by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1991**, *555*, 285–290.
22. Rasquel-Oliveira, F.S.; Manchope, M.F.; Staurengo-Ferrari, L.; Ferraz, C.R.; Saraiva-Santos, T.; Zaninelli, T.H.; Fattori, V.; Artero, N.A.; Badaro-Garcia, S.; de Freitas, A.; et al. Hesperidin methyl chalcone interacts with NFkappaB Ser276 and inhibits zymosan-induced joint pain and inflammation, and RAW 264.7 macrophage activation. *Inflammopharmacology* **2020**, *28*, 979–992.
23. Martinez, R.M.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Steffen, V.S.; Caviglione, C.V.; Pala, D.; Baracat, M.M.; Georgetti, S.R.; Verri, W.A.; Casagrande, R. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 554–563.
24. Ruiz-Miyazawa, K.W.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Borghi, S.M.; Staurengo-Ferrari, L.; Fattori, V.; Amaral, F.A.; Teixeira, M.M.; Alves-Filho, J.C.; Cunha, T.M.; Cunha, F.Q.; et al. Hesperidin Methylchalcone Suppresses Experimental Gout Arthritis in Mice by Inhibiting NF-kappaB Activation. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 6269–6280.
25. Jawien, A.; Bouskela, E.; Allaert, F.A.; Nicolaidis, A.N. The place of Ruscus extract, hesperidin methyl chalcone, and vitamin C in the management of chronic venous disease. *Int. Angiol.* **2017**, *36*, 31–41.
26. Staurengo-Ferrari, L.; Badaro-Garcia, S.; Hohmann, M.S.N.; Manchope, M.F.; Zaninelli, T.H.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. Contribution of Nrf2 Modulation to the Mechanism of Action of Analgesic and Anti-inflammatory Drugs in Pre-clinical and Clinical Stages. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1536.
27. Raghunath, A.; Sundarraj, K.; Nagarajan, R.; Arfuso, F.; Bian, J.; Kumar, A.P.; Sethi, G.; Perumal, E. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* **2018**, *17*, 297–314.
28. Kakkos, S.K.; Bouskela, E.; Jawien, A.; Nicolaidis, A.N. New data on chronic venous disease: A new place for Cyclo 3(R) Fort. *Int. Angiol.* **2018**, *37*, 85–92.
29. Allaert, F.A.; Hugue, C.; Cazaubon, M.; Renaudin, J.M.; Clavel, T.; Escourrou, P. Correlation between improvement in functional signs and plethysmographic parameters during venoactive treatment (Cyclo 3 Fort). *Int. Angiol.* **2011**, *30*, 272–277.
30. Stoianova, V. Cyclo 3 fort—alternative in chronic venous insufficiency. *Akush. Ginekol. (Sofia)* **2006**, *45* (Suppl. 3), 78–80.
31. Beltramino, R.; Penenory, A.; Buceta, A.M. An open-label, randomized multicenter study comparing the efficacy and safety of Cyclo 3 Fort versus hydroxyethyl rutoside in chronic venous lymphatic insufficiency. *Angiology* **2000**, *51*, 535–544.

32. Kirtley, W.R.; Peck, F.B. Administration of massive doses of vitamin P hesperidin methyl chalcone. *Am. J. Med. Sci.* **1948**, *216*, 64–70.
33. Wood, R.C., 3rd; Wyatt, J.E.; Bullins, K.W.; Hanley, A.V.; Hanley, G.A.; Denham, J.W.; Panus, P.C.; Harirforoosh, S. Effects of rebamipide on nephrotoxicity associated with selected NSAIDs in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *720*, 138–146.
34. Borghi, S.M.; Domiciano, T.P.; Rasquel-Oliveira, F.S.; Ferraz, C.R.; Busmann, A.J.C.; Vignoli, J.A.; Camilios-Neto, D.; Ambrosio, S.R.; Arakawa, N.S.; Casagrande, R.; et al. *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski-derived kaurenoic acid prevents ovalbumin-induced asthma in mice: Effect on Th2 cytokines, STAT6/GATA-3 signaling, NFkappaB/Nrf2 redox sensitive pathways, and regulatory T cell phenotype markers. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *283*, 114708.
35. Davies, N.M.; Anderson, K.E. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *33*, 184–213.
36. Huo, X.; Meng, Q.; Wang, C.; Wu, J.; Wang, C.; Zhu, Y.; Ma, X.; Sun, H.; Liu, K. Protective effect of cilastatin against diclofenac-induced nephrotoxicity through interaction with diclofenac acyl glucuronide via organic anion transporters. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 1933–1948.
37. Sivaraaj, R.; Umarani, S. Diclofenac-induced biochemical changes in nephrotoxicity among male Albino rats. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* **2018**, *7*, 640–643.
38. Bickel, M.; Khaykin, P.; Stephan, C.; Schmidt, K.; Buettner, M.; Amann, K.; Lutz, T.; Gute, P.; Haberl, A.; Geiger, H.; et al. Acute kidney injury caused by tenofovir disoproxil fumarate and diclofenac co-administration. *HIV Med.* **2013**, *14*, 633–638.
39. Babladi, V.P.; Patil, N.; Manjunath, G.; Salimath, P.V.; Ninne, S.R.; Chary, K.M. A Case Report on Diclofenac Induced Chronic Kidney Disease. *Indian J. Pharm. Pract.* **2019**, *12*, 129–132.
40. Mohammad, R.S.; Lokhandwala, M.F.; Banday, A.A. Age-Related Mitochondrial Impairment and Renal Injury Is Ameliorated by Sulforaphane via Activation of Transcription Factor NRF2. *Antioxidants* **2022**, *11*, 156.
41. van der Heijden, R.A.; Bijzet, J.; Meijers, W.C.; Yakala, G.K.; Kleemann, R.; Nguyen, T.Q.; de Boer, R.A.; Schalkwijk, C.G.; Hazenberg, B.P.; Tietge, U.J.; et al. Obesity-induced chronic inflammation in high fat diet challenged C57BL/6J mice is associated with acceleration of age-dependent renal amyloidosis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16474.
42. Guazelli, C.F.S.; Fattori, V.; Ferraz, C.R.; Borghi, S.M.; Casagrande, R.; Baracat, M.M.; Verri, W.A., Jr. Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. *Chem. Biol. Interact.* **2021**, *333*, 109315.
43. Basile, D.P.; Anderson, M.D.; Sutton, T.A. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 1303–1353.
44. Edelstein, C.L. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **2008**, *15*, 222–234.
45. Devarajan, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* **2008**, *241*, 89–94.
46. Liu, F.; Yang, H.; Chen, H.; Zhang, M.; Ma, Q. High expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the kidney proximal tubules of diabetic rats. *Adv. Med. Sci.* **2015**, *60*, 133–138.
47. Kuwabara, T.; Mori, K.; Mukoyama, M.; Kasahara, M.; Yokoi, H.; Saito, Y.; Yoshioka, T.; Ogawa, Y.; Imamaki, H.; Kusakabe, T.; et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 285–294.
48. Abdou, R.M.; El-Maadawy, W.H.; Hassan, M.; El-Dine, R.S.; Aboushousha, T.; El-Tanbouly, N.D.; El-Sayed, A.M. Nephroprotective activity of Aframomum melegueta seeds extract against diclofenac-induced acute kidney injury: A mechanistic study. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *273*, 113939.
49. Lee, D.W.; Faubel, S.; Edelstein, C.L. Cytokines in acute kidney injury (AKI). *Clin. Nephrol.* **2011**, *76*, 165–173.
50. Kinsey, G.R.; Okusa, M.D. Role of leukocytes in the pathogenesis of acute kidney injury. *Crit. Care* **2012**, *16*, 214.
51. Naito, Y.; Takagi, T.; Higashimura, Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *564*, 83–88.
52. Ratliff, B.B.; Abdulmahdi, W.; Pawar, R.; Wolin, M.S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *25*, 119–146.
53. Sverrisson, K.; Axelsson, J.; Rippe, A.; Asgeirsson, D.; Rippe, B. Acute reactive oxygen species (ROS)-dependent effects of IL-1beta, TNF-alpha, and IL-6 on the glomerular filtration barrier (GFB) in vivo. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2015**, *309*, F800–F806.
54. Martinez, R.M.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Steffen, V.S.; Cavaglione, C.V.; Vignoli, J.A.; Baracat, M.M.; Georgetti, S.R.; Verri, W.A., Jr.; Casagrande, R. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *148*, 145–153.
55. Suh, J.H.; Shenvi, S.V.; Dixon, B.M.; Liu, H.; Jaiswal, A.K.; Liu, R.M.; Hagen, T.M. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3381–3386.
56. Hohmann, M.S.; Zaninelli, T.H.; Staurengo-Ferrari, L.; Manchope, M.F.; Badaro-Garcia, S.; de Freitas, A.; Casagrande, R.; Verri, W.A.J. In *Nrf2 and Its Modulation in Inflammation*; Deng, H., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2020; pp. 23–50.
57. Rockwell, C.E.; Zhang, M.; Fields, P.E.; Klaassen, C.D. Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4(+) T cells. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 1630–1637.

5. Conclusão

É possível concluir que a necessidade de pesquisas com novos compostos que possam ser empregados na prática clínica para o tratamento de condições inflamatórias crônicas é de grande relevância, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes e a segurança dos tratamentos.

A naringenina, testada em modelo de artrite reumatoide induzida por zimosan, demonstrou capacidade de inibir a cascata inflamatória, ação analgésica e promoveu proteção morfológica da articulação, desta maneira se habilita como opção ao tratamento de dor e inflamação induzidos por artrite reumatoide.

O HMC, que teve sua ação pesquisada em modelo de lesão renal aguda induzida por diclofenaco de sódio, apresentou potencial de proteção renal contra as alterações induzidas pelo diclofenaco, também se apresentou como opção protetiva para pacientes que necessitam fazer uso do diclofenaco por longos períodos ou doses elevadas.

Novas pesquisas são recomendadas para reforçar os achados e ampliar os dados referentes ao potencial da naringenina e da HCM, em modelos similares aos utilizados em nosso estudo e em novos delineamentos.

6. Referências Bibliográficas

ABBAS, A; FAUSTO, N; KUMAR, V. Robbins – Patologia Básica. 10º Ed. Elsevier. 2018.

AMAMURA, T.A. Clivagem de Proteínas do Complexo de Ataque à Membrana do Sistema de Complemento Humano por Proteases de Leptospiras Patogênicas. Dissertação.USP. São Paulo. 2016.

BAKER, M; PERAZELLA, M.A. NSAIDs in CKD: Are they safe? American Journal Kidney Disease, v.76, n. 4, p. 546-557, 2020.

BECHARA, G.H; SZABÓ, M.P.J. Processo Inflamatório. Alterações vasculares e mediação química. 2009. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf> Acesso em 15/04/2020

BECKER, P.F.L. Patologia Geral. São Paulo, Editora Sarvier. 1997.

BELLOMO, R; KELLUM, J.A; RONCO, C. Acute kidney injury. Lancet, v. 380, p. 756-766, 2012.

BORGHI, S.M; FATTORI, V; RUIZ-MIYAZAWA, K.W; BERTOZZI, M.M; LOURENÇO-GONZALEZ, Y; TATAKIHARA, R.I; BUSSMANN, A.J.C; MAZZUCO, T.L; CASAGRANDE, R; VERRI JR, W.A. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits mouse acute kidney injury induced by diclofenac by targeting oxidative damage, cytokines and NF-kB activity. Life Sciences, v.208, p. 221-231, 2018.

BUSSMANN, A.J.C; BORGHI, S.M; ZANINELLI, T.H; SANTOS, T.S; GUAZELLI, C.F.S; FATTORI, V; DOMICIANO, T.P; PINHO-RIBEIRO, F.A; RUIZ-MIYAZAWA, K.W; CASELLA, A.M.B; VIGNOLI, J.A; CAMILOS-NETO, D; CASAGRANDE, R; VERRI JR, W.A. The citrus

flavanone naringenin attenuates zymosan-induced mouse joint inflammation: Induction of Nrf2 expression in recruited CD45⁺ hematopoietic cells. *Inflammopharmacology*, 2018 Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/330169845_The_citrus_flavanone_naringenin_attenuates_zymosaninduced_mouse_joint_inflammation_induction_of_Nrf2_expression_in_recruited_CD45_hematopoietic_cells/link/5ef44cb9299bf15a2ea09508/download> Acesso em 15/04/2020

CAMPOS, D.L; PONTES, L.F; TORRES, F; SILVA, J.N; TERRA JUNIOR, A.T. Uma abordagem sobre a inter-relação de citocinas na artrite reumatoide. *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente*, v.7, n.1, p. 93-102, 2016.

CARVALHO, W.A; CARVALHO, R.D.S; RIOS-SANTOS, F. Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: Therapeutic advances. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. n.54, v.3; p.448-464, 2004.

CONTE F. P, BARJA-FIDALGO C, VERRI, W.A Jr, CUNHA, F.Q, ERA, G.A, PENIDO, C, HENRIQUES, M . Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. *J Leukoc Biol* 84:652–660.2008

COSTA, J.A.C; VIEIRA-NETO; O.M; NETO, M.M. Insuficiência Renal Aguda. *Medicina, Ribeirão Preto*. n. 36; p. 307-324, 2003.

COTRAN, R.S; KUMAR, V; COLLINS, T. Robbins pathologic basis of disease. 10 ed. Elsevier. 2020.

COUTINHO, M.A.S; MUZITANO, M.F; COSTA, S.N. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*. n.1, v.3, p. 241-256, 2009.

CROSS, M; SMITH, E; HOY, D; et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. v. 73 p.1316–1322; 2014

DANGELO, Jose Geraldo; FATTINI, Carlos Américo. Anatomia humana sistêmica e segmentar: para o estudante de medicina. 2ªEd. Editora Atheneu. São Paulo, Sp.2002

DELVES, P.J. Sistema Complemento. Manual MSD.Jan. 2017. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/imunologia-dist%C3%BArbios-al%C3%A9rgicos/biologia-do-sistema-imunit%C3%A1rio/sistema-complemento>> Acesso: 02/02/2020.

DINTZIS, R,Z; HANSEL, D.E. Fundamentos de Rubin – Patologia. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2007.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. British Journal of Anaesthesia v.75; p.125–131; 1995.

FARAH, F. Estudo sobre as respostas inflamatórias em modelo experimental de artrite séptica induzida por Staphilococcus aureus e suas vesículas extracelulares. Dissertação. USP. 2018.

FATTORI, V; BORGHI, S.M; GUAZELLI, C.F.S; ANDRESSA, C.G; CRESPIGIO, J; BUSSMANN, A.J.C; COELHO-SILVA, L; LUDWIG, N.G; MAZZUCO, T.L; CASAGRANDE, R; VERRI JR, W.A. Vinpocentine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF-κB activation in mice. Pharmacology Research, v.120, p. 10-22, 2017.

FATTORI, V; RASQUEL, F.S; ARTERO, N.A; FERRAZ, C.R; BORGHI, S; CASAGRANDE, R; VERRI JR, W.A. Diosmin treats lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and peritonitis by blocking NF-κB activation in mice. Journal of Natural Products, v.83, p. 1018-1026, 2020.

FERRAZ, C.R; CARVALHO, T.T; MANCHOPE, M.F; ARTERO, N.A; RASQUEL-OLIVEIRA, F.S; FATTORI, V; CASAGRANDE, R; VERRI JR, W.A. Therapeutic potential of flavonoids in pain and

inflammation: Mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. *Molecules*, v.25, n. 762, p. 1-35, 2020.

FILHO, G.B. Bogliolo – Patologia Geral. 6º Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Kooga. 2018.

FRANÇA, S.C.O. Artrite reumatoide: Terapêutica atual e perspectivas. Dissertação Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 2018.

FRANCISCHETTI, I; MORENO, J.B; SCHOLZ, M; YOSHIDA, W.B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia – reperfusão. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v.25, n.4, p. 575-584; 2010.

GALESIC, K; LJUBANOVIC, S; BULINBASIC, S; RACIC, I. Minimal change disease and acute tubular necrosis caused by diclofenaco. *Nephology*; v.13; n.1; p. 87-88. 2008.

GUERRERO, A.T et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav* 84:244–251; 2006

HALL, J. E. Fundamentos de Gayton e Hall fisiologia. Saunders Elsevier, Rio de Janeiro, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Em 2019, expectativa de vida era de 76,6 anos. Disponível em <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29502-em-2019-expectativa-de-vida-era-de-76-6-anos>> 2020.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.; RÊGO, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B; FERREIRA, M.C. - Processo de Cura das Feridas: Cicatrização Fisiológica. *Revista de Medicina (São Paulo)*; 89(3/4):125-31, jul-dez 2010

ITURRY-YAMAMOTO, G.R; PORTINHO, C.P. Sistema de Complemento: Ativação e Deficiências Congênitas e Adquiridas. Revista da Associação Médica Brasileira. n. 47; v.1; p. 41-51. 2001.

JEONG, L.C; CHOI, Y; HYUN, B; OH, G. Anti-Atherogenic Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, Associated with Hepatic ACAT and Aortic VCAM-1 and MCP-1 in High Cholesterol-Fed Rabbits. Biochemical and Biophysical Research Communications, v; 284; n. 3; p. 681-688; 2001.

JI, R.H; CHAMESSIAN, A; ZHANG, Y.Q. Pain regulation by non-neural cells and inflammation. Pain Research. v. 354; n. 6312; p. 572-577; 2016.

KLEIN, C.P. Atividade de Mediadores Lipídicos Derivados de Ácidos Graxos Poli- Insaturados sobre Alterações Comportamentais e Bioquímicas em um Modelo de Fibromialgia em Camundongos. Dissertação. PUC-RS. Porto Alegre. 2014.

KUMAR; S, PANDEY ;A.K . Chemistry and biological activities of favonoids: an overview. Scientific World Journal, 2013. Disponível em <<https://doi.org/10.1155/2013/162750>>

LENT, R. Cem bilhões de neurônios ? Conceitos fundamentais de neurociências. 2º Ed. Editora Atheneu. 2010.

LOPES, F. Estudo da resposta Inflamatória na artrite induzida por antígeno e o papel dos mediadores endógenos na sua resolução: importância das espécies reativas de oxigênio. Tese. UFMG. Belo Horizonte. 2013

LOURENÇO-GONZALEZ, Y; FATTORI, V; DOMICIANO, T.P; ROSSANEIS, A.C; BORGHI, S.M; ZANINELLI, T.H; BERNARDY, C.C.F; ALVES-FILHO, J.C; CUNHA, T.M; CUNHA, F.Q;

CASAGRANDE, R; VERRI JR, W.A. Repurposing of nootropic drug vinpocetine as an analgesic and anti-inflammatory agent: Evidence in mouse model of superoxide anion-triggered inflammation. *Hindawi Mediators of Inflammation*. v. 2019; p. 1-14; 2019.

LUCAS, G.N.C; LEITÃO, A.C.C; ALENCAR, R.L; XAVIER, R.M.F; DAHER, E.D.F; SILVA JUNIOR, G.B. Aspectos fisiopatológicos da nefropatia por anti-inflamatórios não esteroidais. *Brazilian Journal of Nephrology*, v.41, n. 1, p. 124-130, 2019.

MACEDO, S.D. Estudo dos mecanismos de ação da hidroquinona e fenol sobre o recrutamento leucocitário em respostas inflamatórias. Tese USP. 2008

MANCHOPE, M.F; CALIXTO-CAMPOS, C; COELHO-SILVA, L; et al. Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain: role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP channel signaling pathway. *PLoS ONE*; v. 11; n.4. disponível em <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153015>> 2016.

MOORE, K.L; DALLEY, A; AGUR, AM.R. Anatomia orientada para clínica. 8^o ed. Guanabara Koogan, 2019.

MOTA, L.M.H; CRUZ, B.A; BRENOL, C.V; PEREIRA, I.A; et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento de artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.52; n.2; p. 135-174, 2012.

MOTA, L.M.H; CRUZ, B.A; BRENOL, C.V; PEREIRA, I.A; et al. Diretrizes para o diagnóstico de artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.52; n. 2; p. 141-157; 2013.

MOTA, L.M.H; KAKEHASI, A.M; GOMIDES, A.P.M; et al. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. *Advances in Rheumatology*; v.58;n.2; 2018.

OLIVEIRA JUNIOR, J.O; PORTELA JUNIOR, C.S.A; COHEN, C.P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. Revista de Dor. Suplemento p. 35-45, 2017.

OLIVEIRA, M.M.C; SILVA, M.M.; MOREIRA, T.L.M; COUTO, V.F; COELHO, Y.N; NUNES, C.P. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. Revista Caderno de Medicina; v.2; n.2; p. 90-100; 2019.

PALASTANGA, Nigel; FIELD, Derek; SOAMES, Roger. Anatomia e Movimento Humano - Estrutura e Função. 3º Edição. Editora Manole LTDA. São Paulo, SP. 2000.

PAZHAYATTIL, G.S; SHIRALI, A.C. Drug-induced impairment of renal function. International Journal of Nephrology and Renovascular Disease, v.7; p. 457-468, 2014.

PHADKE, V. et al. Maternal ingestion of diclofenac leading to renal failure in newborns. **Pediatr Nephrol**, v. 27, n. 6, p. 1033-6, Jun 2012.

PINHO-RIBEIRO, F.A; HOHMANN, M.S.N; BORGHI, S.M; ZARPELON, A.C; GUAZELLI, C.F.S; MANCHOPE, M.F; CASAGRANDE, R; VERRI JR, W.A. Prorective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-kB. Chemico-Biological interactions, v.228, p. 88-99, 2015.

PINHO-RIBEIRO, F,F; VERRI, W.A.Jr; CHIU, I,M. Nocioceptor sensory neuron-immune interactions in pains and inflammation. Trends in Immunology; v.38; n.01; p.5-19; 2017.

POLUNHA, R.L; GROSSMANN, E. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. Brazilina Journal of Pain. p. 60-65, v. 1, jan-mar 2018.

QUINTANS, J.S.S; SHANMUGAM, L.H; HEIMFARTH, L; ARAÚJO, A.A.S; ALMEIDA, J.R.G.S; PICOT, L; QUINTANS-JUNIOR, L. Monoterpenes modulation cytokines – A review. Food and Chemical Toxicology, Elsevier, v. 123, p. 233-257, 2019.

RANG, H.P; RITTER, J.M; FLOWER, R.J; HENDERSON, G. Rang e Dale farmacologia. Elsevier. 8º ed. 2016.

RUBIN, E; GORSTEIN, F; RUBIN, R; SCHWARTING, R; STRAYER, D. Rubin Patologia – Bases clinicopatológicas da medicina. Guanabara Koogan, 4ed. 2006.

RUIZ-MIYAZAWA, K; BORGHI, S.M; PINHO-RIBEIRO, F.A; et al. The citrus flavanone naringenin reduces gout-induced joint pain and inflammation in mice by inhibiting the activation of NFκB and macrophage release of IL-1β. Journal Functional Foods; v. 48; p.106–116; 2018.

SANTOS, S.A. Terapia de fotobiomodulação associada ao exercício físico no estresse oxidativo em modelo experimental de artrite reumatoide induzida por colágeno. Dissertação Uninove, 2016.

SARMENTO, A.S.C. Alterações na homeostase redox e do reticulo endoplasmático: Mecanismos associados à lipodistrofia generalizada congênita tipo 2. Dissertação UFRN. Natal, 2019.

SCHLOTTFELD, F.S. Efeito protetor da diosmina e hesperidina na nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B. Dissertação USP. 2014.

SCHNORNBERGER, C.M; JORGE, M.S.G; WIBELINGER, L.M. Physiotherapeutic intervention in pain and quality of life of women with rheumatoid arthritis. Case reports. Revista de Dor de São Paulo, v. 18, n.4, p. 365-369, 2017.

SILVA, J.V.F; SILVA, E.C; RODRIGUES, A.P.R.A; MIYAZAWA, A.P. A relação entre o envelhecimento populacional e as doenças crônicas não transmissíveis: sério desafio de saúde pública. Cadernos de Graduação Ciências Biológicas e da Saúde; v.2; n.3; p. 91-100. 2015.

STAURENGO-FERRARI, L; BADARO-GARCIA, S ;. HOHMANN, M S. N; MANCHOPE, M. F; ZANINELLI, T.H; CASAGRANDE, R; Verri Jr, W.A. Contribution of Nrf2 Modulation to the

Mechanism of Action of Analgesic and Anti-inflammatory Drugs in Pre-clinical and Clinical Stages. *Frontiers in Pharmacology*, v.9; p. 1-25; 2019.

ULBRICH, A.G. Estudo de um Caso de Deficiência do Componente C3 do Sistema de Complemento Humano. Dissertação.USP. São Paulo. 1999.

UNGERER, G; CUI, J; NDAM, T; BEKEMEIER, M; SONG, H; LI, R; SIEDHOFF, H.R; YANG, B; APPENTENG, M.K; GREENLIEF, C.M; MILLER, D.K; SUN, G.Y; FOLK, W.R; GU, Z. *Harpagophytum procumbens* Extract ameliorates allodynia and modulates oxidative and antioxidante stress pathways in rat modelo f spinal cord injury. *Neuromolecular Medicine*, v. 22; p. 278-292; 2019.

UNGPRASERT, P; CHEUNGASITPORN,W; CROWSON, C.S; MATTESON, E.L. Individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis of observational studies, *European Journal of Internal Medicine*; v.26; n. 4; p. 285–291; 2015

WARWICK, Roger; WILLIAMS, Peter L. Gray anatomia. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 1995

WEHLING, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs use in chronic pain conditions whith special ephasis on the elderly and patients with relevant comorbidities: management and mitigation of risks and adverse effects. *Europian Journal of Clinical Phamacology*, v.70, p. 1159-1172, 2014.

VERRI, W,A,JR; CUNHA, T,M; PARADA, C,A; POOLE, S. CUNHA, F.Q; FERREIRA, S,H. Hypernocioceptive role of citokynes and chemokines: Targetes for analgesic drug development? *Pharmacology and Therapeutics*, v.112; p. 116-138; 2006.

WHALEN, K; FINKEL, R; PANAVELIL, T.A. Farmacologia ilustrada. Artmed. 6ºed. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World health statistics overview 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva; 2019.

WOOLEY, P.H. Immunogenetics of animal models of rheumatoid arthritis. In: Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis. Academic Press Ltd. P. 373- 387; 1995.

Anexos

Anexo A

Aprovações comitê de ética de pesquisa em animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 153/2014

Londrina, 30 de Setembro de 2014

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UUEL reunida em 16 de Setembro de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito terapêutico da naringenina em modelo de artrite induzida por zymosan em camundongos", registrado sob o processo CEUA nº17427.2014.65, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos, postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, estão respeitados.

Serão utilizados 204 camundongos Swiss machos, com peso aproximado de 20-25g, provenientes do Biotério Central-UUEL. O projeto tem como objetivo avaliar o potencial terapêutico da naringenina em modelo de artrite induzida por zymosan em camundongos. Para isso, será: a) determinada a dose efetiva de naringenina por meio de curva dose-resposta para o efeito analgésico após a indução da artrite por zymosan; b) avaliar a eficácia do tratamento com naringenina sobre o recrutamento de leucócitos e lesões histológicas da articulação fêmur-tibial na artrite induzida por zymosan; c) avaliar a capacidade antioxidante da naringenina por meio dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e da formação de grânulos de formazan por reação com NBT na artrite induzida por zymosan; d) Avaliar a eficácia do tratamento com naringenina na modulação e produção de citocinas, ativação do fator de transcrição NF- κ B, e expressão de RNAm para prepro-ET-1, Nrf-2 e gp91fox na artrite induzida por zymosan. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 36 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de pesquisa aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dr. José Waine Pinheiro
Vice-coordenador da CEUA/UUEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central do CCB) e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 205/2015

Londrina, 08 de Outubro de 2015.

Prezado Pesquisador,


Certificamos que o projeto intitulado "Participação do NF- κ B na lesão renal induzida por diclofenaco: papel do PDTC, ácido vanílico e probucol", protocolo CEUA nº 15236.2015.73, sob a responsabilidade de Waldiceu Aparecido Verri Júnior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL), em reunião realizada em **22/09/2015**.

O projeto tem como objetivo investigar o efeito do tratamento com PDCT, ácido vanílico e probucol em modelo de lesão renal induzido por diclofenaco. Para isso haverá administração de diclofenaco como estímulo indutor de lesão renal e os tratamentos com PDTC, ácido vanílico ou probucol. Serão realizadas análises dos níveis séricos de uréia e creatinina. Nos rins serão avaliados: lesão renal por histologia, atividades das enzimas MPO e NAG, produção de citocinas, ativação do fator de transcrição NF κ B por ELISA e imunohistoquímica, estresse oxidativo e inflamassoma por PCR. Os animais serão eutanasiados por inalação de isoflurano seguido de decapitação para coleta de amostras.

Vigência do Projeto	01/10/2015 a 01/10/2018
Espécie/linhagem	Camundongo heterogêneo / Swiss
Nº de animais	372
Peso/Idade	20-25g / 2 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Rins e sangue

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,



Prof. Dr. João Waine Pinheiro
Vice-Coordenador da CEUA/UUEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para André Junior da Conceição (Chefe da DP-IC/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

Anexo B

Produção de artigo adicional sem vínculo com o projeto de doutoramento, intitulado: Association between IL-10 systemic and highest pain score in patients during symptomatic SARS-CoV-2 infection publicado pelo periódico Pain & Practice.