



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (UFMG)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - FISILOGIA
E FARMACOLOGIA

THIAGO DE PAULA SILVA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS VASCULARES E RENAIIS INDUZIDOS PELO
DIQUAT *IN VIVO*: potencial efeito vasculo protetor de nanopartículas de ouro

BELO HORIZONTE - MG

2025

THIAGO DE PAULA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS VASCULARES E RENAIIS INDUZIDOS PELO
DIQUAT *IN VIVO*: potencial efeito vasculo protetor de nanopartículas de ouro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Dr. Luciano Dos Santos Aggum Capettini

BELO HORIZONTE - MG

2025

043

Silva, Thiago de Paula.

Avaliação dos efeitos vasculares e renais induzidos pelo Diquat in vivo: potencial efeito vasculo protetor de nanopartículas de ouro [manuscrito] / Thiago de Paula Silva. – 2025.

63 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Diquat. 3. Estresse Oxidativo. 4. Nanopartículas Metálicas. 5. Óxido Nítrico Sintase. 6. Insuficiência Renal. I. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS VASCULARES E RENAIS INDUZIDOS PELO
DIQUAT IN VIVO:
POTENCIAL EFEITO VASCULO PROTETOR DE NANOPARTÍCULAS DE OURO"**

**ESTUDANTE: THIAGO DE PAULA SILVA
ORIENTADOR: LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **23 de julho de 2025**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. DIOGO DE BARROS PERUCHETTI - ICB/UFMG

PROFA. DRA. MARIA DA GLÓRIA RODRIGUES MACHADO - FCMMG/MG

PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI – ORIENTADOR - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 23 de julho de 2025



Documento assinado eletronicamente por **Diogo de Barros Peruchetti, Professor do Magistério Superior**, em 20/08/2025, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria da Glória Rodrigues Machado, Usuário Externo**, em 05/09/2025, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2025, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 609 DE THIAGO DE PAULA SILVA

Às 09:00 horas do dia 23 do mês de julho de 2025, na Sala Wilson Beraldo - Bloco A4 175, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Thiago de Paula Silva**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, ICB/UFMG, **Prof. Dr. Diogo de Barros Peruchetti**, ICB/UFMG e a **Profa. Dra. Maria da Glória Rodrigues Machado**, FCMMG/MG. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS VASCULARES E RENAIIS INDUZIDOS PELO DIQUAT IN VIVO: POTENCIAL EFEITO VASCULO PROTETOR DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 23 de julho de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Diogo de Barros Peruchetti, Professor do Magistério Superior**, em 20/08/2025, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria da Glória Rodrigues Machado, Usuário Externo**, em 05/09/2025, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2025, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4432742** e o código CRC **8434C41E**.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por todas as graças derramadas até o presente momento. Nos momentos em que duvidei da minha capacidade, Ele me mostrou que eu poderia ir além dos meus próprios sonhos, especialmente em relação a este mestrado, que parecia um objetivo tão distante. Durante essa trajetória, muitas dúvidas e incertezas me acompanharam, mas Deus foi sempre o meu amparo e refúgio.

Agradeço à Nossa Senhora, que nunca me desamparou e me acolheu em Seu colo de Mãe todas as vezes que precisei do Teu aconchego e da Tua fiel intercessão.

À minha família, minha esposa Gabriella e minha mãe Jucelma, agradeço por todo o amor e compreensão, sendo meu maior apoio e as minhas maiores incentivadoras na busca pelos meus sonhos e objetivos. Vocês sempre foram minha maior motivação e me deram forças durante toda essa jornada. Obrigado por toda a paciência nos momentos em que precisei me ausentar para que este sonho se tornasse realidade e por todo o amor e carinho que, infelizmente, nem sempre pude retribuir como gostaria.

À minha mãe, minha eterna gratidão. Obrigado por sempre me incentivar a buscar mais. Você é um exemplo de mulher, que, mesmo com tão pouco, conseguiu vencer todos os obstáculos e me educar com garra e dedicação. Sua força como mãe solo nunca a abalou, e você se tornou minha maior inspiração.

Ao meu orientador, professor Luciano Capettini, obrigado por estar sempre ao meu lado, encorajando e acolhendo-me desde os primeiros passos no laboratório, quando ainda era apenas um aluno de iniciação científica, sem conhecimento prévio, e você me guiou pacientemente, como uma criança nos seus primeiros passos. Sua dedicação e apoio foram fundamentais para o meu crescimento como pesquisador. Muito obrigado!

Agradeço a Deus por ter colocado a Raquel em meu caminho, que se tornou muito mais do que uma colega de pesquisa; tornou-se uma irmã, sempre ao meu lado, independentemente do horário ou da situação. Obrigado por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu duvidava, e por ter sido fundamental para que eu conseguisse ingressar no mestrado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Aos meus colegas de laboratório, Thaís, Enes, Melissa e Olga, obrigado por me acolherem desde o início e por contribuírem, de alguma forma, para o meu crescimento como pesquisador e no desenvolvimento do meu projeto.

À equipe da Secretaria, em especial ao Alexander, por todo o suporte e orientação, sempre com atenção, dedicação e amizade.

Ao coordenador do programa, Raphael, e à vice coordenadora, Luciene, agradeço por não medirem esforços para garantir que tivéssemos acesso aos equipamentos essenciais para a realização das técnicas utilizadas no trabalho. Seu apoio foi imprescindível.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia, pela oportunidade e confiança depositadas em mim. Também agradeço às agências de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Resumo

Os pesticidas, amplamente utilizados na agricultura, apresentam potencial tóxico significativo, impactando diversos sistemas biológicos e ecológicos. Entre eles, o Diquat, um herbicida bipyridílico, destaca-se pela capacidade de induzir estresse oxidativo, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e danos em múltiplos órgãos, como rins e sistema vascular. No entanto, os mecanismos precisos de sua toxicidade, especialmente em modelos *in vivo*, permanecem pouco caracterizados. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do Diquat sobre a reatividade vascular e parâmetros de função renal em camundongos, bem como avaliar o potencial protetor das nanopartículas de ouro (GNPs) frente ao estresse oxidativo vascular.

Animais C57BL/6J foram tratados com 20 mg/kg de diquat e foram monitorados por até 5 dias em gaiola metabólica. Para alguns experimentos, os animais também foram tratados com diferentes doses de GNP (0.19; 0.39; 1.97 ou 3.94 mg/kg). Após os tempos estabelecidos os animais foram eutanasiados e sangue, urina, rins e aorta foram coletados. Para análise de função renal foram analisados o volume e fluxo urinário, creatinina, ureia, proteínas totais e γ -GT. Foram analisados no sangue as concentrações de creatinina e ureia, além do número total e diferencial de leucócitos. A função vascular foi avaliada em aorta por sistema de banho de órgãos isolados. Foram avaliadas as respostas relaxantes e contrateis, nas aortas de animais tratados ou não com diferentes doses de GNP. Nos segmentos de aorta também foram avaliados a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO por microscopia de fluorescência.

O tratamento com o diquat levou a um quadro de insuficiência renal aguda de padrão oligúrico, evidenciado por redução do fluxo urinário, aumento de creatinina e da ureia plasmática e queda na taxa de filtração glomerular (TFG). A presença de proteinúria desproporcional, alterações no marcador urinário UP/Cr e elevação inicial de γ -GT reforçam o comprometimento glomerular e tubular, corroborado por dados histológicos que evidenciaram necrose tubular, edema intersticial e lesão glomerular com escore histopatológico elevado. Foi observado ainda um perfil de inflamação sistêmica com leucopenia e alterações nas populações celulares circulantes de leucócitos como redução de polimorfonucleares e aumento de monócitos após

exposição ao Diquat. No contexto vascular, os animais apresentaram disfunção endotelial dependente do tempo de exposição (redução do relaxamento após 3 dias e potencialização do relaxamento após 5 dias). Houve ainda disfunção contrátil marcada por hiporresponsividade à fenilefrina em todos os tempos avaliados. Esses achados estão associados à elevação significativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção compensatória de óxido nítrico (NO) após 3 e 24h de exposição. O tratamento dos animais com 0.19 mg/kg de GNP restaurou parcialmente o padrão de contração induzida por fenilefrina, reduziu os níveis de ROS mas não reverteu o aumento de NO induzidos pelo diquat.

Conclui-se que o Diquat induz uma síndrome tóxica sistêmica, caracterizada por insuficiência renal aguda e disfunção vascular associada ao estresse oxidativo. As GNP foram capazes de reverter parcialmente a hiporresponsividade contrátil provavelmente relacionado a seu efeito antioxidante com redução dos níveis de ROS.

Palavras-Chave: Diquat, Estresse Oxidativo Vascular, Nanopartículas de Ouro, Disfunção Endotelial, Óxido Nítrico Sintase, insuficiência renal aguda.

Abstract

Pesticides, widely used in agriculture, have significant toxic potential, impacting various biological and ecological systems. Among them, Diquat, a bipyridyl herbicide, stands out for its ability to induce oxidative stress, promoting the generation of reactive oxygen species (ROS) and damage to multiple organs, such as the kidneys and vascular system. However, the precise mechanisms of its toxicity, especially in in vivo models, remain poorly characterized. This study aimed to investigate the effects of Diquat on vascular reactivity and renal function parameters in mice, as well as to evaluate the protective potential of gold nanoparticles (GNPs) against vascular oxidative stress.

C57BL/6J mice were treated with 20 mg/kg diquat and monitored for up to 5 days in a metabolic cage. For some experiments, the animals were also treated with different doses of GNP (0.19, 0.39, 1.97, or 3.94 mg/kg). After the established times, the animals were euthanized, and blood, urine, kidneys, and aorta were collected. Renal function was analyzed by analyzing urinary volume and flow, creatinine, urea, total protein, and γ -GT. Creatinine and urea concentrations, as well as total and differential leukocyte counts, were analyzed in the blood. Vascular function was assessed in the aorta using an isolated organ bath system. Relaxant and contractile responses were evaluated in the aortas of animals treated or not with different doses of GNP. The production of reactive oxygen species (ROS) and NO in the aortic segments was also evaluated by fluorescence microscopy.

Treatment with diquat led to oliguric acute renal failure, evidenced by reduced urinary flow, increased creatinine and plasma urea nitrogen (BUN), and a decrease in glomerular filtration rate (GFR). The presence of disproportionate proteinuria, changes in the urinary marker UP/Cr, and an initial elevation of γ -GT reinforce the glomerular and tubular involvement, corroborated by histological data that showed tubular necrosis, interstitial edema, and glomerular injury with a high histopathological score. A systemic inflammatory profile with leukopenia and changes in circulating leukocyte cell populations, such as a reduction in polymorphonuclear cells and an increase in monocytes, were also observed after exposure to diquat. In the vascular context, the animals presented endothelial dysfunction dependent on the exposure time (reduced relaxation after 3 days and increased relaxation after 5 days). Contractile dysfunction marked by hyporesponsiveness to phenylephrine was also observed at all time points

evaluated. These findings are associated with a significant elevation of reactive oxygen species (ROS) and compensatory nitric oxide (NO) production after 3 and 24 h of exposure. Treatment of the animals with 0.19 mg/kg GNP partially restored the phenylephrine-induced contraction pattern, reduced ROS levels, but did not reverse the diquat-induced increase in NO.

It is concluded that diquat induces a systemic toxic syndrome characterized by acute renal failure and vascular dysfunction associated with oxidative stress. GNPs were able to partially reverse contractile hyporesponsiveness, likely related to their antioxidant effect, which reduces ROS levels.

Keywords: Diquat, Vascular Oxidative Stress, Gold Nanoparticles, Endothelial Dysfunction, Nitric Oxide Synthase, Acute Renal Failure.

Lista de figuras

- Figura 1** - Estrutura química do Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium). O composto é formado por dois anéis bipyridílicos conectados por uma ponte etilênica, conferindo propriedades anfipáticas que permitem sua interação com membranas celulares e sua atividade herbicida. Essa estrutura facilita a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio de ciclos redox, resultando em estresse oxidativo. Fonte: Magalhães et al., 2018. 20
- Figura 2** - A linha do tempo apresenta as principais etapas do protocolo experimental, incluindo o período de estabilização, seguido pelo teste de integridade endotelial. Após a estabilização, realiza-se uma primeira curva dose-resposta utilizando Fenilefrina (Pe), seguida por uma segunda curva dose-resposta com Acetilcolina (ACh). A figura visa resumir de forma clara e objetiva os principais eventos e tempos experimentais ao longo do protocolo. 28
- Figura 3** - Distribuição de tamanho das partículas por intensidade, determinada por análise no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido). O gráfico apresenta dois picos principais: um em torno de 5 nm e outro, predominante em 35 nm, indicando a presença de populações distintas de partículas, sendo a maior parte da amostra composta por nanopartículas com diâmetro médio de aproximadamente 35 nanômetros. 30
- Figura 4** - A curva de Kaplan-Meier representa a probabilidade de sobrevivência ao longo de 120 horas após a administração intraperitoneal de Diquat (linha azul) em comparação com o grupo controle (linha preta). A dose de 20 mg/kg foi selecionada com base em testes-piloto, por permitir a indução de lesão mensurável com manutenção de sobrevivência em parte dos animais durante o período experimental. 32
- Figura 5** - Ingestão de água (mL) diária em camundongos tratados com Diquat em comparação com o grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados para consumo de água. Os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças significativas em todos os dias do experimento ($****p < 0,0001$), conforme indicado pelos asteriscos em cada ponto temporal. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado. 33

Figura 6 Consumo de ração (g) por camundongos tratados com DQ (Diquat, n=24) comparado ao grupo controle (CTRL, n=9) ao longo de cinco dias após a administração. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com diferenças significativas em todos os dias do experimento, com significância indicada como: **** $p < 0,0001$. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado..... 34

Figura 7 - Fluxo urinário diário (ml/min) em camundongos tratados com Diquat em comparação ao grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados para avaliação do fluxo urinário. Os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças significativas ao longo dos dias (**** $p < 0,0381$), representando a significância geral dos gráficos. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado. ... 34

Figura 8 - Delta do balanço hídrico (ml) em camundongos tratados com Diquat (DQ) comparado ao grupo controle (CTRL), calculado como a diferença entre ingestão de água e volume urinário ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n = 9) e o grupo Diquat (n = 24) foram monitorados diariamente. Os dados estão expressos como $\text{média} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos em todos os dias analisados (**** $p < 0,0001$). . A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado..... 35

Figura 9 - Fração de excreção de H_2O (%), medida em camundongos tratados com Diquat (n=9) em comparação com o grupo controle (n=5) ao longo de cinco dias após a administração. Os resultados foram expressos como $\text{média} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, indicando diferenças significativas nos dias 1, 2 e 3 entre os grupos ($*p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente). Não houve diferenças significativas nos dias 4 e 5. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado..... 36

Figura 10 - Excreção de proteína (proteinúria) diária em camundongos tratados com Diquat em comparação com o grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados quanto à excreção de proteína. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças observadas no primeiro dia do experimento

(***p<0,0008). O valor de p geral dos gráficos é 0,0004. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado..... 37

Figura 11 - Excreção de creatinina urinária (mg/24h) em camundongos tratados com Diquat e no grupo controle (CTRL). O gráfico apresenta os valores diários ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) foi comparado ao grupo tratado com Diquat (n=24). Os resultados foram expressos como $media \pm EPM$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças observadas nos dias 1 e 3 (*p<0,05). O valor de p geral dos gráficos é 0,0444. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado..... 38

Figura 12 - Razão de proteína/creatinina urinária (UP/Cr) em camundongos tratados com Diquat (n=24) em comparação ao grupo controle (CTRL, n=9), monitorados ao longo de cinco dias após a administração. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, revelando diferenças significativas em determinados pontos temporais: no primeiro dia (p<0,001), segundo dia (p<0,01), com o valor geral dos gráficos sendo p=0,0005. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado..... 38

Figura 13 - A figura apresenta os níveis de creatinina plasmática em dois grupos de camundongos, um tratado com Diquat (DQ, n=9) e outro controle (CTRL, n=5), cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. A análise foi realizada utilizando o teste t não pareado. *p<0,05 39

Figura 14 - Concentração de ureia plasmática (mg/dL) em camundongos tratados com Diquat (DQ, n=9) e no grupo controle (CTRL, n=5), cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. Teste estatístico: teste t não pareado. *p < 0,05 40

Figura 15 – Depuração de creatinina (estimativa de taxa de Filtração Glomerular) (GFR) em camundongos tratados com Diquat (n=9) em comparação ao grupo controle (CTRL, n=5) cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de t não pareado *p = 0,0138. 41

Figura 16 - Excreção urinária de γ -GT (U/24h) em camundongos tratados com Diquat (n=24) em comparação ao grupo controle (CTRL, n=9) durante cinco dias após a administração. Os resultados foram expressos como $media \pm EPM$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, ****<0,0001. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado..... 41

- Figura 17** - Contagem total de leucócitos (WBC) em camundongos tratados com Diquat (n = 5) em comparação ao grupo controle (n = 5), cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. A análise estatística foi realizada por teste de t não pareado. ****p < 0,0001. 42
- Figura 18** - Alterações nas linhagens sanguíneas de camundongos cinco dias após a administração de Diquat (DQ n=5) em comparação com o grupo controle (CTRL n=5). As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. Análise estatística realizada por two-way ANOVA. ***<0,001; ****<0,0001. 43
- Figura 19** - Perda de peso corporal percentual (%) em camundongos tratados com Diquat em comparação com o grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados para avaliação da variação de peso. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA. ****p<0,0001. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado. 44
- Figura 20** - Fotomicrografias do rim de camundongos expostos ao Diquat, avaliando alterações histomorfológicas. (A) Rim normal, com túbulos e glomérulos preservados na região cortical (escala: 200 µm). (B) Rim exposto ao Diquat, apresentando edema nos capilares glomerulares e congestão (Seta Branca). (C) Área de necrose glomerular com extravasamento para o espaço de Bowman (Cabeça de seta). (D) Descamação tubular com presença de cristais hialinos. (E) Necrose tubular. (F) Edema intersticial com infiltração de células inflamatórias e degeneração glomerular. Escalas: (B-F) 50 µm. Aumento..... 45
- Figura 21** - Escore histopatológico renal em camundongos cinco dias após administração de Diquat. A avaliação semiquantitativa considerou alterações em glomérulos, túbulos e interstício, com escores de 0 a 3 conforme a gravidade e extensão da lesão. Os animais do grupo (DQ n=10) apresentam níveis maiores significativo nos escores quando comparados ao grupo controle (CTRL, n=10). Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil. Teste de Mann–Whitney p* 0.0001..... 46
- Figura 22**- Efeito do tratamento com DQ no relaxamento vascular induzido por acetilcolina (ACh) em aorta de camundongos. As curvas representam os grupos controle (CTRL, n=8), DQ 3 horas (DQ 3H, n=8), DQ 72 horas (DQ 72H, n=8) e DQ 120 horas (DQ 120H, n=8). Os dados foram expressos como media±EPM. A análise

estatística foi realizada por two-way ANOVA, indicando diferenças significativas: *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 47

Figura 23 - Efeito do tratamento com DQ na contração vascular causada por fenilefrina (FE) na aorta de camundongos. As curvas representam os grupos controle (CTRL, $n=8$), DQ 3 horas (DQ 3H, $n=8$), DQ 72 horas (DQ 72H, $n=8$) e DQ 120 horas (DQ 120H, $n=8$). A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças importantes: $p < 0,0001$ 48

Figura 24 - Efeito do tratamento dos animais com GNP sobre contração vascular induzida por fenilefrina (FE) em camundongos tratados por 3h com diquat. As curvas representam os grupos controle (CTRL, $n=6$), DQ 3 horas (DQ 3H, $n=6$) e os grupos tratados com diferentes doses de nanopartículas de ouro (GNP): 0,195; 0,39; 1,97 e 3,94 mg/kg, simultaneamente a exposição ao DQ ($n=6$ por grupo). Os dados foram expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças importantes: *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 49

Figura 25 - Efeito do tratamento dos animais com 19 mg/kg de GNP simultaneamente a 3 ou 24 h de exposição ao diquat. As curvas representam os grupos controle (CTRL, $n=6$), DQ 3 horas (DQ 3H, $n=6$), DQ 24h horas (DQ 24H, $n=6$), DQ 3 horas + GNP ($n=6$), e DQ 24 horas + GNP ($n=6$). Os dados foram expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças importantes: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ 50

Figura 26 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em aortas de camundongos tratados por 3h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DHE de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada íntima do vaso. As barras representam a escala de 10 μm . CTRL: controle; DQ 3H: diquat 3h; DQ 3H + GNP: diquat 3h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como $\text{Media} \pm \text{EPM}$ da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: **** $p < 0,0001$ 51

Figura 27 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em aortas de camundongos tratados por 24h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DHE de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos

valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada intima do vaso. As barras representam a escala de 10 μm . CTRL: controle; DQ 24H: diquat 24h; DQ 24H + GNP: diquat 24h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como $\text{Media} \pm \text{EPM}$ da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: $*p < 0,05$ 52

Figura 28 - Produção de NO em aortas de camundongos tratados por 3h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DAF de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada intima do vaso. As barras representam a escala de 10 μm . CTRL: controle; DQ 3H: diquat 3h; DQ 3H + GNP: diquat 3h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como $\text{Media} \pm \text{EPM}$ da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: $*p < 0,05$; $***p < 0,0001$ 53

Figura 29 - Produção de NO em aortas de camundongos tratados por 24h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DAF de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada intima do vaso. As barras representam a escala de 10 μm . CTRL: controle; DQ 24H: diquat 24h; DQ 24H + GNP: diquat 24h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como $\text{Media} \pm \text{EPM}$ da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: $***p < 0,0001$ 54

Lista de abreviaturas e siglas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ug/mL	Micrograma por Mililitro
µM	Micro molar
ACh	Acetilcolina
°C	Graus centígrados
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindole, dihydrochloride
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceína
DCF	2',7'-dichlorofluoresceína
DCFH	2,7-dichlorodihydrofluoresceína
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DHE	Dihydroethidium dihydroetidina
Diquat	1,1 Etylene 2,2 Bypiridinium; DQ
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
GNP	Gold nanoparticles
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
h	Hora(s)

iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
mg	Miligrama
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-kB	Fator de transcrição nuclear-kappa B
nm	Nanômetro
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
PKA	Proteína cinase A
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium dodecil (lauril) sulfato
U/mL	Unidades por mililitro

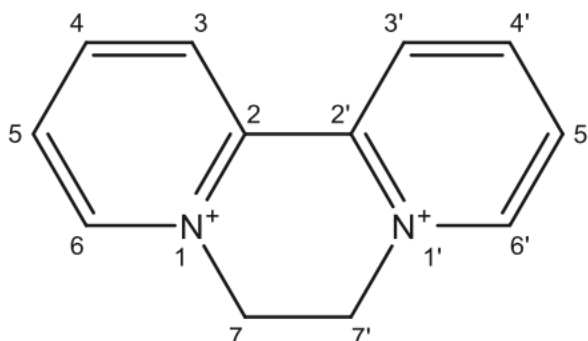
SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.2 Nanopartículas de ouro: propriedade terapêuticas e aplicações potenciais	22
1.3 Justificativa e delineamento do estudo.....	23
2. Objetivo geral	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3. Materiais e métodos	24
3.1 Modelo animal.....	24
3.2 Avaliações da função renal: protocolo de coleta e análises bioquímicas ...	25
3.3 Processamentos histológico dos tecidos.....	26
3.4 Reatividade vascular.....	27
3.4.1 Representação esquemática do protocolo experimental de reatividade vascular	28
3.5 Microscopia de fluorescência.....	28
3.6 Síntese das nanopartículas de ouro (gnp)	29
3.7 Análise fisicoquímica nanopartículas de ouro	29
3.8 Análise estatística.....	30
4. Resultados.....	31
4.1 Análise da ingesta hídrica, alimentar e função renal	31
4.2 Perfil celular sanguíneo e peso corporal.....	42
4.3 Histopatologia renal	44
4.4 Efeitos do tratamento com o diquat sobre a função vascular	46
4.5 Análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio e no em aorta	50
5. Discussão.....	54
6. Conclusão.....	58
7. Limitações e perspectivas	59
8. Referências bibliográficas	60

1. Introdução

O Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium; DQ) é amplamente utilizado como herbicida de contato não seletivo no controle de ervas daninhas em ambientes agrícolas e urbanos¹. Embora seja frequentemente considerado menos tóxico que seu análogo estrutural Paraquat, evidências recentes apontam para um perfil tóxico significativo, especialmente em exposições agudas ou em altas doses, destacando a necessidade de uma investigação aprofundada sobre seus mecanismos de toxicidade^{2,3}.

Os principais mecanismos de ação do Diquat envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediada por ciclos de redox, resultando em danos a lipídeos, proteínas e DNA⁴. Esse estresse oxidativo é central para os efeitos tóxicos sistêmicos observados, conforme demonstrado em estudos⁵. No entanto, a caracterização detalhada dos impactos do Diquat em órgãos específicos, como rins e sistema cardiovascular, permanece limitada, especialmente em modelos experimentais *in vivo*⁶.



Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium ion)

Figura 1 - Estrutura química do Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium). O composto é formado por dois anéis biperidílicos conectados por uma ponte etilênica, conferindo propriedades anfipáticas que permitem sua interação com membranas celulares e sua atividade herbicida. Essa estrutura facilita a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio de ciclos redox, resultando em estresse oxidativo. Fonte: Magalhães et al., 2018.

Estudos sugerem que o Diquat induz alterações renais significativas, incluindo aumento nos níveis plasmáticos de creatinina e ureia, proteinúria e danos estruturais nos túbulos renais^{7,8}. Esses achados apontam para disfunções glomerulares e tubulares exacerbadas pela produção excessiva de EROs e pela depleção das

defesas antioxidantes⁹. Apesar disso, a literatura carece de uma descrição detalhada dos mecanismos que levam à insuficiência renal aguda induzida pelo Diquat, bem como de estudos que combinem medições funcionais e estruturais ao longo do tempo em modelos *in vivo*^{9,10}. A relação entre a exposição ao Diquat e parâmetros como a taxa de filtração glomerular (TFG) e a retenção de líquidos ainda é descrita de forma superficial, ressaltando a necessidade de investigações mais abrangentes¹⁰.

No sistema cardiovascular, o Diquat é descrito como um indutor de disfunção endotelial, possivelmente devido à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), uma molécula essencial para a regulação do tônus vascular¹¹. Esse efeito ocorre pela interação do NO com radicais livres, formando peroxinitrito, uma molécula altamente reativa que danifica o endotélio e contribui para a progressão de rigidez arterial e fibrose vascular¹². Apesar dessas indicações, grande parte das investigações realizadas até o momento baseia-se em modelos **in vitro** ou análises limitadas de exposições agudas em animais¹³. Não há uma caracterização robusta da reatividade vascular do Diquat em modelos **in vivo**, especialmente em resposta a estímulos vasoconstritores e vasodilatadores. Além disso, faltam estudos que relacionem diretamente os níveis de EROs a alterações funcionais no endotélio e no músculo liso vascular¹⁴.

Embora compartilhe características tóxicas com o Paraquat, como a geração de radicais livres, o Diquat apresenta diferenças marcantes em seu perfil de toxicidade. Enquanto o Paraquat é mais conhecido por causar lesões pulmonares graves, o Diquat parece ter uma maior afinidade por tecidos renais e cardiovasculares, embora com menor letalidade em exposições agudas¹⁵. Essa distinção torna o Diquat um modelo relevante para estudos que investiguem os impactos do estresse oxidativo em órgãos específicos.

Com o aumento do uso do Diquat no Brasil e em outras regiões, é urgente aprofundar o conhecimento sobre seus impactos em sistemas biológicos. Apesar de existirem dados preliminares indicando toxicidade renal e vascular, a literatura atual apresenta lacunas significativas na caracterização detalhada desses efeitos, especialmente em modelos **in vivo** que avaliem parâmetros funcionais e moleculares. Essa necessidade de maior investigação reforça a relevância de estudos que integrem análises sistêmicas e locais, contribuindo para a formulação de estratégias terapêuticas ou preventivas para mitigar os danos causados por este herbicida.

1.2 Nanopartículas de ouro: propriedade terapêuticas e aplicações potenciais

Após a análise dos efeitos tóxicos do Diquat no sistema cardiovascular e sua capacidade de induzir estresse oxidativo grave, destaca-se a importância de explorar abordagens terapêuticas que possam atenuar esses danos. Nesse contexto, as nanopartículas de ouro (GNPs) emergem como uma estratégia promissora devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Produtos da nanotecnologia, as GNPs têm ganhado relevância crescente nas áreas médica e biológica, principalmente em função de sua estabilidade química e afinidade por biomoléculas, características que as tornam adequadas para aplicações como transporte de fármacos, diagnóstico e terapia^{7, 8}.

O uso medicinal do ouro remonta ao século V, com registros históricos em países asiáticos como China e Índia. Em tempos modernos, um marco importante foi o uso bem-sucedido do ouro coloidal no tratamento da artrite reumatoide, ampliando seu potencial para outras condições inflamatórias^{13, 19}. Estudos apontam que as GNPs podem atenuar processos inflamatórios ao reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , possivelmente por meio da modulação da via NF- κ B, um fator de transcrição crucial em processos inflamatórios e oxidativos^{18, 20}.

A estabilidade e bioinércia das GNPs as tornam particularmente atraentes para estudos terapêuticos. Além de suas propriedades anti-inflamatórias, essas partículas também demonstraram eficácia em reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), protegendo tecidos contra danos oxidativos^{10, 12}. Estudos em modelos experimentais de lesão renal diferente do modelo proposto, indicam que as GNPs podem atenuar os danos renais ao preservar a integridade funcional e estrutural dos tecidos, o que reforça seu potencial terapêutico^{14, 18}.

Apesar dessas evidências promissoras, o uso das GNPs em tratamentos de longo prazo ainda levanta preocupações relacionadas à toxicidade. Estudos apontam que a segurança das GNPs em aplicações crônicas não está completamente estabelecida, e mais investigações são necessárias para avaliar seu impacto em modelos de doenças inflamatórias crônicas e cardiovasculares^{19, 22}. No entanto, em condições agudas, os resultados disponíveis sugerem que as GNPs podem ser eficazes na

redução do estresse oxidativo e na modulação de respostas inflamatórias, particularmente em contextos experimentais¹⁵.

Embora o uso de nanopartículas de ouro ainda seja um campo emergente, sua aplicação potencial no contexto de lesões causadas pelo Diquat reforça a necessidade de mais estudos experimentais que avaliem tanto os mecanismos moleculares envolvidos quanto a eficácia terapêutica dessas partículas. Estudos futuros devem focar na integração de parâmetros funcionais e estruturais para fornecer uma caracterização mais abrangente dos efeitos das GNPs em modelos de estresse oxidativo.

Adicionalmente, embora as nanopartículas de ouro (GNPs) sejam amplamente descritas como biocompatíveis, diversos estudos têm demonstrado que essas partículas não são totalmente inertes. Sua atividade depende de fatores como tamanho, forma, carga superficial e tempo de exposição, podendo modular respostas inflamatórias, sinalização redox e vias celulares específicas^{7, 13, 14, 19, 21, 23}. Tais propriedades conferem às GNPs um potencial terapêutico ativo, e não meramente passivo, especialmente em contextos inflamatórios e oxidativos como o induzido pelo Diquat.

1.3 Justificativa e delineamento do estudo

O presente estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos do Diquat (DQ) na função vascular em modelos *in vivo*, fornecendo uma abordagem inovadora em relação aos estudos anteriores que se limitaram a modelos **ex vivo**. Essa estratégia busca ampliar a compreensão dos impactos do DQ em condições fisiológicas reais, permitindo análises mais detalhadas das interações sistêmicas e locais.

Ao enfatizar os modelos *in vivo*, este trabalho visa explorar os mecanismos moleculares subjacentes à disfunção endotelial induzida pelo Diquat, especialmente os relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e à biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Além disso, a metodologia adotada permitirá uma avaliação mais abrangente dos efeitos do Diquat, integrando parâmetros funcionais e estruturais, e destacará a relevância do estudo para o entendimento dos impactos sistêmicos desse herbicida.

2. Objetivo geral

Estudar os mecanismos fisiopatológicos induzidos pelo Diquat *in vivo*, com foco nas alterações vasculares e renais associadas ao estresse oxidativo, e explorar o potencial das nanopartículas de ouro como agente vasculho-protetor.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da administração de DQ na homeostase hidroeletrólítica, metabolismo e parâmetros comportamentais em modelos *in vivo*.
- Investigar alterações histopatológicas renais induzidas pelo DQ, com foco em alterações glomerulares, tubulares e inflamatórias.
- Avaliar a função endotelial e a reatividade vascular em resposta ao DQ, por meio de curvas de contração e relaxamento.
- Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) em aortas de camundongos tratados com DQ, utilizando técnicas de fluorescência.
- Avaliar se o tratamento com nanopartículas de ouro (GNP) modula os efeitos vasculares induzidos pelo DQ em curto prazo.

3. Materiais e métodos

3.1 Modelo animal

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL6J, com idades entre 8 e 12 semanas. A escolha dessa dose foi baseada em experimentos-piloto conduzidos previamente com diferentes concentrações (100 a 20 mg/kg), os quais demonstraram que doses superiores a 25 mg/kg resultavam em alta letalidade em menos de 24h horas. A dose de 20 mg/kg foi, portanto, selecionada por permitir o acompanhamento dos animais por até 120 horas. A curva de mortalidade obtida durante a padronização experimental está representada na Figura 4. Os procedimentos envolveram a administração de 20 mg/kg de Diquat diluído em salina estéril (0,9% de NaCl), por via intraperitoneal, em dose única. Os animais foram monitorados por até 120 horas para avaliação de múltiplos parâmetros fisiológicos,

bioquímicos, vasculares e histopatológicos ao longo do tempo. Após os intervalos de tempo pré-definidos, os animais foram eutanasiados para análise dos diferentes desfechos, conforme descrito nos tópicos seguintes. O efeito do tratamento com nanopartículas de ouro (GNP; 0,195 a 3,94 mg/kg) foi avaliado por meio da administração concomitante com o Diquat, também em dose única. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo nº 276/2024).

3.2 Avaliações da função renal: protocolo de coleta e análises bioquímicas

Com o objetivo de avaliar parâmetros de função renal ao longo da exposição ao Diquat, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas por um período contínuo de 120 horas. Durante esse intervalo experimental, foram registradas diariamente a ingestão de água, a ingestão de ração e o peso corporal. A urina foi coletada a cada 24 horas por meio do sistema de separação das gaiolas, sendo imediatamente armazenada em microtubos do tipo Eppendorf e congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

Ao final do protocolo, no quinto dia experimental, os animais foram submetidos à eutanásia, e a coleta sanguínea foi realizada. O sangue foi armazenado em microtubos tipo Eppendorf sem adição de anticoagulante, sendo mantido sob refrigeração até a formação do coágulo. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos para separação do plasma, o qual também foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tanto as amostras de urina coletadas diariamente quanto o plasma obtido no momento da eutanásia foram utilizados para a análise dos níveis de ureia e creatinina, além da mensuração da atividade da enzima gama-glutamil transferase (γ -GT), marcador de lesão tubular renal. As quantificações foram realizadas por meio de métodos colorimétricos e enzimáticos.

3.3 Processamentos histológico dos tecidos

Os rins foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), permanecendo em cada concentração por 1 hora. A diafanização foi realizada em xilol por 30 minutos e, em seguida, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina aquecida a 60 °C por 2 horas.

Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5 µm de espessura, utilizando um micrótomo semiautomático. As lâminas foram coradas com Hematoxilina por 5 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos e, em seguida, coradas com Eosina por 2 minutos. Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando meio de montagem sintético (Entellan®, Merck).

As preparações foram analisadas no microscópio de luz Olykmpus BX63, acoplado à câmera Qcolor 5, no laboratório de histologia do ICB/UFMG, utilizando ampliação de 40x para avaliação detalhada da morfologia celular e tecidual. Esse equipamento permitiu uma análise precisa, proporcionando alta resolução e contraste nas imagens capturadas.

Todos os procedimentos seguiram protocolos padronizados para garantir a preservação da integridade dos tecidos e a qualidade da coloração, permitindo uma análise histológica precisa e detalhada.

A avaliação histopatológica foi realizada atribuindo escores de 0 a 3, conforme a severidade das alterações, com a seguinte correspondência em porcentagem: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração mínima, até 25% das estruturas afetadas), 2 (alteração leve, 26–50%) e 3 (alteração grave, 51–100%). Para os glomérulos, foram analisadas 10 estruturas aleatórias por amostra, considerando retração, esclerose, isquemia e relação do espaço de Bowman. Nos túbulos e no interstício, foram considerados: dilatação, atrofia, hiperplasia, espessamento da membrana basal, edema/inflamação e presença de cilindros.

A análise foi feita em cortes histológicos corados por H&E de rotina. Metodologia adaptada de Chung-Ming Chen et al., 2019.

3.4 Reatividade vascular

Foi realizada a avaliação da reatividade vascular utilizando anéis de artéria aorta torácica de camundongos. Após a eutanásia dos animais, a aorta foi cuidadosamente dissecada, livre de tecido adiposo perivascular, e colocada em uma placa de Petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂·2H₂O 2,5; glicose 11; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄·7H₂O 1,2; pH 7,4). A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 3 mm de comprimento, e cada anel teve duas hastes metálicas triangulares transpassadas pelo lúmen do vaso.

Os procedimentos experimentais foram iniciados com a fixação dos anéis a um transdutor de tensão isométrica, após a transpassagem das hastes. A solução nutriente foi arejada com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) a 37 °C e pH 7,4. O período de estabilização envolveu a manutenção da tensão de repouso em 0,5 g, regulada constantemente por uma hora, com trocas da solução nutritora a cada 15 minutos para evitar o acúmulo de metabólitos e manter os níveis adequados de glicose.

A avaliação da integridade endotelial foi conduzida por meio de pré-contração com fenilefrina (Pe, 0,1 µmol/L), seguida pela adição de acetilcolina (ACh, 10 µmol/L) para verificação da presença de endotélio funcional. Vasos que apresentaram relaxamento superior a 80% em resposta à ACh foram considerados funcionais. Em preparações sem endotélio funcional, a remoção foi realizada mecanicamente com uma haste metálica.

A aquisição de dados foi realizada com transdutores de tensão isométrica conectados a um amplificador e a um sistema computadorizado com placa conversora analógico-digital, utilizando o programa WinDaq Data Acquisition (DataQ® Instruments, USA). Todas as considerações éticas foram respeitadas, e o experimento contou com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

3.4.1 Representação esquemática do protocolo experimental de reatividade vascular

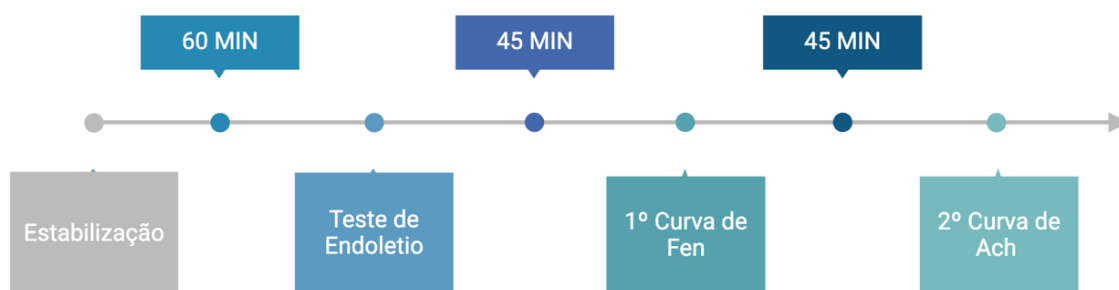


Figura 2 - A linha do tempo apresenta as principais etapas do protocolo experimental, incluindo o período de estabilização, seguido pelo teste de integridade endotelial. Após a estabilização, realiza-se uma primeira curva dose-resposta utilizando Fenilefrina (Pe), seguida por uma segunda curva dose-resposta com Acetilcolina (ACh). A figura visa resumir de forma clara e objetiva os principais eventos e tempos experimentais ao longo do protocolo.

3.5 Microscopia de fluorescência

Após o tratamento dos animais com diquat e/ou GNP pelos referidos períodos de tempo, os camundongos foram anestesiados e submetidos à perfusão com PBS para remoção de resíduos de sangue. Em seguida, os segmentos das aortas foram dissecados e imersos em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura®, USA). Os tecidos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e cortados em criostato, com espessura de 5 μm .

Avaliação da produção de NO e EROs: os segmentos da aorta foram incubados com 5 $\mu\text{mol/L}$ de DAF-FM ou 5 $\mu\text{mol/L}$ de DHE (sondas para detecção de NO e radicais totais, respectivamente) em PBS por 30 minutos no escuro. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e montadas utilizando meio de montagem (Prolong Gold Mounting Media; Invitrogen, USA) para posterior análise.

A aquisição das imagens foi realizada em microscópio confocal Zeiss 510 META, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG. A intensidade da fluorescência foi analisada e corrigida pelo tamanho da área selecionada através do software ImageJ.

3.6 Síntese das nanopartículas de ouro (gnp)

Todos os frascos utilizados como recipientes de reação foram rigorosamente limpos com água ultrapura (Millipore), associada a uma solução de ácido clorídrico concentrado e ácido nítrico concentrado na proporção volumétrica de 4:1. Esse procedimento visou garantir a ausência de contaminações que poderiam comprometer o processo de síntese.

Em uma síntese padrão, 50 mL de uma solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) a 0,25 mM (1,0% p/p) foram adicionados ao frasco reacional. A solução foi aquecida em uma placa de aquecimento com agitação constante e vigorosa. Para minimizar a evaporação do solvente e prevenir contaminações externas, o frasco foi coberto com uma tampa de Petri descartável durante o processo. Após atingir o ponto de ebulição sob pressão ambiente, uma solução de ácido cítrico previamente preparada foi rapidamente injetada na solução de HAuCl_4 . A razão molar (MR) entre ácido cítrico e HAuCl_4 foi ajustada de acordo com o tamanho desejado das nanopartículas, conforme metodologia adaptada de Frens (1973).

A síntese foi considerada concluída quando a suspensão adquiriu coloração característica e estável, indicando a formação completa das nanopartículas. Esse processo geralmente durou entre 2 e 5 minutos, dependendo da razão molar empregada. Após o término, as amostras foram resfriadas naturalmente à temperatura ambiente e armazenadas sob refrigeração para utilização posterior.

Nos casos em que foi necessária uma síntese ampliada, os volumes das soluções de HAuCl_4 e ácido cítrico foram aumentados proporcionalmente. Para garantir uma mistura eficiente, a solução de ácido cítrico foi injetada utilizando múltiplas seringas descartáveis, assegurando a homogeneidade e reprodutibilidade do processo.

3.7 Análise fisicoquímica nanopartículas de ouro

As propriedades físico-químicas das GNPs foram analisadas utilizando o Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). O diâmetro hidrodinâmico médio, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta foram determinados para garantir a qualidade e a estabilidade das formulações.

Para as análises, as amostras foram diluídas com precisão, adicionando-se 10 μL da suspensão em 990 μL de água ultrapura (MilliQ). As amostras diluídas foram transferidas para cubetas descartáveis e submetidas à análise a 25 °C.

Os resultados mostraram que 84,9% das partículas apresentaram tamanho médio de 35 nanômetros, com um índice de polidispersão (PDI) de 0,2, o que está dentro dos valores aceitáveis para estabilidade coloidal. O potencial zeta obtido foi de -16,1 mV, indicando boa estabilidade das nanopartículas devido à repulsão eletrostática entre as partículas.

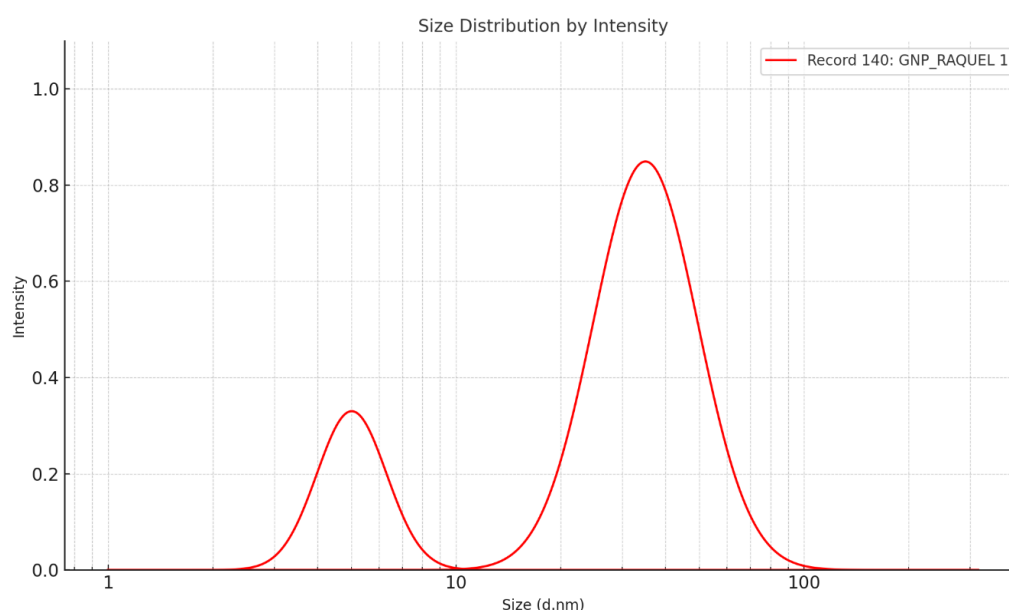


Figura 3 - Distribuição de tamanho das partículas por intensidade, determinada por análise no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido). O gráfico apresenta dois picos principais: um em torno de 5 nm e outro, predominante em 35 nm, indicando a presença de populações distintas de partículas, sendo a maior parte da amostra composta por nanopartículas com diâmetro médio de aproximadamente 35 nanômetros.

3.8 Análise estatística

As seguintes abordagens estatísticas foram adotadas: Os resultados expressos em gráficos de barras foram submetidos à análise estatística utilizando o teste t de Student ou ANOVA, conforme apropriado. A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$. Os dados referentes ao relaxamento vascular foram representados como percentual de redução da contração em resposta à fenilefrina. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas por meio do método two-way ANOVA para medidas repetidas. Testes de comparação do tipo BONFERRONI foram

aplicados para avaliar as diferenças significativas entre os grupos. Os valores de E_{max} (resposta máxima) foram calculados através de regressão não linear das curvas obtidas nos experimentos. Esse parâmetro representa o ponto em que o efeito máximo da droga utilizada foi alcançado. Essas análises estatísticas visam identificar diferenças significativas entre grupos experimentais, proporcionando uma avaliação robusta das variáveis estudadas. O estabelecimento de significância estatística a $p < 0,05$ contribuiu para a confiabilidade dos resultados e das conclusões obtidas a partir deste estudo.

4. Resultados

4.1 Análise da ingestão hídrica, alimentar e função renal

A definição da dose experimental de 20 mg/kg de Diquat foi baseada em experimentos-piloto que demonstraram alta letalidade em doses superiores a 25 mg/kg, especialmente nas primeiras 24 horas. A dose escolhida permitiu o monitoramento dos animais por até 120 horas, possibilitando a análise progressiva dos efeitos tóxicos agudos sobre diferentes sistemas orgânicos. A curva de sobrevivência obtida durante a padronização experimental está representada na Figura 4.

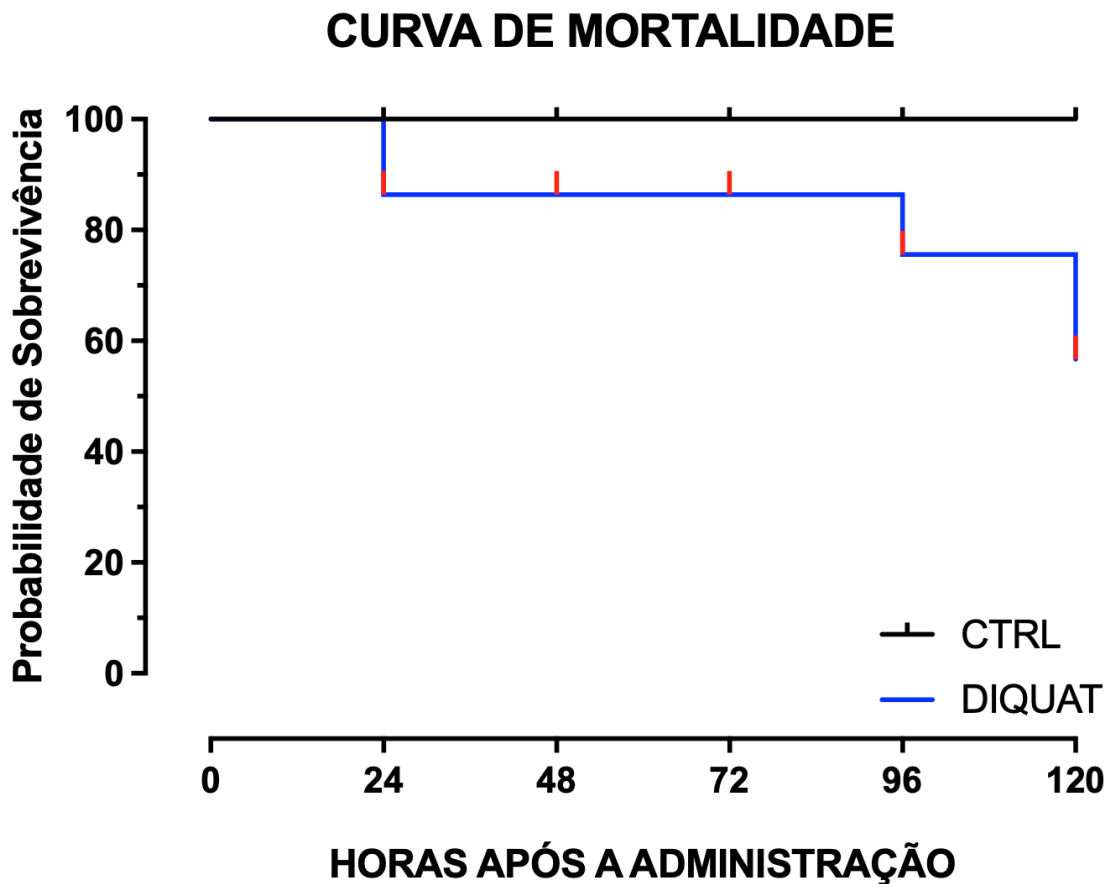


Figura 4 - A curva de Kaplan-Meier representa a probabilidade de sobrevivência ao longo de 120 horas após a administração intraperitoneal de Diquat (linha azul) em comparação com o grupo controle (linha preta). A dose de 20 mg/kg foi selecionada com base em testes-piloto, por permitir a indução de lesão mensurável com manutenção de sobrevivência em parte dos animais durante o período experimental.

Ao longo do período experimental, o grupo tratado com Diquat apresentou uma redução significativa na variação de água em comparação ao grupo controle. Desde o primeiro dia, o grupo tratado com Diquat mostrou ingestão de água significativamente menor em comparação ao grupo controle, e essa diferença se manteve ao longo dos cinco dias (Figura 5) em cada ponto de tempo.

Esses resultados indicam um efeito claro do tratamento com Diquat na redução da ingestão de água nos camundongos, indicando um impacto sistêmico, possivelmente relacionado a alterações metabólicas ou comportamentais pelo herbicida.

Quanto a ingestão alimentar, observa-se uma redução significativa no consumo de ração pelos camundongos tratados com Diquat em comparação ao grupo controle (CTRL). A diferença estatística é evidenciada em todos os dias após a administração (Figura 6; $p < 0,0001$). No grupo controle, o consumo alimentar aumenta

progressivamente ao longo dos dias, enquanto no grupo Diquat, o aumento é mais lento, com níveis de consumo consistentemente menores, demonstrando os efeitos negativos do tratamento com Diquat sobre o apetite dos animais.

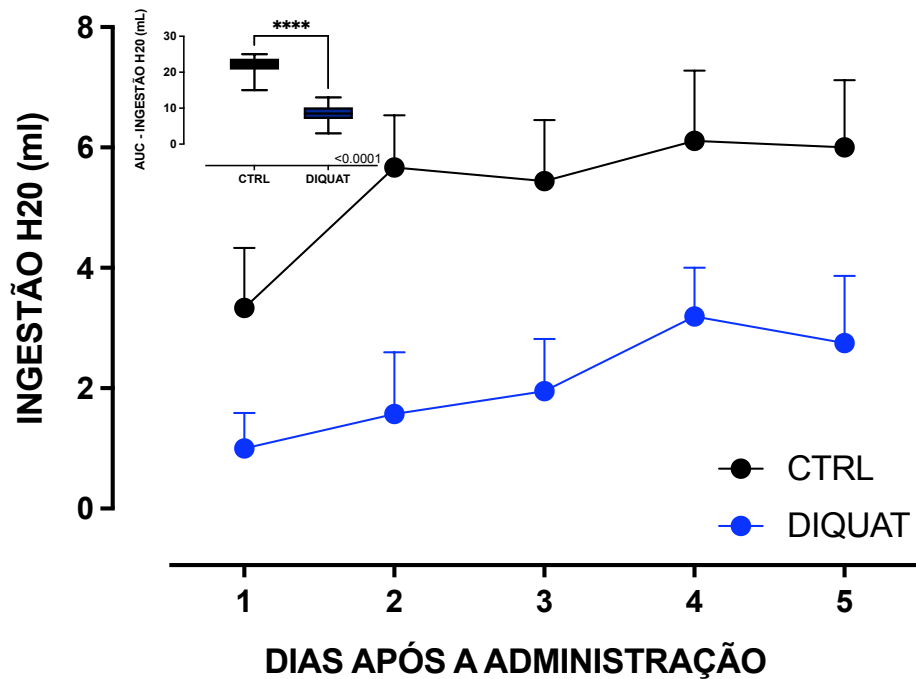


Figura 5 - Ingestão de água (mL) diária em camundongos tratados com Diquat em comparação com o grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados para consumo de água. Os resultados foram expressos como média±EPM. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças significativas em todos os dias do experimento (****p<0,0001), conforme indicado pelos asteriscos em cada ponto temporal. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

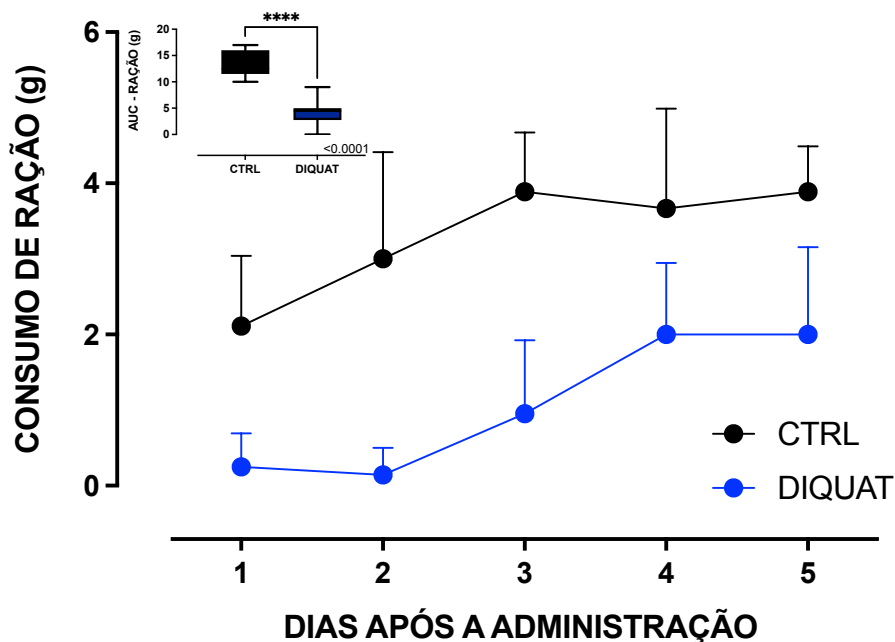


Figura 6 Consumo de ração (g) por camundongos tratados com DQ (Diquat, n=24) comparado ao grupo controle (CTRL, n=9) ao longo de cinco dias após a administração. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com diferenças significativas em todos os dias do experimento, com significância indicada como: ****p < 0,0001. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

Ao se analisar parâmetros de função renal, observamos que a análise do fluxo urinário no grupo tratado com Diquat, ao longo do tempo, foi consistentemente menor em relação ao controle, com diferenças estatisticamente significativas em todos os dias do experimento. Já no primeiro dia, o grupo tratado com Diquat apresentou uma redução significativa no fluxo urinário em comparação ao controle, o que também aconteceu ao longo do tempo, indicando que o tratamento afetou diretamente a função renal ao longo do tempo.

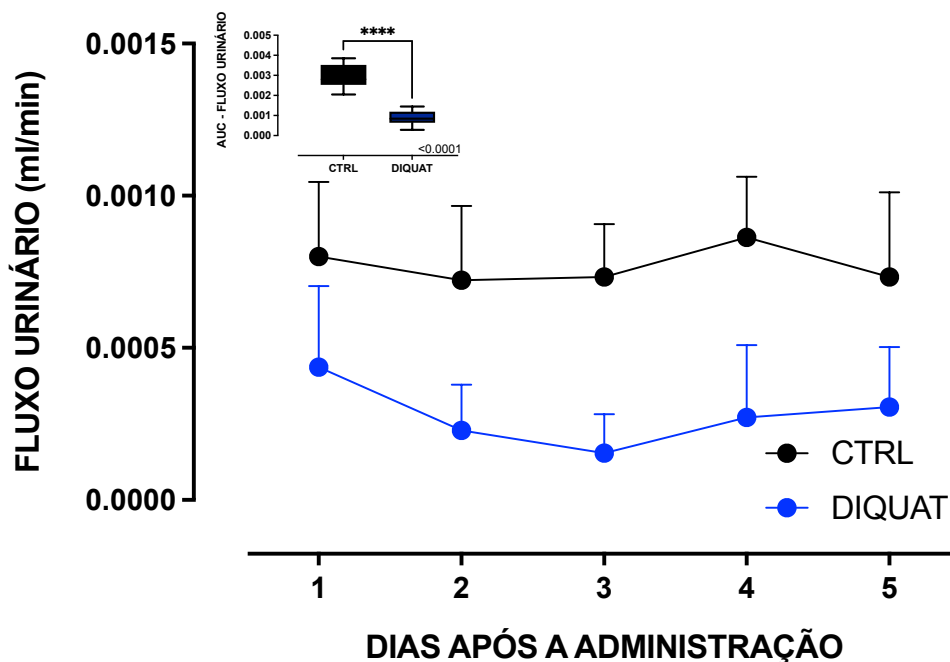


Figura 7 - Fluxo urinário diário (ml/min) em camundongos tratados com Diquat em comparação ao grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados para avaliação do fluxo urinário. Os resultados foram expressos como média±EPM. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças significativas ao longo dos dias (****p < 0,0381), representando a significância geral dos gráficos. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

Isoladamente, o fluxo urinário pode ser diretamente modulado pela ingestão hídrica, optamos por calcular o delta do balanço hídrico (Δ = ingestão de água – volume urinário), com o objetivo de verificar se havia retenção ou perda líquida ao longo dos dias.

Nossos dados mostram que o grupo tratado com Diquat apresentou um Δ de balanço hídrico significativamente menor que o grupo controle em todos os dias analisados (Figura 8), indicando uma maior perda hídrica relativa. Esses achados sugerem que o Diquat promove um desequilíbrio entre ingestão e excreção hídrica, com possível impacto na homeostase volêmica.

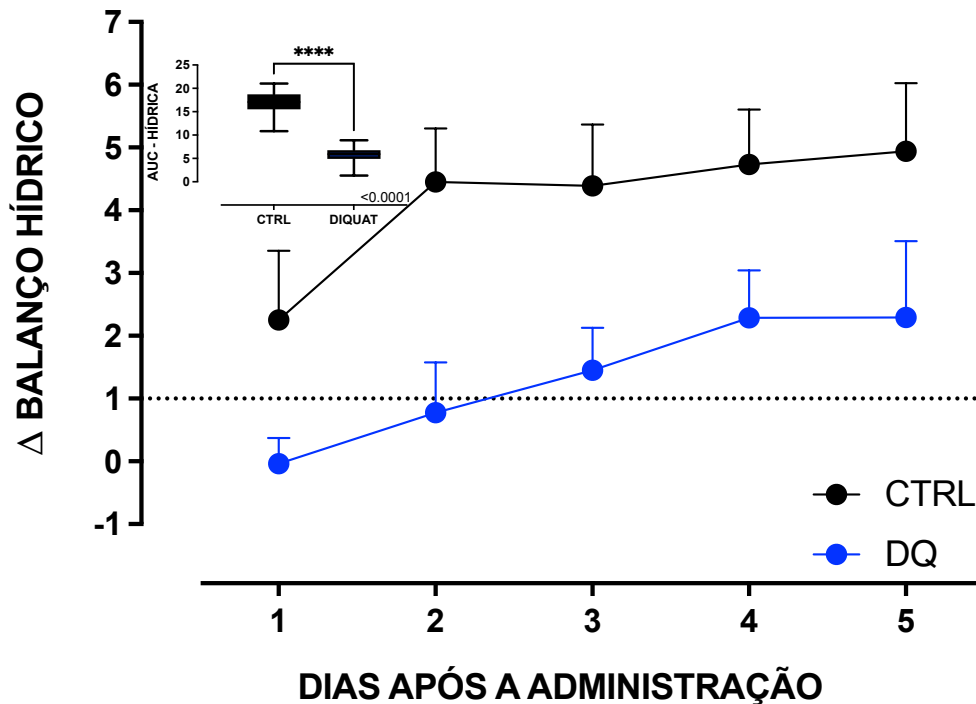


Figura 8 - Delta do balanço hídrico (ml) em camundongos tratados com Diquat (DQ) comparado ao grupo controle (CTRL), calculado como a diferença entre ingestão de água e volume urinário ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n = 9) e o grupo Diquat (n = 24) foram monitorados diariamente. Os dados estão expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos em todos os dias analisados (****p<0,0001). A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

A análise da fração de excreção de água (%), medida em camundongos tratados com Diquat (n=24) e comparada com o grupo controle (n=9), ao longo de cinco dias mostra que, no primeiro dia, houve uma redução significativa no grupo tratado com Diquat (Figura 9; *p<0,05). Nos dias subsequentes, a excreção de água no grupo tratado com diquat foi ligeiramente menor que o controle, porém, sem significância estatística. Esses dados sugerem que o tratamento com Diquat afeta a excreção de água de forma mais acentuada no início do tratamento.

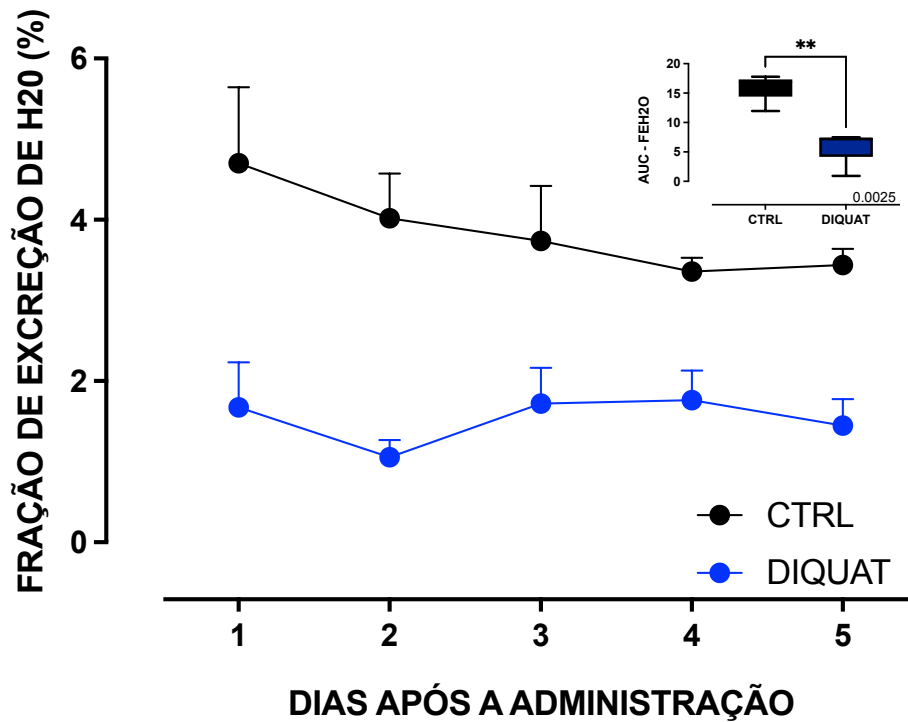


Figura 9 - Fração de excreção de H₂O (%), medida em camundongos tratados com Diquat (n=9) em comparação com o grupo controle (n=5) ao longo de cinco dias após a administração. Os resultados foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, indicando diferenças significativas nos dias 1, 2 e 3 entre os grupos ($*p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente). Não houve diferenças significativas nos dias 4 e 5. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

A análise da excreção urinária de proteínas totais (proteinúria) também demonstrou que, no primeiro dia após o tratamento com o diquat, observou-se uma excreção de proteína significativamente maior em relação ao grupo controle (Figura 10; $***p < 0,0008$). A partir do segundo dia, a proteinúria no grupo tratado com Diquat diminuiu progressivamente, até que nos dias subsequentes (dias três a cinco), não há diferenças significativas entre os grupos (Figura 9).

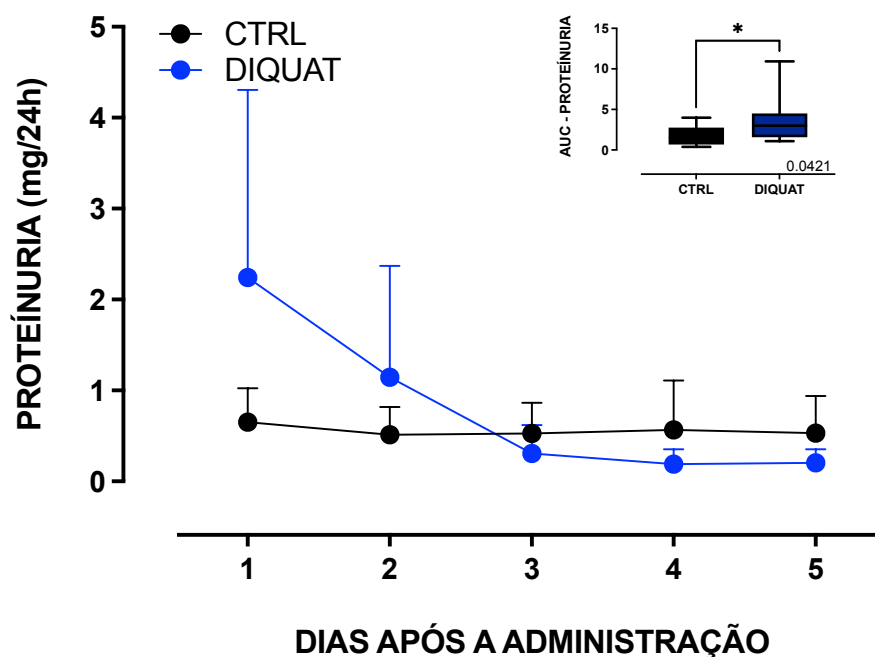


Figura 10 - Excreção de proteína (proteinúria) diária em camundongos tratados com Diquat em comparação com o grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados quanto à excreção de proteína. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças observadas no primeiro dia do experimento (** $p < 0,0008$). O valor de p geral dos gráficos é 0,0004. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

A análise da excreção urinária de creatinina nos mostrou que o tratamento com o diquat aumentou os níveis urinários de creatinina no primeiro dia após o tratamento, seguido de queda no terceiro dia (Figura 11). Apesar da sugestiva redução dos níveis de creatinina urinários no grupo diquat nos dias 4 e 5, não encontramos significância estatística nestes tempos.

A normalização dos dados de proteinúria pela fração de creatinina excretada nos mostram claramente que há significativo aumento da proteinúria, conforme evidenciado pela razão UP/Cr (proteína urinária/creatinina urinária) nos dois primeiros dias após o tratamento com o diquat (Figura 12). No terceiro dia pudemos observar uma queda significativa da razão UP/Cr, com normalização no quarto e quinto dias (Figura 12). Apesar da estranha normalização da excreção de proteínas, tal fato talvez possa ser explicado pelo reduzido fluxo urinário nos dois últimos dias.

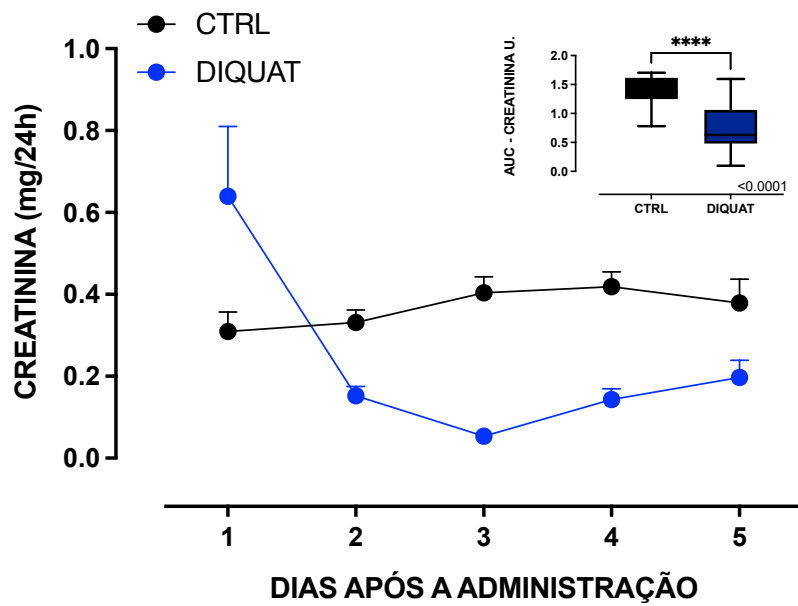


Figura 11 - Excreção de creatinina urinária (mg/24h) em camundongos tratados com Diquat e no grupo controle (CTRL). O gráfico apresenta os valores diários ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) foi comparado ao grupo tratado com Diquat (n=24). Os resultados foram expressos como média±EPM. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças observadas nos dias 1 e 3 (*p<0,05). O valor de p geral dos gráficos é 0,0444. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

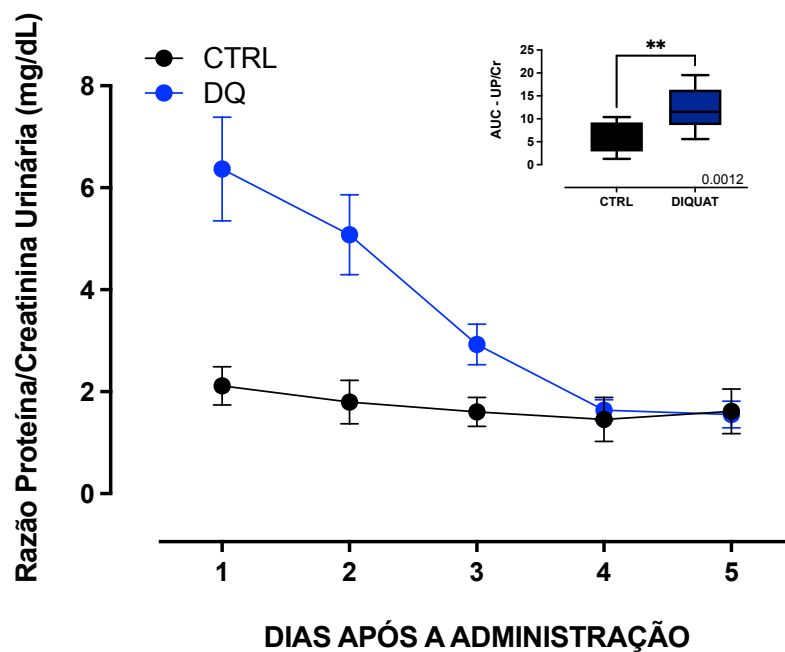


Figura 12 - Razão de proteína/creatinina urinária (UP/Cr) em camundongos tratados com Diquat (n=24) em comparação ao grupo controle (CTRL, n=9), monitorados ao longo de cinco dias após a administração. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, revelando diferenças significativas em determinados pontos temporais: no primeiro dia (p<0,001), segundo dia (p<0,01),

com o valor geral dos gráficos sendo $p=0,0005$. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

Por outro lado, ao analisarmos marcadores plasmáticos da função renal como os níveis de creatinina plasmática, pudemos observar que o tratamento com o diquat aumentou significativamente os níveis de creatinina plasmática após 5 dias de tratamento (Figura 13; $*p<0.05$). Os níveis de ureia plasmática também foram aumentados após 5 dias de tratamento com o diquat (Figura 14; $*p<0.05$). O aumento nos níveis de creatinina e ureia no grupo tratado com DQ sugere, mais uma vez, alterações significativas na função renal em resposta ao tratamento.

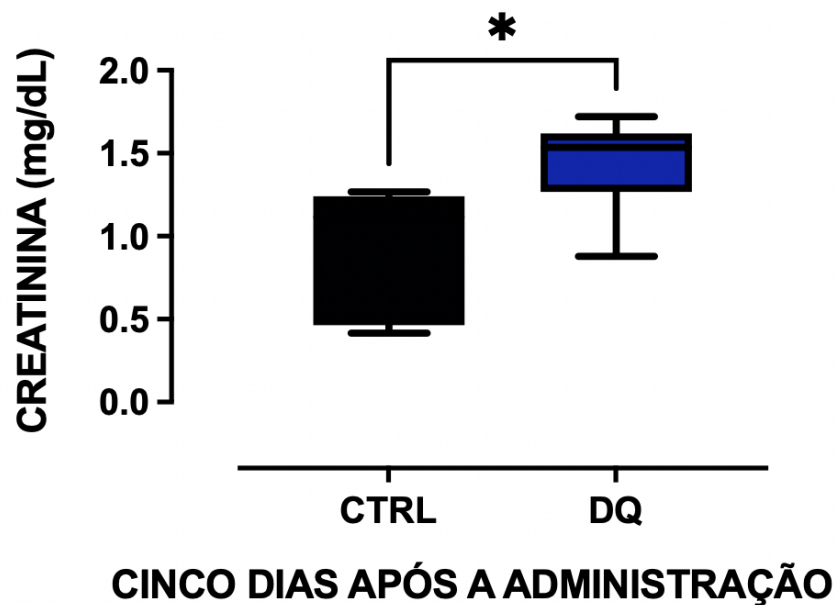


Figura 13 - A figura apresenta os níveis de creatinina plasmática em dois grupos de camundongos, um tratado com Diquat (DQ, $n=9$) e outro controle (CTRL, $n=5$), cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. A análise foi realizada utilizando o teste t não pareado. $*p<0,05$

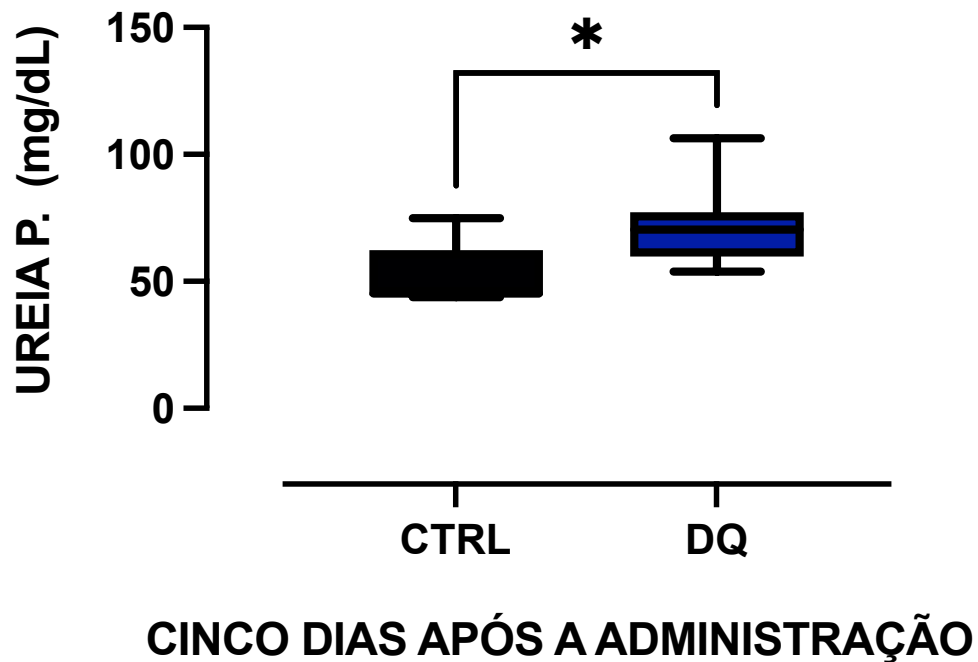


Figura 14 - Concentração de ureia plasmática (mg/dL) em camundongos tratados com Diquat (DQ, n=9) e no grupo controle (CTRL, n=5), cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. Teste estatístico: teste t não pareado. *p < 0,05

Após os sugestivos dados de perda da função renal pela exposição ao diquat, resolvemos analisar parâmetros específicos como a função glomerular e tubular. O grupo tratado com Diquat apresentou uma redução significativa na taxa de filtração glomerular estimada pela depuração de creatinina em relação ao controle, proporcionando uma diminuição na função renal após a exposição ao herbicida (Figura 15). Além disso, a excreção urinária da enzima γ -GT (gama-glutamilttransferase), indicativa de disfunção tubular, encontrou-se significativamente alterada no grupo tratado com Diquat no primeiro dia (Figura 16; ****p < 0,0001). Nos dias subsequentes, os níveis de excreção de ambos os grupos se aproximam e se estabilizam, sem diferenças a partir do segundo dia.

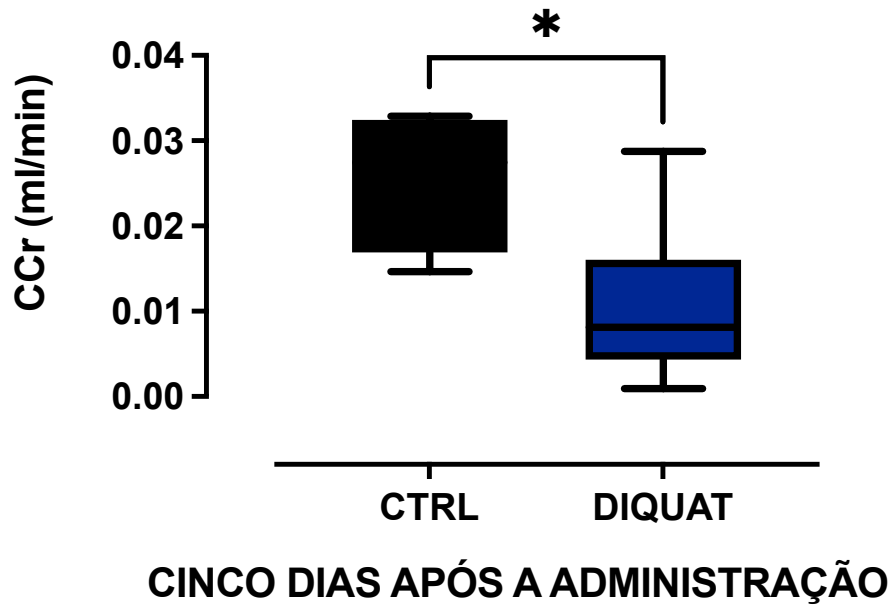


Figura 15 – Depuração de creatinina (estimativa de taxa de Filtração Glomerular) (GFR) em camundongos tratados com Diquat (n=9) em comparação ao grupo controle (CTRL, n=5) cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de t não pareado *p = 0,0138.

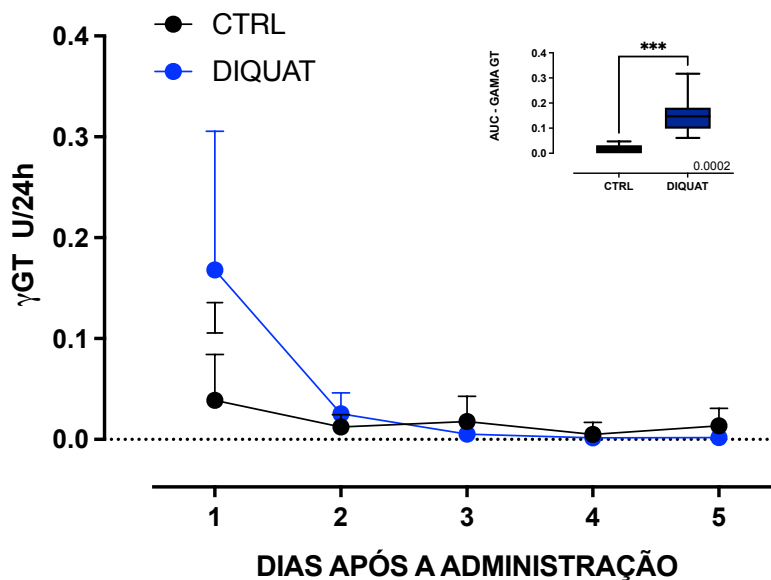


Figura 16 - Excreção urinária de γ -GT (U/24h) em camundongos tratados com Diquat (n=24) em comparação ao grupo controle (CTRL, n=9) durante cinco dias após a administração. Os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, ****<0,0001. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

4.2 Perfil celular sanguíneo e peso corporal

Os camundongos tratados com Diquat apresentam uma diminuição significativa no número de leucócitos (WBC) em relação ao grupo de controle (Figura 17). Essa diminuição pode estar associada a um possível efeito imunossupressor do Diquat, interferindo na resposta inflamatória dos camundongos. Para se evidenciar melhor tal efeito, foram analisados os números de linfócitos, polimorfonucleares e monócitos. Apesar de não haver diferença significativa no número de monócitos circulantes (Figura 18), pudemos observar um aumento expressivo no número de polimorfonucleares e redução de linfócitos (Figura 18).

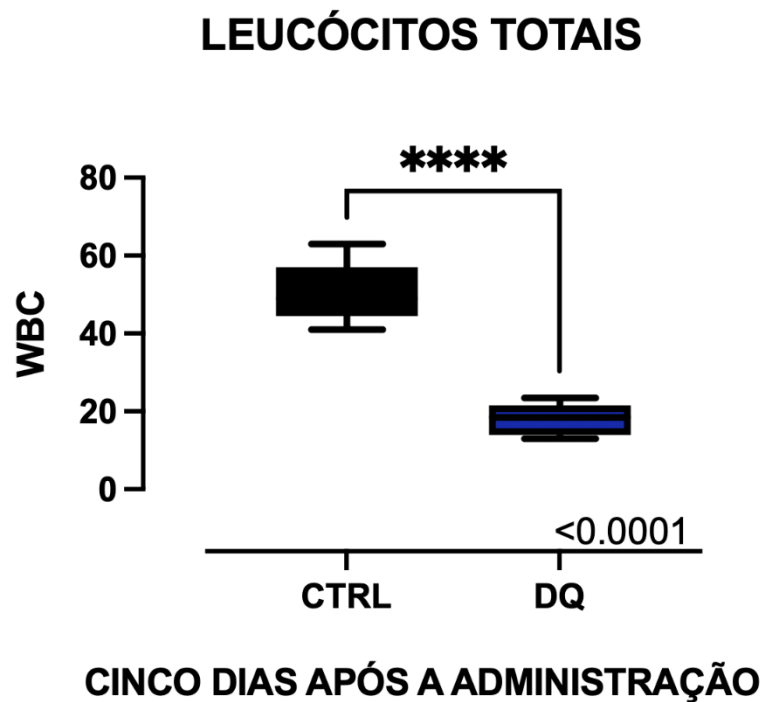


Figura 17 - Contagem total de leucócitos (WBC) em camundongos tratados com Diquat (n = 5) em comparação ao grupo controle (n = 5), cinco dias após a administração. As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. A análise estatística foi realizada por teste de t não pareado. ****p < 0,0001.

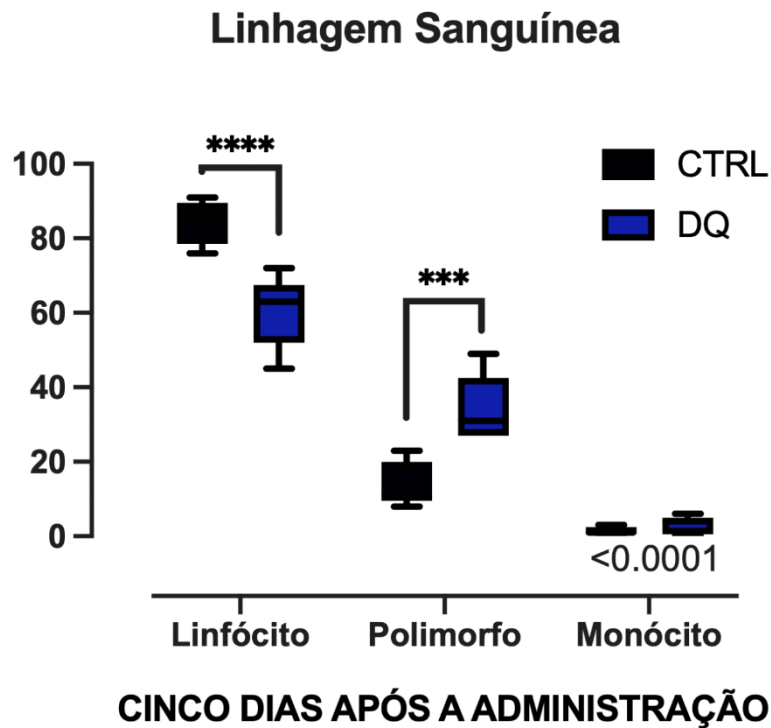


Figura 18 - Alterações nas linhagens sanguíneas de camundongos cinco dias após a administração de Diquat (DQ n=5) em comparação com o grupo controle (CTRL n=5). As barras representam a mediana e o erro padrão dos dados. Análise estatística realizada por two-way ANOVA. ***<0,001; ****<0,0001.

Ao analisarmos a evolução ponderal dos animais, ficou evidente uma expressiva perda de peso nos animais tratados com o diquat (Figura 19). Do primeiro ao quinto dia após o tratamento com o diquat, os animais apresentaram aproximadamente 20% de perda de peso. A partir do terceiro dia, o grupo Diquat continua a apresentar maior perda de peso, estabilizando em torno de 25% até o quinto dia. O grupo de controle manteve-se sem variações significativas.

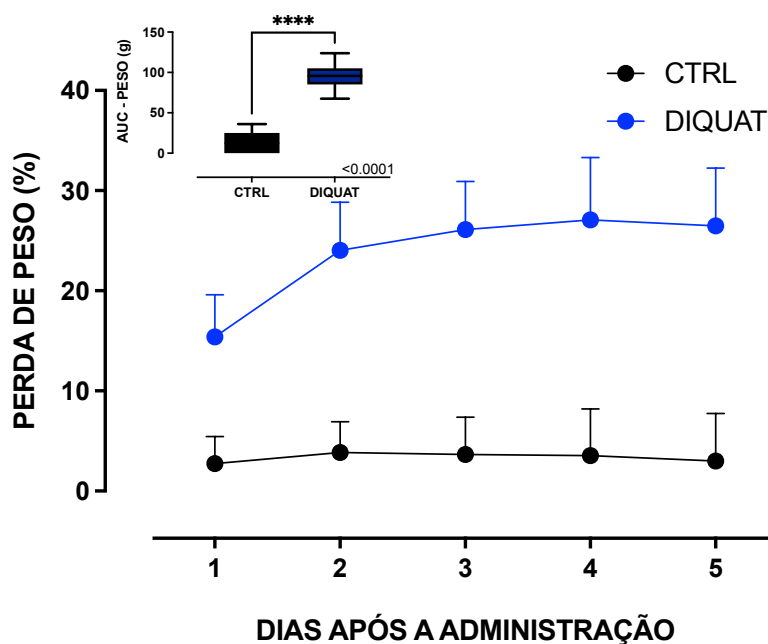


Figura 19 - Perda de peso corporal percentual (%) em camundongos tratados com Diquat em comparação com o grupo controle (CTRL) ao longo de cinco dias após a administração. O grupo controle (n=9) e o grupo tratado com Diquat (n=24) foram monitorados para avaliação da variação de peso. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA. ****p<0,0001. A inserção no canto superior representa a análise AUC por teste de t não pareado.

4.3 Histopatologia renal

A análise histológica renal revelou alterações morfológicas marcantes nos animais tratados com Diquat. Na amostra controle (Figura 20A), observa-se preservação da arquitetura renal, com túbulos contorcidos proximais e distais bem-organizados, além de glomérulos íntegros e ausência de alterações estruturais evidentes, caracterizando um parênquima renal saudável.

Em contraste, os animais expostos ao Diquat apresentaram múltiplas alterações compatíveis com lesão renal aguda. A Figura 20B evidencia edema nos capilares glomerulares e congestão vascular (seta branca), indicando comprometimento hemodinâmico e inflamatório precoce. Já na Figura 20C, observa-se necrose glomerular associada a extravasamento de conteúdo celular para o espaço de Bowman (cabeça de seta), sugerindo dano glomerular avançado.

A análise dos túbulos revela descamação epitelial acentuada e presença de cristais hialinos no interior tubular (Figura 20D), compatíveis com necrose tubular aguda. A Figura 20E demonstra necrose tubular difusa, com desestruturação dos

túbulos renais e citoplasma fortemente eosinofílico, corroborando a lesão celular irreversível induzida pelo Diquat.

Por fim, a Figura 20F destaca a presença de edema intersticial associado à infiltração de células inflamatórias e degeneração glomerular (asterisco), apontando para um processo inflamatório mais avançado com comprometimento da matriz extracelular e possível progressão para fibrose intersticial.

Esses achados histopatológicos reforçam os dados funcionais de disfunção renal previamente descritos, evidenciando que a exposição ao Diquat resulta em lesões estruturais graves tanto em túbulos quanto em glomérulos, além de desencadear resposta inflamatória intersticial significativa.

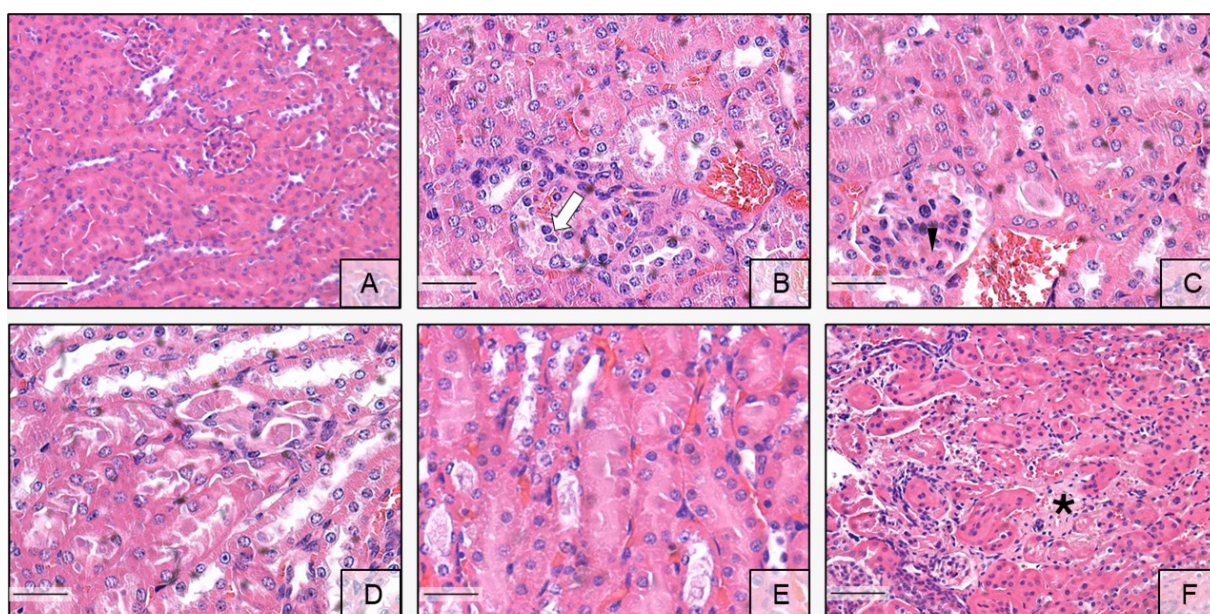


Figura 20 - Fotomicrografias do rim de camundongos expostos ao Diquat, avaliando alterações histomorfológicas. (A) Rim normal, com túbulos e glomérulos preservados na região cortical (escala: 200 μm). (B) Rim exposto ao Diquat, apresentando edema nos capilares glomerulares e congestão (Seta Branca). (C) Área de necrose glomerular com extravasamento para o espaço de Bowman (Cabeça de seta). (D) Descamação tubular com presença de cristais hialinos. (E) Necrose tubular. (F) Edema intersticial com infiltração de células inflamatórias e degeneração glomerular. Escalas: (B-F) 50 μm . Aumento.

A análise histopatológica dos rins, realizada cinco dias após a administração do Diquat, revelou alterações estruturais significativas quando comparadas ao grupo controle. Os escores atribuídos variaram de 0 a 3, baseando-se na porcentagem de estruturas renais acometidas. Observou-se que os animais do grupo DQ apresentaram níveis maiores significativo nos escores histopatológicos (mediana = 5), indicando danos acentuados tanto em túbulos quanto em glomérulos (Figura 21). Esses achados incluem retração e esclerose glomerular, isquemia, dilatação tubular,

edema intersticial, presença de cilindros e inflamação (Figura 21). Já o grupo controle manteve escore baixo, com nenhuma alteração morfológica (mediana = 0). Os dados reforçam o impacto citotóxico do Diquat sobre a arquitetura renal, corroborando as alterações funcionais já demonstradas nos parâmetros bioquímicos e de excreção urinária.

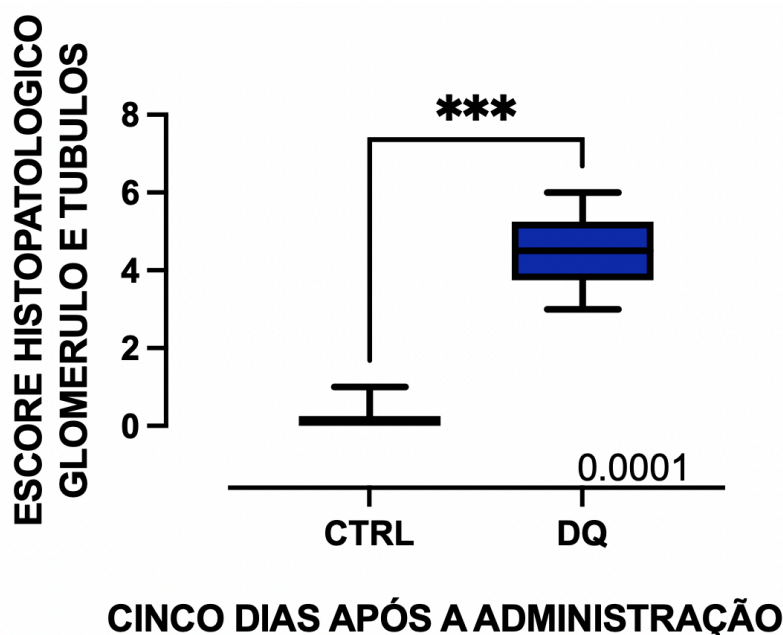


Figura 21 - Escore histopatológico renal em camundongos cinco dias após administração de Diquat. A avaliação semiquantitativa considerou alterações em glomérulos, túbulos e interstício, com escores de 0 a 3 conforme a gravidade e extensão da lesão. Os animais do grupo (DQ n=10) apresentam níveis maiores significativo nos escores quando comparados ao grupo controle (CTRL, n=10). Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil. Teste de Mann–Whitney $p^* 0.0001$.

4.4 Efeitos do tratamento com o diquat sobre a função vascular

Para análise da resposta vascular ao tratamento com o diquat, foram avaliadas as respostas vasodilatadoras dependentes de endotélio (estimulada com ACh) e as respostas contrateis estimuladas com o agonista alfa-1 adrenérgico fenilefrina. A resposta dos anéis de aorta à acetilcolina (ACh) após diferentes tempos de exposição ao Diquat (DQ) (3, 72 e 120 horas), mostrou que após 3h de tratamento dos animais (DQ 3H) não houve alteração dos níveis de relaxamento (Figura 22). Contudo, após 72 h (3 dias) de exposição ao diquat (DQ 72H) pudemos observar um prejuízo da resposta vasodilatadora dependente de endotélio caracterizada por deslocamento da curva de relaxamento para a direita, com aumento do EC50%, apesar da preservação

do Emax (Figura 22). Por outro lado, com o passar do tempo, pudemos observar uma mudança significativa do perfil de resposta vasodilatadora após o tratamento com o diquat. Após 120 h (5 dias; DQ 120H) de exposição, pudemos observar uma potencialização da resposta vasodilatadora caracterizada por uma redução do EC50%, com deslocamento significativo da curva de relaxamento para a esquerda (Figura 22).

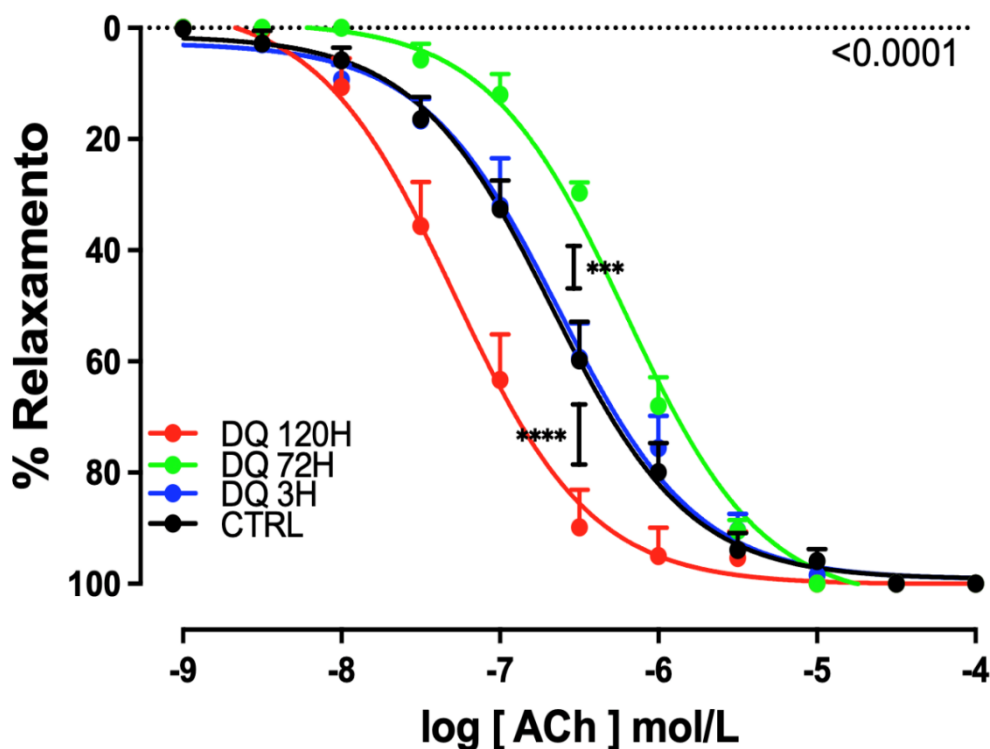


Figura 22- Efeito do tratamento com DQ no relaxamento vascular induzido por acetilcolina (ACh) em aorta de camundongos. As curvas representam os grupos controle (CTRL, n=8), DQ 3 horas (DQ 3H, n=8), DQ 72 horas (DQ 72H, n=8) e DQ 120 horas (DQ 120H, n=8). Os dados foram expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, indicando diferenças significativas: *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

A análise da resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina, diferentemente da resposta a ACh, nos demonstrou que, independentemente do tempo de exposição (a partir de 3h), a resposta vasoconstritora foi significativamente reduzida (Figura 23). Contudo, apesar da redução em todos os tempos, a resposta foi mais acentuada no tempo de 120 h (5 dias) (Figura 23).

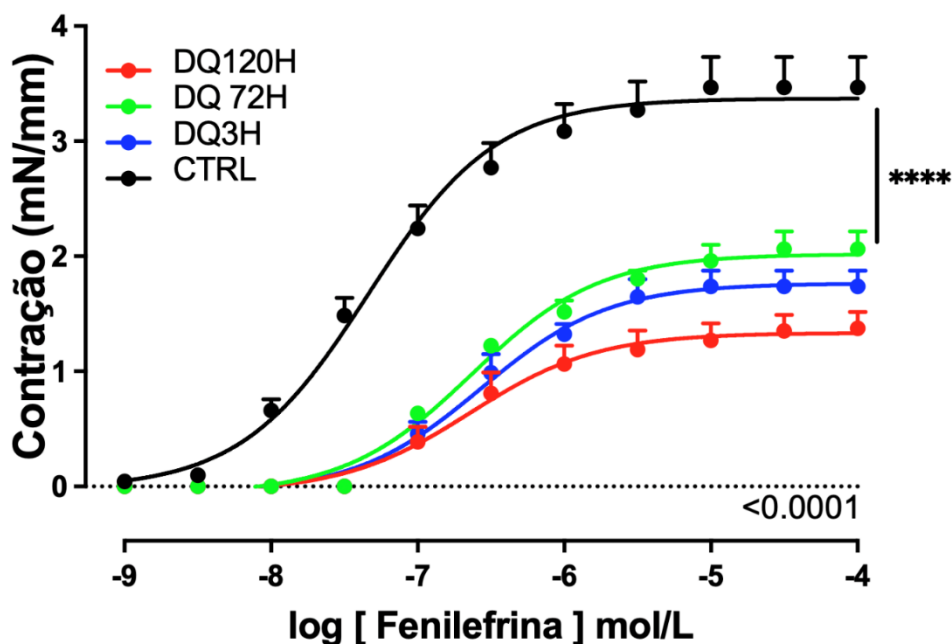


Figura 23 - Efeito do tratamento com DQ na contração vascular causada por fenilefrina (FE) na aorta de camundongos. As curvas representam os grupos controle (CTRL, n=8), DQ 3 horas (DQ 3H, n=8), DQ 72 horas (DQ 72H, n=8) e DQ 120 horas (DQ 120H, n=8). A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças importantes: $p < 0,0001$.

Como a resposta vasoconstritora foi mais significativamente afetada pela exposição ao diquat, resolvemos avaliar o impacto do tratamento dos animais com as nanopartículas de ouro (GNP) sobre tais alterações. Utilizamos diferentes doses das GNP para analisar um efeito dependente da dose. Utilizamos o tempo de 3h de exposição por ser um tempo de tratamento que alterou significativamente a resposta contrátil, mas com menores impactos sistêmicos que poderiam, por si só, modular a função vascular. Para o tempo de 3 h de exposição, duas doses (0,39 e 3,94 mg/kg) não apresentaram qualquer efeito modulador da contração e dose de 1,97 mg/kg reduziu o efeito contrátil a fenilefrina (Figura 24). Por outro lado, a menor dose utilizada (0.19 mg/kg), restaurou parcialmente a resposta vasoconstritora (Figura 24).

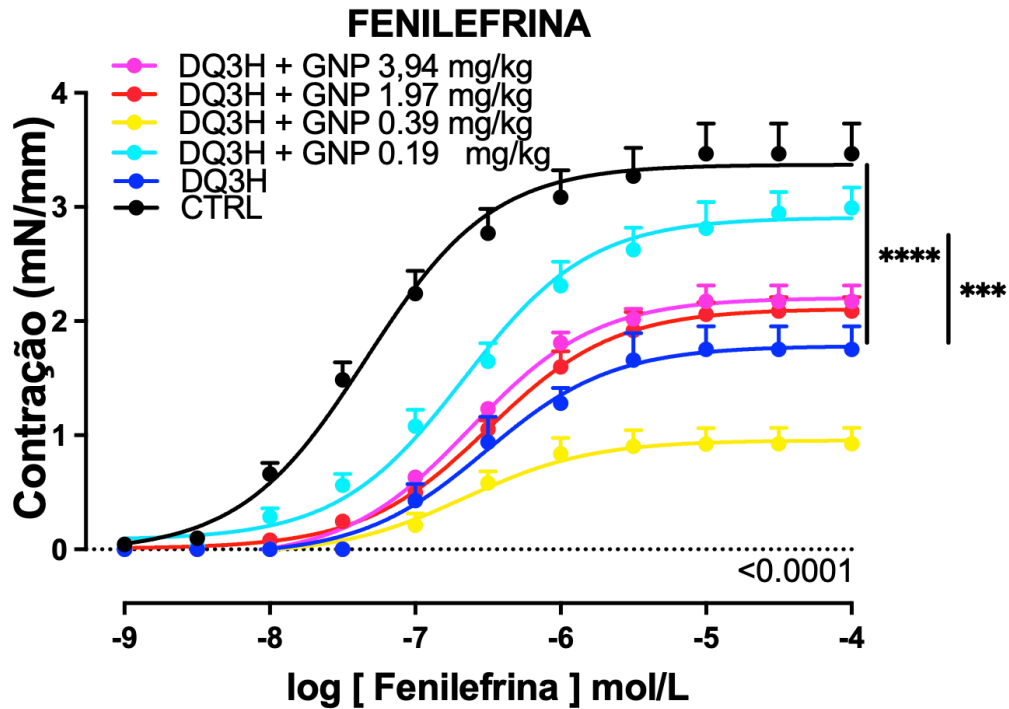


Figura 24 - Efeito do tratamento dos animais com GNP sobre contração vascular induzida por fenilefrina (FE) em camundongos tratados por 3h com diquat. As curvas representam os grupos controle (CTRL, n=6), DQ 3 horas (DQ 3H, n=6) e os grupos tratados com diferentes doses de nanopartículas de ouro (GNP): 0,195; 0,39; 1,97 e 3,94 mg/kg, simultaneamente a exposição ao DQ (n=6 por grupo). Os dados foram expressos como média±EPM. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças importantes: *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Como a dose de 0,195 mg/kg foi a mais efetiva em reverter os efeitos do diquat sobre a contração vascular, utilizamos a mesma para os experimentos seguintes. Primeiramente, resolvemos avaliar se esta dose das GNP, por si só, modulariam a função vascular. O tratamento dos animais com 0.19 mg/kg de GNP não alterou o perfil contrátil vascular (Figura 25). Ao se comparar o efeito benéfico do tratamento com 0.19 mg/kg de GNP concomitante a 3 e 24h de exposição ao diquat, pudemos observar que, independentemente do tempo de exposição ao diquat, o tratamento *in vivo* com as GNP reverteu parcialmente os danos sobre a contração, aumentando o Emax para níveis próximos ao controle (Figura 25).

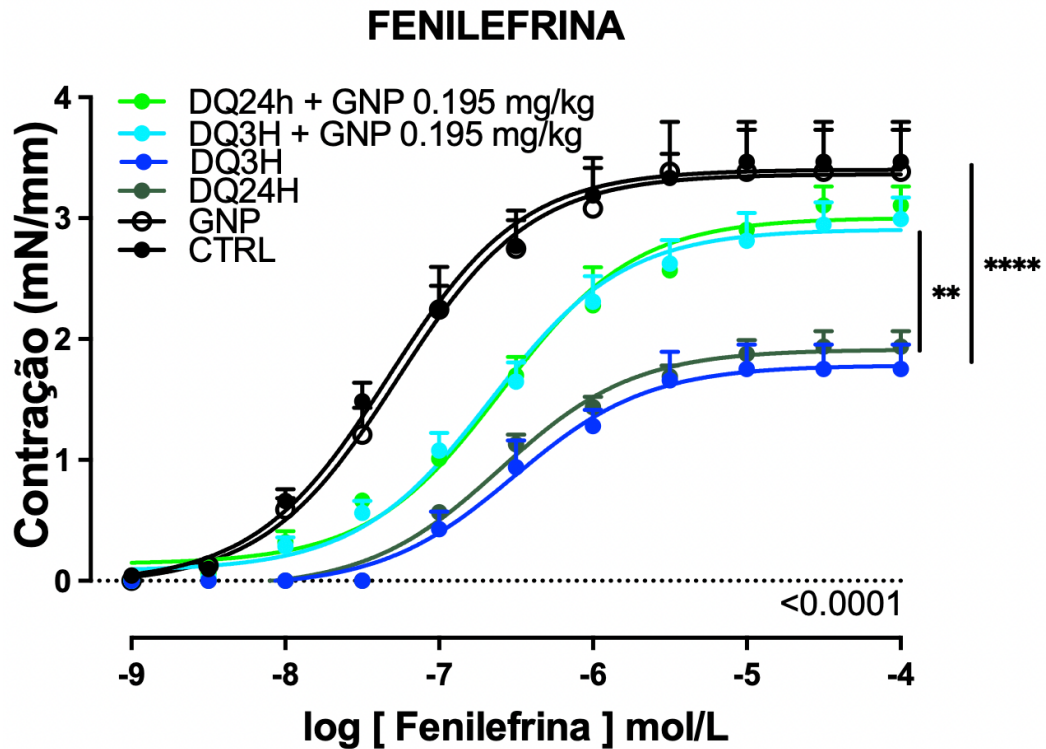


Figura 25 - Efeito do tratamento dos animais com 19 mg/kg de GNP simultaneamente a 3 ou 24 h de exposição ao diquat. As curvas representam os grupos controle (CTRL, n=6), DQ 3 horas (DQ 3H, n=6), DQ 24h horas (DQ 24H, n=6), DQ 3 horas + GNP (n=6), e DQ 24 horas + GNP (n= 6). Os dados foram expressos como média±EPM. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA, com diferenças importantes: **p<0,01; ****p<0,0001.

4.5 Análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio e no em aorta

A análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio e NO foi realizada em cortes congelados de aorta dos animais tratados. O efeito do tratamento *in vivo* com as GNP foi avaliado após 3 e 24 horas com as GNP, antes do processo de congelamento e processamento.

Após 3h de exposição ao diquat, já pudemos observar um níveis maiores significativo dos níveis de ROS, como exemplificado pelo aumento da fluorescência do DHE (Figura 26). Além disso, após 24h de exposição ao diquat, também pudemos observa níveis maiores significativo dos níveis de ROS, porém em maior escala do que em 3h (Figura 27). Contudo, independente do tempo de exposição ao diquat (3 ou 24h), o tratamento com as GNP reverteu completamente os níveis de ROS, sugerindo um importante efeito antioxidante vascular (Figuras 26 e 27).

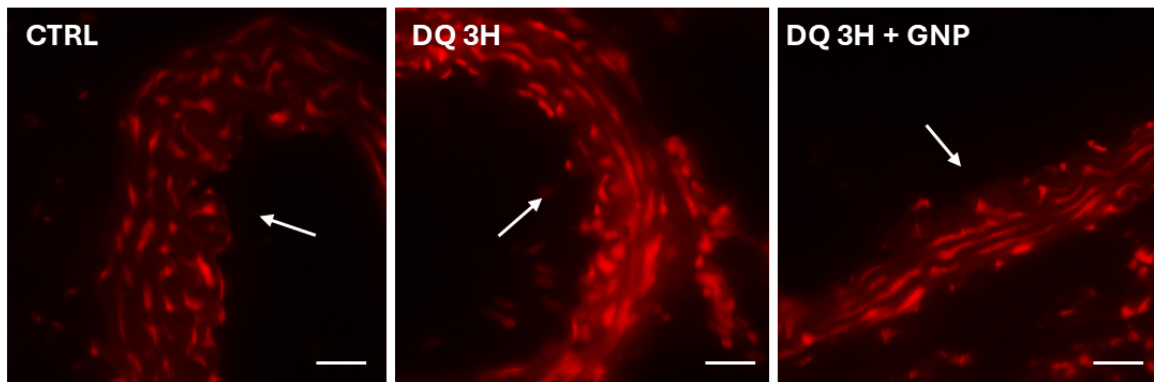
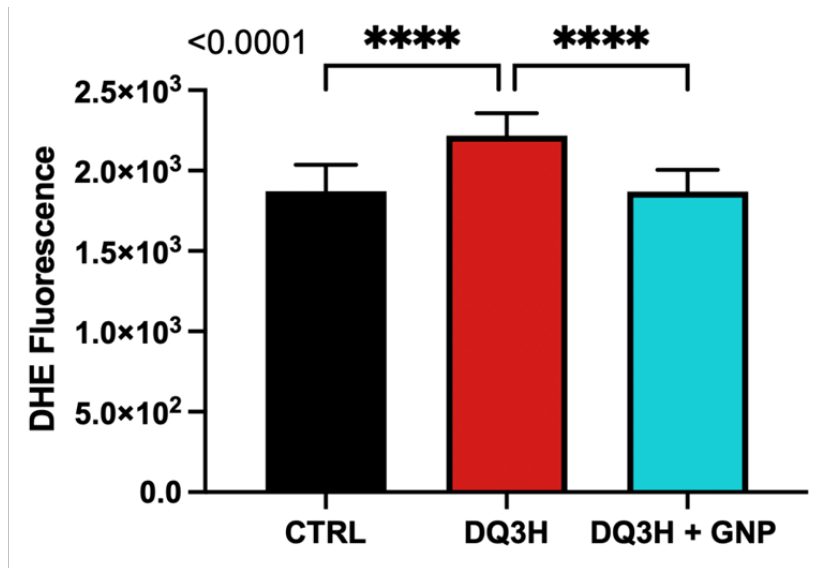


Figura 26 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em aortas de camundongos tratados por 3h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DHE de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada íntima do vaso. As barras representam a escala de 10 μ m. CTRL: controle; DQ 3H: diquat 3h; DQ 3H + GNP: diquat 3h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como Média \pm EPM da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: **** $p < 0,0001$.

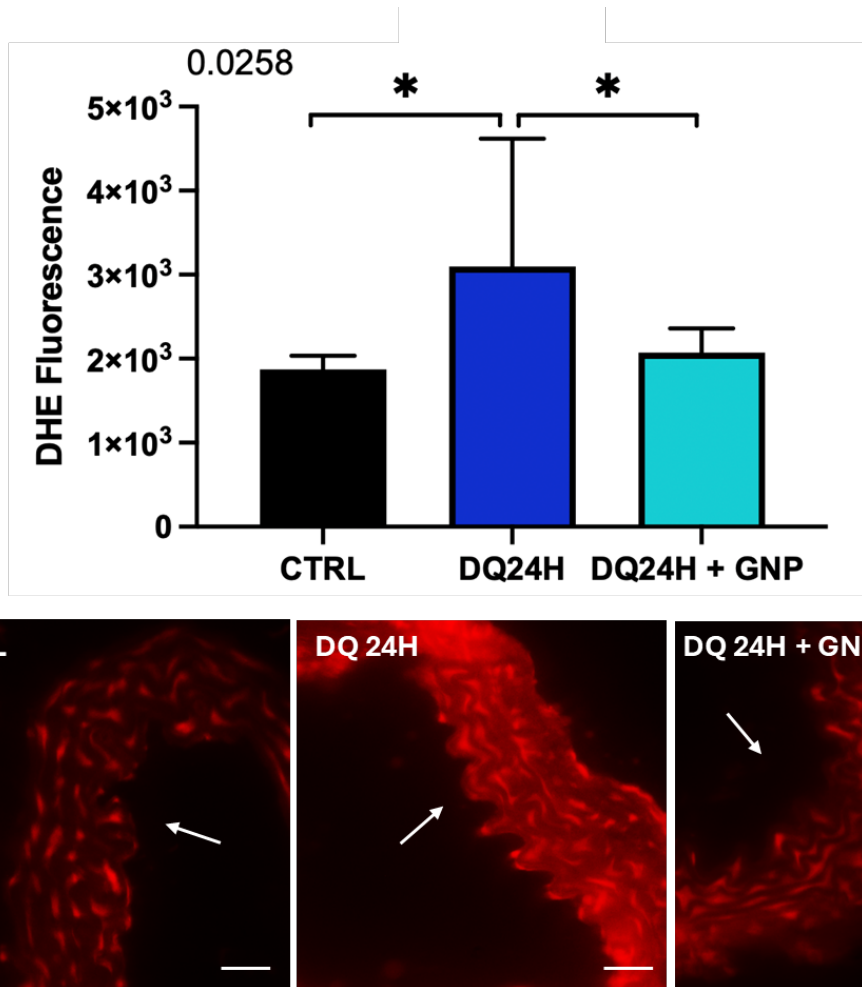


Figura 27 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em aortas de camundongos tratados por 24h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DHE de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada íntima do vaso. As barras representam a escala de 10 μm. CTRL: controle; DQ 24H: diquat 24h; DQ 24H + GNP: diquat 24h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como Média±EPM da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: *p<0,05.

A análise dos níveis de NO, inferido pela fluorescência da sonda DAF, nos mostraram que tanto o tratamento com o diquat por 3 ou 24h elevaram de maneira significativa os níveis de NO (Figuras 28 e 29). Em termos de valores absolutos, podemos observar que os níveis de fluorescência nos vasos tratados por 24h com o diquat são maiores que os encontrados após 3h de tratamento (Figuras 28 e 29). Contudo, diferentemente do que observamos com os níveis de ROS, o tratamento com 0.19 mg/kg de GNP não revertem o aumento nos níveis de NO induzido pelo diquat em ambos os tempos (Figuras 28 e 29).

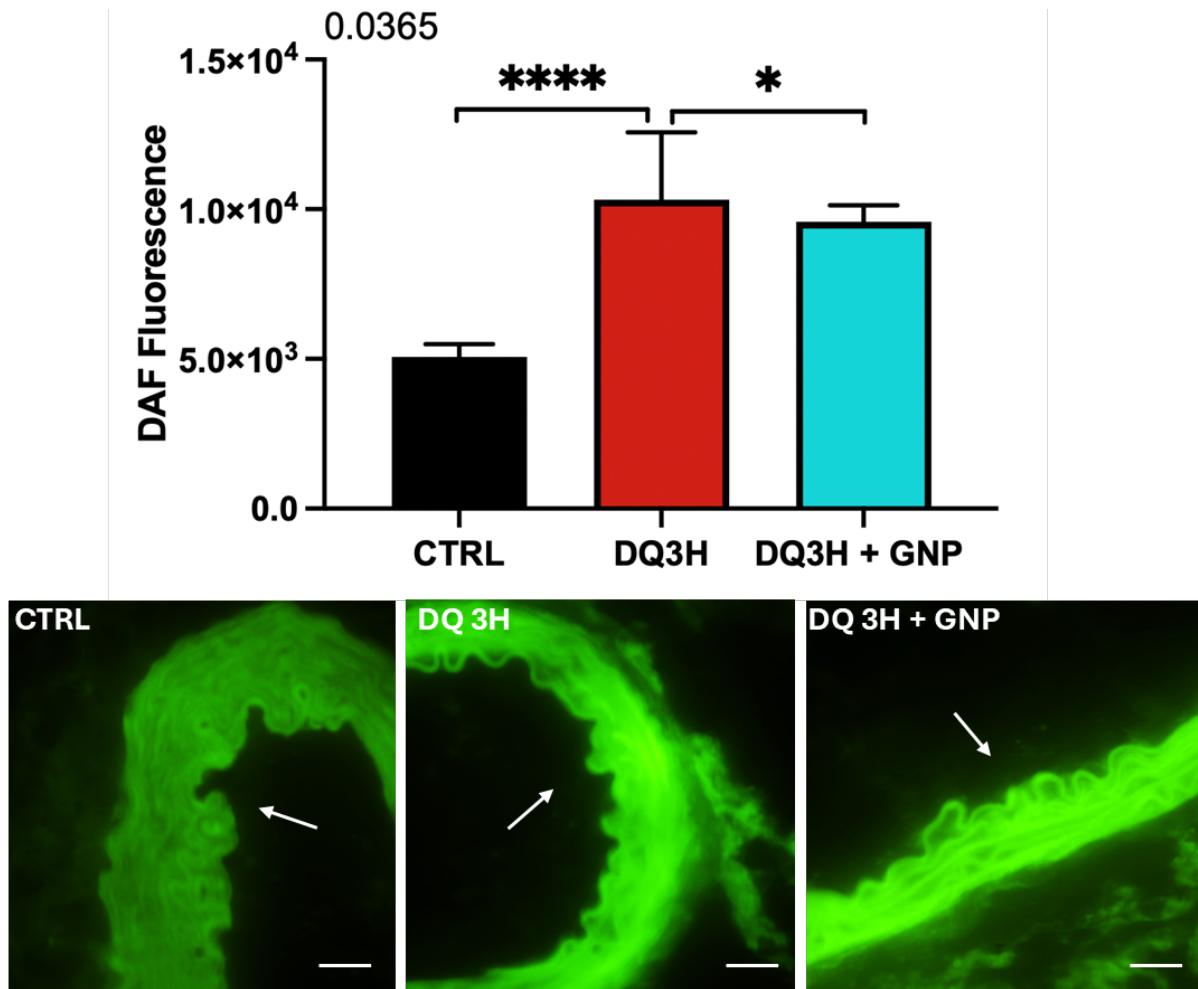


Figura 28 - Produção de NO em aortas de camundongos tratados por 3h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DAF de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada íntima do vaso. As barras representam a escala de 10 μ m. CTRL: controle; DQ 3H: diquat 3h; DQ 3H + GNP: diquat 3h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como Média \pm EPM da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: * p <0,05; **** p <0,0001.

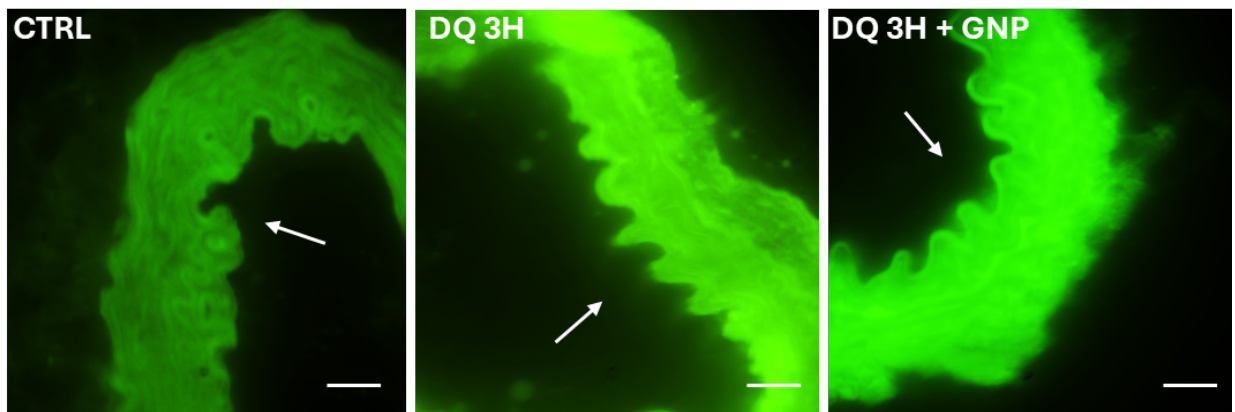
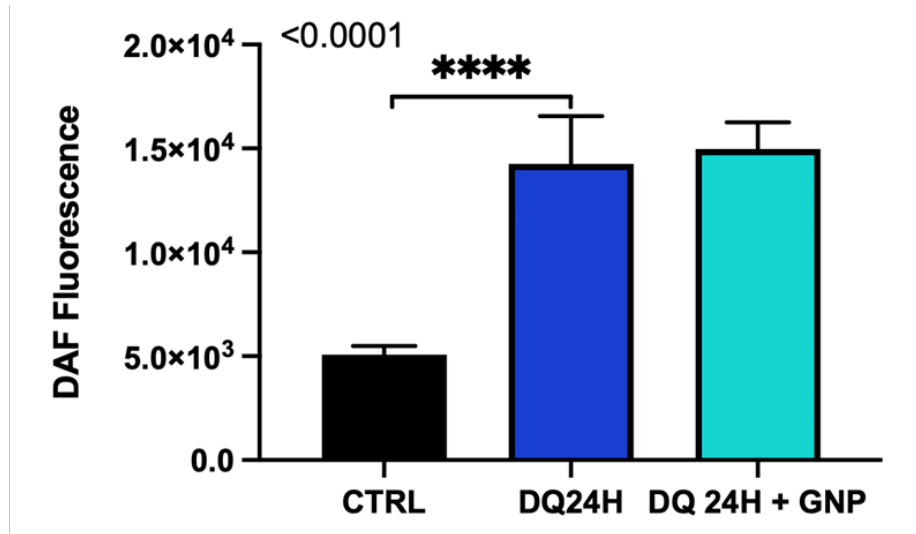


Figura 29 - Produção de NO em aortas de camundongos tratados por 24h com Diquat e/ou GNP. O gráfico de barras representa os valores médios da intensidade de fluorescência do DAF de pelo menos 3 campos distintos aleatórios de 5 animais diferentes. As imagens são representativas dos valores médios de cada grupo. AS setas apontam para a camada íntima do vaso. As barras representam a escala de 10 μ m. CTRL: controle; DQ 24H: diquat 24h; DQ 24H + GNP: diquat 24h + tratamento in vivo com 0.19 mg/kg de GNP. Os dados foram expressos como $\text{Media} \pm \text{EPM}$ da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, com diferenças significativas entre os grupos: **** $p < 0,0001$.

5. Discussão

O presente estudo sugere, de forma consistente e inédita, 5 pontos importantes: 1) o diquat induz importante disfunção hidroeletrólítica e renal caracterizada por perda progressiva da função renal até o quinto dia de tratamento; 2) o diquat induz importante disfunção do relaxamento dependente de endotélio vascular caracterizada por modulação positiva ou negativa (dependendo do tempo de exposição); 3) o diquat induz hiporresponsividade contrátil vascular, independente do tempo de exposição; 3)

o tratamento com nanopartículas de ouro reverte parcialmente a função contrátil vascular; 5) o tratamento com as GNP reduzem os níveis vasculares de ROS mas não de NO após a exposição ao diquat.

A administração de Diquat desencadeou alterações fisiológicas, bioquímicas, hematológicas, vasculares e histopatológicas compatíveis com lesão renal aguda oligúrica e disfunção endotelial mediada por estresse oxidativo. Esses achados são consistentes com a toxicodinâmica descrita por Magalhães et al. (2018) ^[1], que destaca a rápida distribuição do Diquat para tecidos altamente perfundidos, como rins e fígado, provocando estresse oxidativo sistêmico.

Logo após a administração do Diquat, observamos uma queda acentuada na ingestão de água e ração, com impacto direto no peso corporal dos animais — perda próxima a 30% — já nas primeiras 48 horas. Esses efeitos estão de acordo com os relatos de Magalhães et al. (2018) ^[1] e Mao et al. (2022) ^[9], que relacionam a inibição dos centros de sede e apetite à neurotoxicidade e à inflamação induzida por compostos redox ativos.

Os parâmetros renais revelaram alterações compatíveis com um quadro de injúria renal aguda oligúrica: fluxo urinário significativamente reduzido, balanço hídrico positivo, baixa fração de excreção de água (FE H₂O) nos primeiros dias e aumento posterior da FE H₂O sem recuperação da TFG ou depuração de creatinina. Esses achados sugerem transição para fase poliúrica associada à falência tubular, como observado por Wu et al. (2022) ^[2] e Sena et al. (2018) ^[10]. Além disso, os níveis plasmáticos de ureia e creatinina estavam elevados, indicando prejuízo na função renal, embora a elevação da ureia possa ter sido atenuada por disfunção hepática concomitante, conforme discutido por Dinis-Oliveira et al. (2006) ^[3].

A análise da proteinúria revelou um pico no primeiro dia, seguido de redução progressiva. A razão proteína/creatinina urinária (UP/Cr) apresentou padrão semelhante. Isso sugere lesão glomerular inicial, com perda da barreira de filtração, seguida por dano tubular com redução na reabsorção e transporte ativo. A queda acentuada da enzima γ -GT urinária após o primeiro dia corrobora esse padrão, indicando necrose tubular e perda de células produtoras da enzima, em linha com os achados de Fu et al. (2021) ^[11].

A histopatologia renal confirmou os achados funcionais. Foram observadas alterações estruturais intensas: necrose tubular, edema intersticial, infiltrado inflamatório, descamação epitelial e cristais hialinos. A presença de necrose glomerular e colapso do espaço de Bowman foi particularmente marcante, refletindo dano glomerular avançado. O escore histopatológico semiquantitativo foi significativamente maior no grupo tratado com Diquat (mediana 5), reforçando a hipótese entre injúria estrutural e disfunção funcional. Estudos de Choi et al. (2018) [12] relatam que o Diquat ativa vias como NF-κB/p53, promovendo apoptose e inflamação, o que reforça a interpretação dos danos observados.

Bonneh-Barkay et al. (2005) [5] e Choi et al. (2018) [12] descreveram alterações imunológicas compatíveis com leucopenia após exposição a pesticidas redox ativos, incluindo o Diquat. Nosso estudo também sugere leucopenia associada à redução significativa de linfócitos, mas com aumento de monócitos e polimorfonucleares. Tais alterações sugerem imunossupressão e resposta inflamatória sistêmica desregulada.

Além dos achados renais e hematológicos, a literatura é consistente no que diz respeito aos efeitos vasculares de pesticidas como o paraquat. Vários trabalhos relatam diversas alterações de ordem oxidativa ou inflamatória vasculares, dependendo das doses de pesticida utilizadas, via de administração, modelo animal ou celular e tempo de exposição [10,12,24]. Contudo, apesar de alguns trabalhos sugerindo complicações sistêmicas pela intoxicação ao diquat, não existem trabalhos descrevendo os efeitos vasculares do mesmo. Em nosso estudo, a função vascular foi profundamente afetada pela administração IP de diquat. O relaxamento dependente de endotélio foi comprometido ao longo do tempo de exposição ao Diquat, evidenciando perda progressiva da função endotelial. Após 3h de exposição, não houve alteração do padrão de relaxamento vascular. Contudo, após 3 dias de tratamento, pudemos observar um prejuízo na resposta vasodilatadora caracterizada por deslocamento da curva concentração-resposta para a direita e consequente aumento no EC50%. Este fato talvez possa ser explicado pelo aumento dos níveis de ROS já após 3h de exposição. Estudos como os de Fu et al. (2021) [11] e Sena et al. (2018) [10] apontam o estresse oxidativo como mecanismo central na toxicidade do Diquat. A literatura é vasta e consistente no que diz respeito a redução da biodisponibilidade de NO frente a aumento nos níveis de ROS induzidos,

principalmente por pesticidas^[10,24]. O NO reage rapidamente com radicais superóxido, formando radicais peroxinitrito (ONOO⁻)^[10,24]. Além da redução do NO, os radicais peroxinitrito também apresentam efeito contrátil, o que pode contribuir para a perda da resposta vasodilatadora dependente de endotélio. Essa hipótese é sustentada pelos trabalhos de Aires et al. (2013)^[24] e Dinis-Oliveira et al. (2006)^[3], que demonstram o comprometimento da sinalização endotelial pela superprodução de espécies reativas de oxigênio.

Por outro lado, após 5 dias de exposição ao diquat, encontramos potencialização da resposta vasodilatadora a ACh. Apesar de aparentemente contraditórios, estes dados sugerem, juntamente com os dados do perfil hematológico e renal, que existe um processo inflamatório sistêmico, com possível impacto vascular. Durante a instalação e progressão da inflamação vascular, vários trabalhos demonstram de maneira consistente que tanto o estresse oxidativo quanto a produção de citocinas e quimiocinas como TNF, IL-6 e IL-1 levam a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ b e consequente ativação da expressão da iNOS^[24]. Uma vez expressa, a iNOS tem efeito anticontrátil ou facilitador do relaxamento vascular por produzir níveis relativamente altos de NO^[24]. No nosso estudo, encontramos níveis elevados de NO já após 24h de exposição ao diquat, o vai ao encontro destes dados da literatura.

A introdução das nanopartículas de ouro (GNP), sobretudo na dose de 0.19 mg/kg, foi capaz de reduzir os níveis de ROS e modular a produção de NO após 3h e 24h de exposição. Essa intervenção resultou em recuperação parcial da resposta à fenilefrina, como também demonstrado por Dykman e Khlebtsov (2012)^[7], Brandenberger et al. (2010)^[8], e Alomari et al. (2020)^[20], que evidenciaram propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias das GNPs. Curiosamente, mesmo quando os níveis de NO se mantiveram elevados, a redução de ROS foi suficiente para restaurar parcialmente a função vascular, sugerindo que a disponibilidade efetiva de NO é mais importante que sua produção absoluta, conforme proposto por Hatcher et al. (2008)^[6].

A recuperação parcial da contratilidade vascular nos grupos tratados com GNP — principalmente na menor dose — reforça a ação redox moduladora dessas partículas, além de sugerir possível influência sobre a sensibilidade α -adrenérgica, conforme descrito por Dykman e Khlebtsov (2012)^[7] e Khan et al. (2018)^[19].

Os efeitos protetores observados com o uso das GNPs neste modelo reforçam a hipótese de que tais partículas exercem ações ativas na regulação da resposta inflamatória e oxidativa. Como já relatado em estudos anteriores, as nanopartículas de ouro interagem com células imunocompetentes, modulam a produção de EROs e influenciam vias como NF- κ B, COX-2 e iNOS, sendo capazes de reduzir injúrias teciduais de forma dependente do contexto e da dosagem^{13, 14, 19, 21, 23}. Portanto, os dados aqui obtidos corroboram o entendimento atual de que as GNPs não atuam de forma inerte, mas sim como agentes moduladores com ação farmacológica relevante.

Portanto, os dados obtidos demonstram que a toxicidade induzida pelo Diquat afeta múltiplos sistemas, promovendo disfunção renal, vascular e hematológica de forma rápida e intensa, mediada por estresse oxidativo e inflamação. A aplicação de GNPs mostrou efeito benéfico na recuperação parcial desses parâmetros, especialmente na proteção vascular. Esses achados reforçam a necessidade de explorar o uso terapêutico das nanopartículas de ouro como agentes antioxidantes em contextos de toxicidade aguda. Estudos adicionais, como os de Ma et al. (2020)^[18] e Choi et al. (2011)^[17], também defendem o uso das GNPs como uma alternativa promissora em distúrbios relacionados ao desequilíbrio redox.

6. Conclusão

O presente estudo demonstrou que o Diquat induz toxicidade sistêmica aguda com lesão renal, inflamação hematológica e disfunção vascular. A exposição resultou em insuficiência renal oligúrica com alterações funcionais e estruturais marcantes, além de disfunção endotelial associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção compensatória de óxido nítrico (NO).

As nanopartículas de ouro (GNPs), embora não avaliadas diretamente no eixo renal, mostraram efeito benéfico sobre a função vascular, promovendo redução de ROS, modulação de NO e restauração parcial da reatividade contrátil. Esses dados sugerem que as GNPs atuam como agentes redox-moduladores com potencial terapêutico.

Conclui-se que o Diquat afeta múltiplos sistemas por mecanismos mediados por estresse oxidativo e inflamação, e que as GNPs representam uma estratégia promissora para mitigar esses efeitos. Estudos futuros focados na aplicação das GNPs na lesão renal aguda induzida por Diquat poderão ampliar sua aplicabilidade clínica.

7. Limitações e perspectivas

Apesar dos resultados consistentes obtidos neste estudo, algumas limitações metodológicas devem ser reconhecidas. A principal delas refere-se à ausência de dados funcionais diretos sobre o efeito das nanopartículas de ouro (GNPs) no eixo renal. Embora tenha sido demonstrado um efeito vasculoprotetor das GNPs, não foi possível, dentro do tempo disponível para a realização do mestrado, avaliar seu impacto em parâmetros metabólicos urinários e bioquímicos renais por meio da gaiola metabólica.

Além disso, o presente estudo concentrou-se na fase aguda da lesão induzida pelo Diquat. Perspectivas futuras incluem a aplicação de um modelo experimental crônico, com doses cumulativas mais baixas, capazes de mimetizar uma progressão para disfunção renal persistente. Nesse contexto, pretende-se avaliar o potencial das GNPs como agentes redox-moduladores na reversão de processos fibróticos e inflamatórios associados à lesão renal crônica.

Tais desdobramentos estão em planejamento para a continuidade do projeto em nível de doutorado, com enfoque na caracterização morfofuncional e molecular do efeito terapêutico das GNPs em modelos prolongados de nefrotoxicidade.

8. Referências bibliográficas

1. Magalhaes, N.; Carvalho, F.; Dinis-Oliveira, R.J. Humans and experimental toxicology of diquat poisoning: Toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment. *Journals Sagepub*. 2018; Vol 37 (11) 1131-1160. Doi: 10.1177/0960327118765330. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29569487/>
2. Wu, Y.; Cui, S.; Wang, W. et al. Kidney and Lung injury in rats following acute diquat exposure. *Experimental and Therapeutic Medicine* 23: 275. (2022). Doi: 10.3892/etm.2022.11201. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35251341/>
3. Dinis-Oliveira, R.J.; Remiao, F.; Carmo, H. et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *NeuroToxicology* 27 (2006), 1110-1122. Doi: 10.1016/j.neuro.2006.05.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16815551/>
4. Djukic, M.; Jovanovic, M.; Ninkovic, M.; et al. Intrastratial pre-treatment with L-NAME protects rats from diquat neurotoxicity. *Annals of agricultural and Environmental Medicine*, Vol 19, No4, 666-672. (2012). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23311786/>
5. Bonneh-Barkay, D.; Langston, W.J.; Monte, A.D.; et al. Toxicity of Redox Cycling Pesticides in Primary mesencephalic cultures. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol.7, Numbers. 5 & 6, (2005). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15890009/>
6. Hatcher, J.M.; Pennell, K.D.; Miller, G.W. Parkinsons Disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 June; 29(6): 322-329. Doi: 10.1016/j.tips.2008.03.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18453001/>
7. (Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev*. 2012;41(6):2256-2282.) Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22130549/>
8. Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Mühlfeld C, Schmid O, Ferron G, Maier K et al. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;242(1):56-65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19796648/>

9. MAO, Z. et al. Simultaneous determination of diquat and its two primary metabolites in rat plasma by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the toxicokinetic study. **Forensic toxicology**, v. 40, n. 2, p. 332–339, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36454415/>
10. SENA, C. M. et al. Vascular oxidative stress: Impact and therapeutic approaches. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1668, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30564132/>
11. FU, Q. et al. Resveratrol attenuates diquat-induced oxidative stress by regulating gut Microbiota and metabolome characteristics in piglets. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 695155, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34322107/>
12. CHOI, S. E.; PARK, Y. S.; KOH, H. C. NF- κ B/p53-activated inflammatory response involves in diquat-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1005–1018, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29484840/>
13. (Leibfarth J, Persellin R. Review: Mechanisms of action of gold. Agents and Actions. 1981;11(5):458-472.). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7039267/>
14. JP Almeida, ER Figueroa, RA Drezek, Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy, *Nanomedicine* 10 (3) (2014) 503–514. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24103304/>
15. H. Lee, MY Lee, SH Bhang, BS Kim, YS Kim, JH Ju, KS Kim, SK Hahn, Hyaluronate-gold nanoparticle/tocilizumab complex for the treatment of rheumatoid arthritis, *ACS Nano* 8 (5) (2014) 4790–4798. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24730974/>
16. MF Serra, AC Cotias, AS Pimentel, ACS Arantes, ALA Pires, M. Lanzetti, J. M. Hickmann, E. Barreto, VF Carvalho, PMRE Silva, RSB Cordeiro, M. A. Martins, Gold Nanoparticles Inhibit Steroid-Insensitive Asthma in Mice Preserving Histone Deacetylase 2 and NRF2 Pathways. 11 (9) (2022) 1659. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36139733/>
17. CH Choi, JE Zuckerman, P. Webster, ME Davis, Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size, *Proc. Nacional. Acad. Ciência. EUA* 108 (2011) 656–661, <https://doi.org/>

- 10.1073/pnas.1103573108. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21464325/>
18. Y. Ma, F. Cai, Y. Li, J. Chen, F. Han, W. Lin, A review of the application of nanoparticles in the diagnosis and treatment of chronic kidney disease *Bioact. Matéria.* 5 (2020) 732–743. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32596555/>
19. MA Khan, MJ Khan Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF- κ B pathways by suppressing COX-2 activity *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 46 (2018) 1149–1158, Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29553845/>
20. G. Alomari, B. Al-Trad, S. Hamdan, A. Aljabali, M. Al-Zoubi, N. Bataineh, J. Qar, M. M. Tambuwala Gold nanoparticles attenuate albuminuria by inhibiting podocyte injury in a rat model of diabetic nephropathy, *Drug Deliv Transl. Res.* 10 (2020) 216–226. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31637677/>
21. Khanna D, Sethi G, Ahn K, Pandey M, Kunnumakkara A, Sung B et al. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharmacology.* 2007;7(3):344-351. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475558/>
22. Pereira D, Petronilho F, Pereira H, Vuolo F, Mina F, Possato J et al. Effects of Gold Nanoparticles on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2012;53(13):8036.) (Tsai Y, Chen Y, Cheng P, Tsai H, Shiau A, Tzai T et al. TGF- β 1 Conjugated to Gold Nanoparticles Results in Protein Conformational Changes and Attenuates the Biological Function. *Small.* 2013;9(12):2119-2128. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23150627/>
23. Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare D, Cortie M, Valenzuela S. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e58208. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23469154/>
24. Aires, R. D., Capettini, L. S. A., Silva, J. F., Rodrigues-Machado, M. da G., Pinho, V., Teixeira, M. M., Cortes, S. F., & Lemos, V. S. (2013). Paraquat poisoning induces TNF- α -dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats. *PloS One*, 8(9), e73562. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24039983/>