

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**EFEITOS RENOPROTETORES DA ATIVAÇÃO DA
ECA2 NA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR
GENTAMICINA EM RATOS**

TATIANE CRISTINE SILVA DE ALMEIDA

BELO HORIZONTE

2017

Tatiane Cristine Silva de Almeida

**EFEITOS RENOPROTETORES DA ATIVAÇÃO DA
ECA2 NA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR
GENTAMICINA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
para a obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

BELO HORIZONTE

2017

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Fisiologia Renal do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Protozoos do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;

Contou com o auxílio das seguintes Agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);

Mas precisamos compreender que sonhos não são desejos superficiais. Sonhos são bússolas do coração, são projetos de vida. Desejos não suportam o calor das dificuldades. Sonhos resistem às mais altas temperaturas dos problemas. Renovam a esperança quando o mundo desaba sobre nós.

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar todos os dias e ser o responsável por essa vitória;

Ao meu pai que, da sua maneira é um dos responsáveis pela minha coragem em começar do zero;

À minha amada mãe, que mesmo não estando aqui em corpo físico, esteve comigo todos os dias em espírito, me guiando e zelando por mim em todos os momentos;

Ao Márcio, por todo o incentivo, carinho e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, por ter me recebido em seu laboratório e depositando confiança e disponibilidade para me orientar;

À Prof^a.Cida por abrir as portas do seu laboratório e por não poupar esforços em me ajudar;

A toda minha família, em especial à Charlene pelo carinho, amizade e por sempre estar ao meu lado independente de qualquer situação;

À Thalita por sua amizade incondicional, sonhando junto comigo esse sonho desde a graduação;

À todos colegas que passaram pelo Laboratório de Biologia Cardíaca, durante todos esses anos, pela ajuda, amizade e aprendizagem;

Ao Esdras, Roberta e Leda, pessoas que sem elas esse trabalho não teria sido realizado, com elas aprendi muito mais que ciências, aprendi que generosidade move montanhas e cria laços que serão levados pela vida toda.

À todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular;

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro;

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é um importante problema de saúde pública mundial na atualidade. Assim, esforços para reduzir seu impacto na população são de extrema relevância. O sistema renina angiotensina (SRA) desempenha um papel importante na progressão da lesão renal, sendo que o eixo enzima conversora de angiotensina (ECA)2/Angiotensina(Ang)-(1-7)/receptor Mas modula a função renal. Estudos recentes demonstram que a ativação da ECA2 utilizando o composto aceturato de diminazeno (DIZE) provoca efeitos benéficos no sistema cardiovascular e renal. O presente estudo teve como objetivo avaliar as ações do DIZE utilizado preventivamente ou terapêuticamente em um modelo de lesão renal aguda induzida por gentamicina (GM) em ratos. O protocolo experimental teve duração de 15 dias, onde, inicialmente, ratos Wistar machos foram divididos em 5 grupos experimentais compostos por 7 animais cada: Controle/Salina, Controle/DIZE, GM/Salina, Terapêutico e Preventivo. Em seguida, esses animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas por 3 dias para um período de adaptação. Do 4^o ao 8^o dia foi administrado nos animais dos grupos GM/Salina, Terapêutico e Preventivo duas doses diárias de GM (80 mg/kg/dia, 0,1 mL/100g) para indução da LRA. Os demais grupos receberam NaCl 0,9%. O tratamento com o DIZE (1mg/kg via gavagem) teve início no 4^a dia nos animais do grupo Preventivo e no 9^o dia nos animais dos grupos Controle/DIZE e Terapêutico. Os animais dos grupos Controles receberam NaCl 0,9%. Coletas de sangue e urina foram realizadas no 4^o dia, 9^o dia e ao final do protocolo proposto. Ao término do protocolo experimental, os animais foram eutanaziados e amostras de rim foram coletadas. Os resultados da análise da função renal demonstraram que o tratamento com DIZE (Preventivo e Terapêutico) melhora os seguintes parâmetros renais nos tempos propostos (5^o e 15^o dias): creatinina plasmática, ritmo de filtração glomerular (RFG) e proteinúria. Nenhum efeito significativo foi observado no volume urinário, osmolalidade urinária, fração de excreção de água, *clearance* osmolar, balanço hídrico, peso dos rins, peso corporal e NGAL em relação ao grupo GM/Salina. A GM não alterou os valores da ingesta hídrica e osmolalidade plasmática. O DIZE quando administrado de maneira preventiva modulou o perfil inflamatório,

reduzindo os níveis renais das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 e aumentando IL-10. Uma redução na atividade de NAG e MPO foi evidenciada no grupo Preventivo. Além disso, a morfometria do tecido renal mostrou uma redução no número de células inflamatórias nos grupos Preventivo e Terapêutico. A histologia renal confirmou a presença da lesão tubular no grupo GM/Salina com uma melhora na morfologia dos grupos tratados com DIZE. A administração do DIZE reduziu os níveis urinários de ECA e Ang II nos dois tratamentos avaliados. Em relação à concentração urinária de Ang-(1-7), um aumento foi observado no grupo Preventivo (5^o dia) e no 15^o dia no grupo Terapêutico, seguido de uma redução no 15^o dia no grupo Preventivo. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de ECA2. Em geral, estes resultados sugerem que a ativação da ECA2 é uma estratégia viável para prevenir, assim como para tratar a LRA.

Palavras-chave: Lesão renal aguda, Sistema renina angiotensina, DIZE.

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is an important global public health problem. Thus, efforts to reduce its impact are of paramount importance. The renin-angiotensin system (RAS) plays a critical role in the progression of renal injury. Indeed, the axis composed by angiotensin-converting enzyme (ACE) 2, Angiotensin (Ang)-(1-7) and Mas receptor is able to modulate the renal function. Recent studies have shown that ACE2 activation using the compound diminazene aceturate (DIZE) causes beneficial effects in the cardiovascular and renal systems. The current study evaluated the actions of DIZE used preventively or therapeutically in an acute renal injury model induced by gentamicin (GM) in rats. The experimental protocol lasted 15 days, in which male Wistar rats were initially divided into 5 experimental groups composed by 7 animals each: Control/Saline, Control/DIZE, GM/Saline, Therapeutic and Preventive. The animals were placed in metabolic cages for 3 days for an adaptation period. From day 4 to day 8, 2 daily doses of GM (80 mg/kg/day, 0.1 mL/100 g) were administered in animals of the GM/Saline, Therapeutic and Preventive groups for AKI induction. The other groups received 0.9%NaCl. Treatment with DIZE (1 mg/kg by gavage) started on the 4th day in animals of the Preventive group and on the 9th day in animals of the Control/DIZE and Therapeutic groups. Control rats received 0.9%NaCl. Blood and urine samples were collected on days 4 and 9 and at the end of the proposed protocol. At the end of the experimental protocol, the animals were euthanized and kidney samples were collected. Renal function analysis showed that DIZE treatment (Preventive and Therapeutic groups) improved the following renal parameters at the proposed time points (5th and 15th days): serum creatinine, glomerular filtration rate (GFR) and proteinuria. No significant changes were observed in urine volume, urine osmolality, water excretion fraction, osmolar clearance, water balance, kidney weight, body weight and NGAL compared to GM/Saline group. GM did not alter water intake and plasma osmolality. When administered preventively, DIZE modulated the inflammatory profile, reducing the renal cytokines levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and increasing IL-10. Also, it was evidenced a decrease in NAG and MPO activity in the Preventive group. The renal tissue morphometry showed a decreased number of inflammatory cells in the Preventive and

Therapeutic groups. Renal histology analysis confirmed the presence of tubular lesion in the GM/Saline group and an improvement of this condition in animals treated with DIZE. DIZE administration reduced the urinary levels of ACE and Ang II in both treatments. In relation to Ang-(1-7) urinary concentration, an increase was observed in the Preventive group (5th day) and in the Therapeutic group (15th day), followed by a decrease in the Preventive group (15th day). No significant alterations were observed in the ACE2 levels. Overall, these findings suggest that ACE2 activation is a feasible strategy to prevent and treat AKI.

Key words: Acute kidney injury, Renin-angiotensin system, DIZE.

LISTA DE ABREVIATURAS

- μM : micromolar
- A779: bloqueador do receptor Mas [(D-Ala⁷)-Angiotensina I/II (1-7)]
- ADH: Hormônio antidiurético
- Ala: alanina
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
- Ang: angiotensina
- ANOVA - análise de variância
- Arg: arginina
- AT₁: receptor da Ang II do subtipo 1
- AT₂: receptor da Ang II do subtipo 2
- ATP: Adenosina trifosfato
- B₂: receptor de bradicinina do subtipo 2
- CEBIO: Centro de Bioterismo
- CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
- CH₂O: *Clearance* de água livre
- CONT: controle
- Cosm: *Clearance* osmolar
- DIZE: *diminazene aceturate* - aceturato de diminazeno
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- ECA2: enzima conversora de angiotensina 2
- EPM: erro padrão da media
- ERO: Espécie reativa de oxigênio
- FC: Frequência cardíaca
- FEH₂O: Fração de excreção de água
- FEK⁺: Fração de excreção de potássio
- FENA⁺: Fração de excreção de sódio
- FSR: Fluxo sanguíneo renal
- FU: Fluxo urinário
- GM: Gentamicina
- His: histidina
- ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- Ile: isoleucina

- LRA: Lesão renal aguda
- IRC: Insuficiência renal crônica
- Leu: leucina
- Mas: receptor da angiotensina-(1-7)
- MPO: Mieloperoxidase
- NAG: N-Acetil- β -D-Glicosaminidase
- NEP: enzima endopeptidase neutra
- NF-KB: Fator de Necrose Tumoral
- NGAL: glicoproteína lipocaína associada à gelatinase neutrofílica
- NO: Óxido nítrico
- NTA: Necrose tubular aguda
- PA: Pressão arterial
- PEP: enzima prolilendopeptidase
- pH: potencial hidrogeniônico
- Phe: fenilalanina
- Pro: prolina
- PTHr: proteína relacionada ao paratormônio
- RFG: Ritmo de filtração glomerular
- RNA: *ribonucleic acid* - ácido ribonucléico
- RPM: rotações por minuto
- SAL: salina
- SHR: *spontaneous hypertensive rats* - ratos espontaneamente hipertensos
- SRA: Sistema renina angiotensina
- Tyr: tirosina
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
- Val: valina
- XNT: 1-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-(4-etilfenil)sulfonil]oxi]-9H-Xantona-9-um

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da gentamicina (C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇)	19
Figura 2 – Esquema simplificado do sistema renina angiotensina	24
Figura 3 – Eixos do sistema renina-angiotensina	27
Figura 4 – Protocolo experimental de Indução da LRA utilizando gentamicina (GM)	36
Figura 5 – Efeitos do DIZE no peso corporal de ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento	44
Figura 6 – Efeitos do DIZE no peso do rim direito e esquerdo em ratos com LRA	44
Figuras 7 – Efeitos do DIZE sobre a ingesta hídrica, volume urinário e balanço hídrico de ratos com LRA	45
Figura 8 – Efeitos do DIZE na concentração plasmática de creatinina e no RFG de ratos com LRA	47
Figura 9 – Efeitos do DIZE no <i>clearance</i> osmolar e no <i>clearance</i> de água livre em ratos com LRA	48
Figura 10 – Efeitos do DIZE na osmolalidade urinária e na osmolalidade plasmática em ratos com LRA	50
Figura 11 – Efeitos do DIZE na fração de excreção de água livre em ratos com LRA	51
Figura 12 – Efeitos do DIZE na excreção urinária da proteína em ratos com LRA	52
Figura 13 – Efeitos do DIZE na excreção urinária da proteína NGAL em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento	52
Figura 14 – Efeitos do DIZE na atividade da enzima MPO em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento	53
Figura 15 – Efeitos do DIZE na atividade da enzima NAG em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento	54
Figura 16 – Efeitos do DIZE nos níveis renais das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em ratos com LRA	55
Figura 17 – Fotomicrografias representativas dos efeitos do DIZE na morfologia renal em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento	56
Figura 18 – Efeitos do DIZE no número de células inflamatórias em ratos com	

LRA ao final dos 15 dias de experimento.....	57
Figura 19 – Efeitos do DIZE nos níveis urinários de ECA, Ang II, ECA2 e Ang- (1-7) em ratos com LRA.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos experimentais e tratamentos administrados.....	34
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiv
SUMÁRIO	xv
I. INTRODUÇÃO	17
1.1. Lesão Renal Aguda.....	17
1.2. Nefrotoxicidade Induzida Pela Gentamicina.....	19
1.3. Necrose Tubular Aguda.....	20
1.4. O Sistema Renina Angiotensina.....	22
1.5. Papel do Sistema Renina Angiotensina na Progressão da Lesão Renal Aguda.....	28
1.6. Ativação da ECA2 Endógena	29
II. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	32
III. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo Geral	33
3.2. Objetivos Específicos	33
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Animais.....	34
4.2. Grupos Experimentais.....	34
4.3. Indução da LRA e Tratamento com DIZE.....	35
4.4. Coleta, Eutanásia e Preparação dos Órgãos e Tecidos.....	35
4.5. Procedimentos Analíticos Para Avaliação da Função Renal	36
4.5.1. Dosagem de Creatinina.....	36
4.5.2. Osmolidade Plasmática e Urinária	37
4.5.3. Cálculos dos Outros Parâmetros Renais.....	37
4.5.4. Proteinúria	38
4.5.5. NGAL.....	38
4.6. Determinação da Migração Celular para o Rim e Quantificação de Mediadores Inflamatórios	38

4.6.1. Dosagem da Atividade de Mieloperoxidase e N-Acetil- β -D-Glicosaminidase	38
4.6.2. Preparo das Amostras para Dosagem da Atividade de MPO e NAG).....	39
4.6.3. Dosagem da Atividade da Mieloperoxidase	40
4.6.4. Dosagem da Atividade da N-Acetil- β -D-Glicosaminidase	40
4.6.5. Processamento dos Tecidos para Quantificação de Citocinas.....	40
4.6.6. Determinação dos Níveis de Citocinas e Quimiocinas	41
4.7. Análise Histopatológica	41
4.8. Análise Morfométrica.....	41
4.9. Avaliação dos Níveis Urinários de Componentes do SRA	42
4.10. Análise Estatística	43
V. RESULTADOS	44
VI. DISCUSSÃO	59
VII. CONCLUSÃO	68
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

I. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão Renal Aguda

Os rins são órgãos vitais, pois além de serem responsáveis pela formação da urina e pela eliminação de produtos metabólicos, exercem inúmeras outras funções devido a sua função endócrina e reguladora, como: regulação do balanço hidroeletrólítico, do equilíbrio ácido-básico e da pressão arterial sanguínea (Teslariu *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2017). À medida que os rins reduzem sua atividade ou mesmo param de funcionar, é desencadeado um quadro denominado de lesão renal (Paquette *et al.*, 2015).

A lesão renal aguda (LRA) é uma relevante doença renal e caracteriza-se por uma perda súbita da função renal, que se mantém por períodos variados, resultando na incapacidade dos rins em exercer suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostase hidroeletrólítica do organismo (Mrozikiewicz-Rakowska *et al.*, 2015; Hering *et al.*, 2017). Dessa forma, haverá o acúmulo de substâncias nitrogenadas, como uréia e creatinina, que pode ser seguido ou não pela diminuição da diurese (Kellum *et al.*, 2005; Lopez-Novoa *et al.*, 2011). A redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) e do fluxo sanguíneo renal (FSR) decorrente, entre outros fatores, da intensa vasoconstrição intra-renal, é o ponto crucial da LRA (Perazella *et al.*, 2003).

A LRA é um sério problema de saúde pública, levando a altas taxas de mortalidade, acometendo principalmente pacientes hospitalizados, gerando altos custos ao sistema público de saúde (Robert *et al.*, 2004; Chertow *et al.*, 2005; Waikar *et al.*, 2008; Bolisetty *et al.*, 2017). Em pacientes portadores de LRA severa, o índice de mortalidade pode chegar a quase 40% (Choudhury *et al.*, 2012). Está associada a uma maior probabilidade de o paciente desenvolver um quadro de doença renal crônica (DRC), podendo assim, agravar ainda mais seu quadro clínico, o que o levará a realizar hemodiálise para suprir a falha renal (Gallagher *et al.*, 2014). Estima-se que um quinto dos casos de LRA que ocorrem após a admissão hospitalar é previsível e evitável (Ali *et al.*, 2011).

De acordo com Rossaint e colaboradores (2015), a incidência da LRA no ocidente pode ser comparada ao do infarto do miocárdio. No Brasil, a LRA tem uma incidência de até 5% nos pacientes internados (Laura *et al.*, 2012). Dados

alarmantes descritos por Ávila e colaboradores (1997) demonstram que a LRA hospitalar por necrose tubular aguda (NTA) causada por isquemia ou por agentes nefrotóxicos, ou ainda pela combinação de ambos, é alta e corresponde a aproximadamente 70% dos casos de LRA. É sabido que 90% dos casos de LRA são causados por NTA (Monteiro *et al.*, 1997; Eftekhari *et al.*, 2014). A principal causa da NTA são as isquemias e as nefrotoxinas, sendo que a lesão nefrotóxica pode ser reversível, quando diagnosticada e tratada precocemente (Hammerman *et al.*, 2000).

Um dos principais agentes nefrotóxicos causadores de NTA são os antibióticos do grupo aminoglicosídeos, como a gentamicina (GM). Outras drogas que também podem desencadear a LRA são: o uso diário e prolongado de analgésicos (acetaminofeno), anti-inflamatórios não esteróides, como o ácido acetilsalicílico, que deve ser usado com cautela em pacientes com doenças renais, meios de contrastes iodados e agentes quimioterápicos como a cisplatina (Lameire *et al.*, 2006; Vaidya *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Fähling *et al.*, 2017).

A LRA causada por agentes nefrotóxicos não se deve somente ao tempo de exposição ou concentração do mesmo, mas também a fatores diversos e resistência do indivíduo que está sendo exposto ao fármaco. Pacientes internados em UTI, idosos e diabéticos, por exemplo, podem não tolerar uma dose de um agente nefrotóxico que uma pessoa saudável não teria problema de recebê-la (Raveh *et al.*, 2002; Norbert *et al.*, 2006; Cerda *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2014).

Perante estes dados e da complexidade em se pesquisar como se instala e evolui a insuficiência renal em humanos, modelos experimentais animais são empregados com o intento de se mimetizar as condições clínicas da LRA (Singh *et al.*, 2012). Entre os modelos utilizados, inclui-se a LRA induzida por antibióticos aminoglicosídeos, como a GM. Sendo esse modelo largamente utilizado devido às alterações renais causadas por esses antibióticos serem muito semelhantes às observadas em seres humanos (Srinivas *et al.*, 2010).

A denominação aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoácidos unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol que comumente está em posição central na molécula

(Figura 1). Os aminoglicosídeos são extremamente solúveis em água, estáveis em pH 6 a 8, possuem estrutura polar catiônica e mostram um baixo grau de absorção gastrointestinal devido a sua natureza polar. Assim, a administração parenteral é normalmente utilizada (Oliveira *et al.*, 2006).

Sendo a nefrotoxicidade um dos principais efeitos colaterais dos antibióticos aminoglicosídeos, principalmente da GM (El-Kashe *et al.*, 2015).

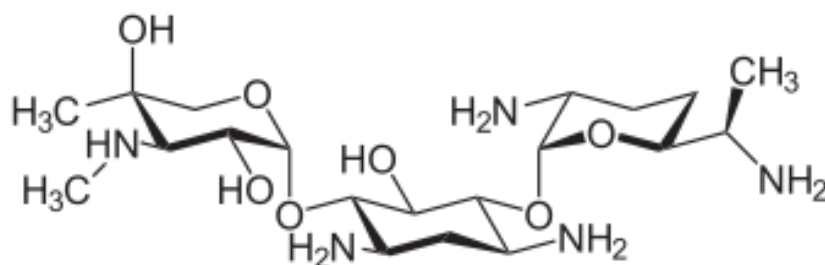


Figura 1: Estrutura química da gentamicina (C₂₁H₄₃N₅O₇).

1.2. Nefrotoxicidade Induzida pela Gentamicina

A GM é uma das drogas mais utilizadas no controle de infecções, isso se deve ao fato por ser um antibiótico de primeira linha para o tratamento de muitas infecções graves causadas por bactérias Gram negativas, pois apresenta taxas reduzidas de resistência e baixo custo (Selby *et al.*, 2009; Negrette *et al.*, 2013).

Mesmo com esses pontos a seu favor, complicações graves como nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular são fatores limitantes do uso dos aminoglicosídeos em geral. A periodicidade relatada destes efeitos colaterais tem ampla variação, devido a diferentes critérios utilizados para diagnóstico. O bloqueio neuromuscular é infrequente, a ototoxicidade varia de 0 a 62% e a nefrotoxicidade varia de 0 a 50% (Gilbert *et al.*, 1995; Ali *et al.*, 2011). Essas alterações ocorrem em aproximadamente 30% dos pacientes tratados com esse antibiótico (Sun *et al.*, 2013).

Isso ocorre devido a uma quantidade relativamente grande da dose administrada (cerca de 10%) ser acumulada no rim, ao passo que é observado uma pequena distribuição da GM em outros tecidos (Nagai *et al.*, 2004). O fato de ser insolúvel em lipídios faz com que a sua concentração em secreções e nos tecidos seja reduzida, pois atravessam mal as membranas biológicas que não tenham um mecanismo de transporte.

A GM não é metabolizada, sendo eliminada por filtração glomerular e reabsorvida por endocitose pelos túbulos proximais, onde se acumula e permanece com uma meia vida no tecido renal estimada entre 30 e 700 horas (Sande *et al.*, 1985; Kaloyanides *et al.*, 1993). Acredita-se que a endocitose da GM ocorre devido à presença de receptores de lipoproteínas de baixa densidade, a glicoproteína, que é expressa na membrana apical do epitélio do túbulo proximal (Zheng *et al.*, 1994; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Junya *et al.*, 2001). Uma vez ligada à megalina, o complexo aminoglicosídeo-megalina é transportado para dentro da célula e se une ao lisossomo, onde se acumula gradualmente e induz alterações nos ribossomos, mitocôndrias, na bomba Na/K-ATPase e morfológicas em decorrência da morte das células epiteliais tubulares, ocorrendo assim, a NTA (Lovelles *et al.*, 1984; Bennett *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2009; Bell *et al.*, 2014).

A ação nefrotóxica da GM é maior quando a droga é administrada de forma fracionada em comparação quando usada em dose única. Isso ocorre devido à absorção saturada pelos rins desse aminoglicosídeo. Assim, um acúmulo maior da droga no córtex renal é observado, pois com doses fracionadas, menos droga é excretada, sendo acumulada e reabsorvida pelos túbulos (Giuliano *et al.*, 1986; Tulken *et al.*, 1989; Martínez *et al.*, 2007). O grupamento amina é que confere a toxicidade do aminoglicosídeo, de modo que quanto maior o número de aminas maior a toxicidade do antibiótico.

1.3. Necrose Tubular Aguda

A NTA é descrita como uma característica da lesão renal aguda induzida pela administração da GM. Sendo localizada principalmente no túbulo proximal, ela pode variar desde uma pequena perda de células epiteliais renais que formam a borda em escova do túbulo proximal até uma necrose tubular severa (Juan *et al.*, 2007; Sue *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012). A GM se acumula no córtex renal causando, assim, uma desregulação dos mecanismos fisiológicos renais e também alterações morfológicas no rim (Martínez *et al.*, 2007; Alarifi *et al.*, 2012).

Várias dessas modificações que são ocasionadas a partir do uso da GM podem ser usadas como indicadores de lesão renal das células tubulares. Pode-se citar como exemplo desses marcadores, o aumento plasmático de

creatinina, que é um indicador padrão para diagnóstico da LRA. A creatinina é um produto da metabolização da fosfocreatina, um composto de alta energia utilizado na contração muscular. Por esse motivo, a sua produção é proporcional à quantidade de massa muscular, sendo sintetizada nos rins, fígado e pâncreas e liberada nos fluidos corporais em uma taxa constante. Por ser livremente filtrada pelos rins, não ser reabsorvida e sofrer pequena secreção no túbulo distal, a creatinina é considerada o melhor marcador endógeno para função renal, já que permite avaliar o RFG. Com isso possui uma vantagem em relação aos marcadores exógenos, já que suas dosagens são de baixo custo e de fácil execução laboratorial (Bonventre *et al.*, 2008).

A presença na urina da glicoproteína lipocaína associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), que pode ser identificada nas primeiras horas após a instalação da lesão renal, também é utilizada como um biomarcador renal. Assim, o aumento de NGAL urinário é considerado um marcador precoce para a NTA (Quintavalle *et al.*, 2015). Outras alterações renais também devem ser consideradas, como, por exemplo, redução na concentração plasmática de potássio (Silan *et al.*, 2007) e aumento na fração de excreção de sódio (De Barros *et al.*, 1992; Volpini *et al.*, 2004).

São várias as alterações estruturais renais causadas pela administração da GM que levam ao desenvolvimento da lesão renal, como, por exemplo, a apoptose, bem como a necrose tubular (Otunctemur *et al.*, 2013). O que faz com que ocorra apoptose ou necrose é a concentração de GM administrada. Assim, em baixas concentrações, ela pode causar apoptose e, em altas concentrações, pode levar à necrose (Leehey *et al.*, 1993).

A GM induz estresse oxidativo [aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS)] que, por sua vez, causa morte celular em diferentes estágios da insuficiência renal devido a uma diminuição de enzimas antioxidantes (Balakumar *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). A GM aumenta diretamente a produção de EROS mitocondrial através da cadeia respiratória (Morales *et al.*, 2010; Félix *et al.*, 2017). O estresse oxidativo causado pela GM pode ocorrer não somente pela via mitocondrial, mas também através de outras estruturas celulares, como o retículo endoplasmático, inibindo a síntese protéica e dependendo da concentração, pode alterar a viabilidade celular (Oishi *et al.*, 2015).

A inflamação renal é caracterizada pela infiltração de células inflamatórias tais como monócitos, macrófagos e miofibroblastos (Segeer *et al.*, 2000; Schlondorff *et al.*, 2008). Na presença da GM, macrófagos se infiltram no interstício tubular renal e subseqüentemente ativam a via NF-kB em resposta ao estresse oxidativo, liberando citocinas pró-inflamatórias. Essa via é conhecida por regular a expressão de numerosos genes envolvidos na inflamação e proliferação celular (Liu *et al.*, 2004; Bottinger *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2013; Kalayarasan *et al.*, 2009).

Além disso, a disfunção mitocondrial e a ativação de metaloproteinases da matriz renal também estão envolvidas na nefrotoxicidade induzida por GM (Morales *et al.*, 2010).

1.4. O Sistema Renina Angiotensina (SRA)

Diversos estudos sobre o SRA nos trazem informações coesas de que esse sistema seja um dos mais importantes na regulação da pressão arterial e da homeostase eletrolítica (Cooper *et al.*, 2007; Sparks *et al.*, 2014).

O primeiro estudo associado ao SRA foi realizado há aproximadamente 120 anos por Tiegerstedt e Bergman, que observaram que a pressão arterial de coelhos anestesiados aumentava lentamente a partir do momento que recebiam um extrato não purificado de córtex renal. Esse extrato perdia sua função quando era aquecido. Assim, concluíram que a substância causadora desse efeito deveria ser uma proteína solúvel, a qual foi denominada renina. Essa descoberta ficou esquecida até 1934, quando um modelo de hipertensão renal mostrou que o aumento da pressão arterial estava associado à presença de uma substância no sangue, renovando, assim, o interesse pelo assunto, que até então não estava ligado à renina (Goldblatt *et al.*, 1934).

Usando o modelo de hipertensão renovascular, em 1940 Braun-Mendes e colaboradores isolaram uma substância vasoconstritora, que denominaram de hipertensina. Outro grupo de pesquisa que realizava experimentos semelhantes de forma independente identificou um composto similar que foi denominado angiotonina. Essa substância era um produto da ação enzimática da renina sobre uma proteína plasmática (Page *et al.*, 1940). Foi somente em 1958 que o nome angiotensina surgiu como a junção das duas denominações, uma vez que essas duas substâncias na verdade era apenas uma. A

abreviatura Ang foi sugerida em 1987 pela Organização Mundial de Saúde e pela *American Heart Association* (Dzau *et al.*,1987). Duas formas da angiotensina foram identificadas em 1954, a angiotensina (Ang) I (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) e Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸), sendo que a primeira resulta da clivagem do angiotensinogênio pela renina e a segunda resulta da clivagem enzimática da primeira pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (**Figura 2**) (Skeggs *et al.*, 1954). A partir de então, iniciaram várias pesquisas e um enorme interesse pelo SRA.

O SRA é descrito como uma cascata hormonal que controla várias funções biológicas e está presente na circulação ou localmente em vários tecidos, como vasos sanguíneos, rins, cérebro, pâncreas, órgãos reprodutores, tecido adiposo e coração (Thomas *et al.*, 1990; Van Kats *et al.*, 1998; Ferrario *et al.*, 2010; Karnik *et al.*, 2015). Assim, esse sistema pode atuar como um sistema regulatório duplo e independente, sanguíneo ou tecidual, e alguns estudos têm sugerido a existência de um SRA intracelular, atuando como um sistema hormonal intrácrino, no qual os componentes não seriam secretados para o meio extracelular, exercendo suas ações no interior da própria célula. Portanto, o SRA possui função endócrina, parácrina e intrácrino (Leung *et al.*,2007).

Além da sua importância incontestável na regulação dos processos fisiológicos, o SRA possui um papel central na fisiopatogênese de várias doenças, como diabetes mellitus, insuficiência renal, hipertensão arterial, hipertensão pulmonar e acidente vascular encefálico (Fyhrquist *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, diversos estudos têm comprovado a eficácia de drogas que bloqueiam algumas vias do SRA no tratamento de doenças renais e cardiovasculares, incluindo as glomerulopatias proteinúricas e não-proteinúricas, a insuficiência renal crônica, a hipertensão arterial, o infarto do miocárdio e a insuficiência cardíaca (Rüster *et al.*, 2006; Simões e Silva *et al.*, 2006).

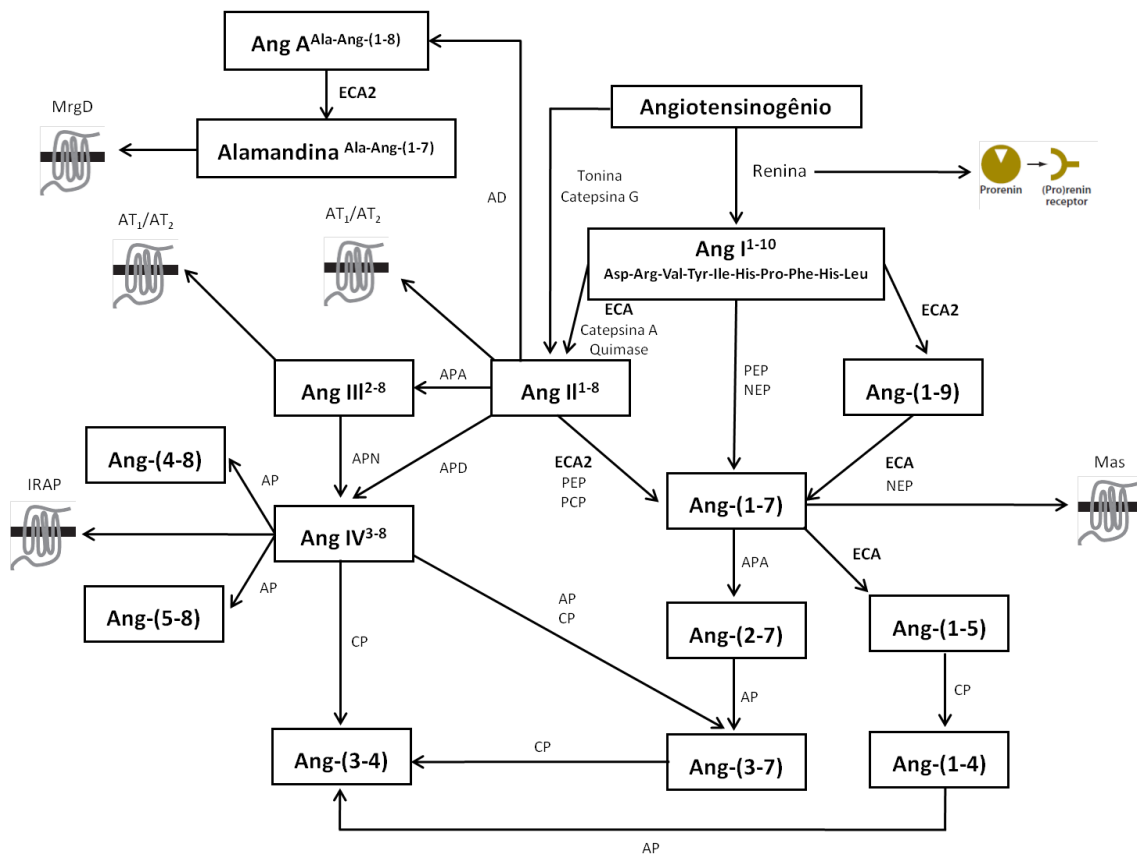


Figura 2: Esquema do sistema renina-angiotensina. Ang: angiotensina; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; AP: aminopeptidase; AD: aspartato-descarboxilase; APA: aminopeptidase A; APD: aminopeptidase D; APN: aminopeptidase N; CP: carboxipeptidase; NEP: endopeptidase neutra; PCP: prolilcarboxipeptidase; PEP: prolilendopeptidase; AT₁: receptor de Ang II do tipo 1; AT₂: receptor de Ang II do tipo 2; Mas: receptor de Ang-(1-7); IRAP: receptor de Ang IV; MrgD: receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas; Asp: aspartato; Arg: arginina; Val: valina; Tyr: tirosina; Ile: isoleucina; His: histidina; Pro: prolina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina (Lanza, 2013).

A Ang II é o principal peptídeo efetor do SRA, podendo ser formada, principalmente, a partir da clivagem da Ang I pela ECA (Herichová *et al.*, 2016). Esse peptídeo também pode ser sintetizado, em condições patológicas, por uma via alternativa à ECA pela ação da quimase e da catepsina A sobre a Ang I. Essa via é ativada em menor frequência do que a via Ang I/ECA (Urata *et al.*, 1993). A Ang II é uma das principais moléculas reguladoras do equilíbrio hemodinâmico e da homeostase de líquidos e de sódio, e também participa do crescimento celular e do remodelamento cardiovascular. É sabido que a

ativação persistente da Ang II em condições patológicas pode produzir ações deletérias ao organismo, tais como aumento da produção de EROS, hipertensão sistêmica, ativação do crescimento celular, apoptose, migração e diferenciação celular e remodelação da matriz extracelular com consequente formação de fibrose intersticial em tecidos afetados (Rüster *et al.*, 2006). Em alguns tecidos, como o renal, vascular e cardíaco, a Ang II pode ser responsável por vários eventos que medeiam o processo inflamatório, pois aumenta a permeabilidade vascular, promovendo a expressão e excreção de VEGF (Suzuki *et al.*, 2003; Kitayama *et al.*, 2006; Benigni *et al.*, 2010) e induz a liberação de prostaglandinas e fator de crescimento de células endoteliais, que contribuem para a migração de células inflamatórias através da regulação de moléculas de adesão e quimiocinas pelas células residentes (Suzuki *et al.*, 2003; Ruiz-Ortega *et al.*, 2006; Marchesi *et al.*, 2008).

A atuação da Ang II se dá através de dois receptores distintos acoplados à proteína G presentes na membrana plasmática, o AT₁ e o AT₂ (Hunyday *et al.*, 2006). Esses dois receptores exercem, na maioria das vezes, funções contra-reguladoras, principalmente no sistema cardiovascular e renal (Miura *et al.*, 2013). O receptor AT₁ está presente de forma mais abundante nos vasos sanguíneos, rins, coração, fígado, cérebro, glândulas supra-renais, pulmões e fígado (Crowley *et al.*, 2017). Ele medeia ações mais clássicas da Ang II com consequências prejudiciais se não forem contrabalanceadas, como a vasoconstrição, aumento da pressão arterial, estimulação do sistema nervoso simpático, retenção de água e sal, liberação de vasopressina e aldosterona, fibrose, crescimento e migração celular (Ardaillou *et al.*, 1999). Novas funções estão sendo atribuídas ao receptor AT₁, dentre elas é possível citar aumento da secreção de insulina, aumento de triglicerídeos no plasma, modulação do processo inflamatório, redução da gliconeogênese, indução de reabsorção óssea e uma possível intolerância à insulina (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006 ; Ramracheya *et al.*, 2006; Queiroz-Junior *et al.*, 2015).

A Ang II também se liga ao AT₂, cuja expressão é maior no período fetal e neonatal, onde parece ser o responsável pelo remodelamento de vários órgãos (Kaschina *et al.*, 2003; Hallberg., 2017). Ainda assim, continua exercendo um papel essencial na fase adulta, sendo expresso em órgãos como o cérebro, medula da glândula adrenal, rins e ovários (Jöhren *et al.*, 2004). A

estimulação do receptor AT₂ promove vasodilatação, via liberação de óxido nítrico (NO) e bradicinina, inibição do crescimento do músculo liso vascular e analgesia (Thomas *et al.*, 2003; Kusserow *et al.*, 2004; *et al.*, 2014). O aumento da expressão de receptores AT₂ tem sido descrito em processos patológicos periféricos (Inagami *et al.*, 1999) e centrais em áreas importantes no controle cardiovascular (Lenkei *et al.*, 1997). Estudos mais recentes mostraram a importância desse receptor na proteção contra a fibrose renal e lesão renal isquêmica, onde a falta de AT₂ agravou a lesão renal e reduziu a sobrevivência (Benndorf *et al.*, 2009). Entretanto, alguns estudos mostram que a estimulação desse receptor pode induzir alguns efeitos adversos, estimulando um estado pró-fibrótico, ativando o Fator de Necrose Tumoral (NF-KB) e induzindo a produção de quimiocinas (Verdonk *et al.*, 2012; Esteban *et al.*, 2004). Desta forma, algumas ações da Ang II, via receptor AT₂, parecem ser similares aos efeitos biológicos da ativação do receptor AT₁ por esta angiotensina.

Atualmente, o conhecimento sobre o SRA vem sendo ampliado e sofrendo modificações à medida que são descobertos e incorporados novos componentes biologicamente ativos ou não a esse sistema, como, por exemplo, a Ang III (Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸), que é formada a partir da retirada de um aminoácido da extremidade amino-terminal da Ang II pela aminopeptidase A, que por sua vez pode ser clivada pela aminopeptidase N e formar Ang IV (Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸). Recentemente, foi identificada a Alamandina (Ala¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷) formada pela ECA2 a partir da Ang A ou diretamente da Ang-(1-7) (Jankowski *et al.*, 2007; Lautner *et al.*, 2013) (**Figura 2**).

Desta forma, é postulado que o SRA seja composto por dois eixos contra-regulatórios (**Figura 3**). O primeiro, composto por ECA, Ang II e receptor AT₁ e o segundo formado pela ECA2, Ang-(1-7) e receptor Mas (Probstfield *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2010). O equilíbrio entre estes dois eixos é de extrema importância para a manutenção da homeostase.

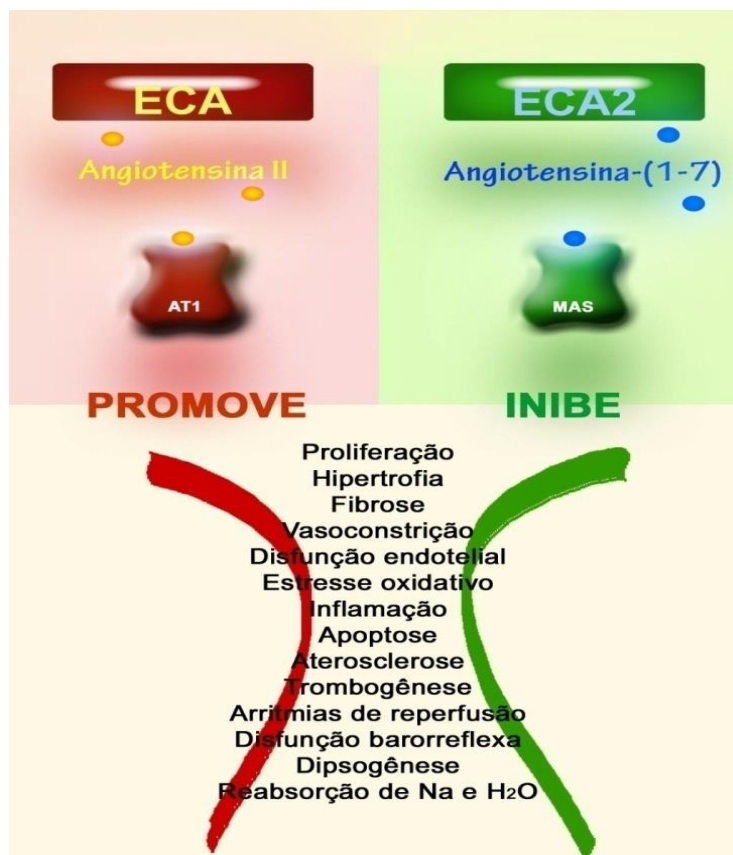


Figura 3: Eixos do sistema renina-angiotensina. ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; AT₁: receptor de Ang II do tipo 1; Mas: receptor de Ang-(1-7).

Nesse sentido, merecem destaque a Ang-(1-7), a ECA2 e o receptor Mas. O peptídeo Ang-(1-7) pode ser formado pela hidrólise da Ang I pela endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP) e outras duas vias enzimáticas que envolvem a ECA2 também estão relacionadas com a síntese de Ang-(1-7), ou seja, pode ser gerada pela hidrólise sequencial da Ang I pela ECA2 formando a Ang-(1-9) que é subsequentemente, hidrolisada pela ECA ou NEP gerando a Ang-(1-7) ou pode ser formada diretamente através da hidrólise do aminoácido fenilalanina da Ang II (**Figura 2**). Esta última via aparentemente é mais importante bioquimicamente e fisiologicamente, uma vez que a afinidade catalítica da ECA2 é muito maior pela Ang II do que pela Ang I. Acredita-se também que esta via seja a mais importante para a formação de Ang-(1-7) no tecido renal (Donoghue *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2006). Uma vez formada, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada pela ECA formando a Ang-(1-5) (Ferreira *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008; Dilauro *et al.*, 2009).

A ECA2 é uma glicoproteína transmembrana descrita e caracterizada pela primeira vez no ano de 2000 por Tipnis e colaboradores e por Donoghue e colaboradores, dois grupos independentes de pesquisadores. Ela está presente predominantemente em células cardíacas, renais e testiculares, podendo ser encontrada em outros tecidos em menor quantidade. Por ser considerado o produto mais importante da ação enzimática da ECA2, a Ang-(1-7) ganhou destaque científico dentre os componentes do SRA nos últimos anos, pois esse peptídeo produz muitas ações opostas às da Ang II, incluindo ação antioxidante, antitrombótica, antiproliferativa, antifibrótica, anti-arritmogênica, efeito anti-inflamatório, vasodilatação produzida pela liberação de prostaglandinas e NO ou pela potenciação da bradicinina, aumento do fluxo urinário e excreção de sódio, contribuindo, assim, para a redução do volume sanguíneo (Ferrario *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Keidar *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado que muitas destas ações são mediadas pelo receptor Mas, que é o principal mediador da vasodilatação e ações antiproliferativas desse peptídeo (Santos *et al.*, 2003). O receptor Mas foi identificado em diversos órgãos e tecidos, sendo encontrado em maior abundância no coração, nos rins e nos testículos (Santos *et al.*, 2008). Sua ação pode ser bloqueada especificamente pelo A-799 e pelo D-Pro-Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003).

A Ang-(1-7) também pode interagir com receptores de bradicinina B₂, AT₁ e AT₂ de Ang II, direta ou indiretamente, levando a efeitos vasculares (Soares *et al.*, 2004).

Assim, em conjunto, as descobertas envolvendo o Mas e a ECA2 reforçaram a relevância biológica da Ang-(1-7). A partir desses estudos, firmou-se o conceito de que o SRA possui um eixo intrínseco contra-regulador das ações da Ang II via receptor AT₁, formado pela ECA2, Ang-(1-7) e Mas (Fyhrquistand *et al.*, 2008).

1.5. Papel do Sistema Renina-Angiotensina na Progressão da Lesão Renal Aguda

É sabido que o SRA tem um relevante papel no desenvolvimento das doenças renais, contudo o seu envolvimento na LRA é pouco conhecido (Cao *et al.*, 2016). Em condições patológicas, a Ang II pode produzir efeitos

deletérios no tecido renal participando ativamente do desequilíbrio hemodinâmico renal e dos processos inflamatórios e fibróticos envolvidos na progressão da lesão renal (Brewster *et al.*, 2004; Ruster *et al.*, 2006).

Poucos trabalhos relatam certo envolvimento do SRA na NTA induzida por GM. Em 1981, Schor e colaboradores evidenciaram que o uso do captopril, inibidor da ECA, melhorou a redução do RFG quanto do coeficiente de filtração glomerular, ambas induzidas pela administração de GM na dose de 40 mg/kg/dia em ratos Wistar. Uma redução na função renal e um aumento na expressão da proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), que é um fator mitogênico de células renais, estão relacionados ao SRA em uma quadro NTA induzida por GM, sendo essas alterações, cessadas pela ação do losartan, bloqueador do receptor AT₁ de Ang II (Ortega *et al.*, 2005).

Apesar disso, aparentemente, a administração da GM não altera a afinidade da Ang II pelo receptor AT₁ no glomérulo, ainda que a densidade do receptor seja menor no glomérulo de ratos tratados com o antibiótico, a atividade da renina não foi alterada pela administração da GM (Esquerro *et al.*, 1995).

Hishida e colaboradores (1994) relataram um aumento significativo de renina no córtex renal quando se administra GM na dose de 40 mg/kg/dia por 13 dias. Além disso, substâncias que suprimem a atividade do SRA, como o captopril, podem melhorar a função renal de ratos que desenvolveram NTA pelo uso da GM.

Em um modelo de LRA induzida por sepse, Gupta e colaboradores (2007) observaram uma diminuição na expressão de ECA2 no tecido renal de ratos. Esse resultado corrobora com Silveira e colaboradores (2010), que mostraram que, em um modelo de LRA causada por isquemia/reperfusão em ratos, a expressão de RNA mensageiro da ECA2 estava diminuída após 4 horas de reperfusão. O mesmo foi observado para a expressão do receptor AT₁ e, inversamente, houve um aumento na expressão do receptor Mas. Esses resultados sugerem que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas exerce um papel importante no desenvolvimento e na progressão da LRA. Assim, entender a participação do SRA no processo de instalação e manutenção da NTA tem sido o objetivo de vários estudos.

1.6. Ativação da ECA2 Endógena

A ECA2 contrarregula as ações vasoconstritoras e proliferativas da Ang II através da degradação desse peptídeo e da estimulação dos efeitos vasodilatadores e antiproliferativos da Ang-(1-7), uma vez que ela degrada a Ang II com consequente formação de Ang-(1-7). Alterações na expressão desta enzima causam disfunções nos sistemas nervoso central, cardíaco, renal, pulmonar e vascular (Guang *et al.*, 2012). Deste modo, esta enzima é vista com grande interesse na manutenção do equilíbrio do SRA (Towler *et al.*, 2004; Huentelman *et al.*, 2005; Lubel *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010). Em uma tentativa em demonstrar que a atividade da ECA2 exerce um importante papel na regulação do SRA, opondo-se aos efeitos da ECA, principalmente em órgãos como o coração e os rins (Chappell *et al.*, 2004; Simões e Silva *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006), o número de pesquisas avaliando os efeitos dos ativadores dessa enzima nas diversas patologias aumentou.

Um desses compostos é o 1-[[2- (dimetilamino)etil]amino] 4-(hidroximetil)-7-[[[(4-metilfenil)sulfonil]oxi]-9H-xantona-9 (XNT) descrito através da técnica de *virtual screening* da molécula de ECA2 cristalizada (Hernandez-Prada *et al.* 2008). O XNT causa um rápido decréscimo da pressão arterial quando administrado na veia jugular de ratos normotensos e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e reverte a fibrose cardíaca e renal induzida pela hipertensão. *In vitro*, esse composto aumenta em várias vezes a atividade da ECA2 (Hernandez-Prada *et al.* 2008). Ferreira e colaboradores (2011) demonstraram que o efeito antifibrótico do XNT está associado à inibição da fosforilação de cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) e que a expressão da ECA2 é significativamente menor em ratos SHR quando comparado com animais normotensos, sendo que os níveis dessa enzima são restaurados com o tratamento com o XNT. Além disso, eles mostraram um aumento na atividade da ECA2 em animais SHR cronicamente infundidos com este ativador quando comparado com animais SHR tratados com salina. Assim, as evidências indicam que a ativação da ECA2 endógena pode prevenir e/ou retardar o desenvolvimento de lesões associadas à hipertensão arterial e de outras doenças cardiovasculares. Em outro estudo, o RNA mensageiro da ECA2 foi detectado em quase todos os segmentos do néfron de ratos, estando ausente apenas na porção ascendente fina da alça de Henle e com altos níveis

no túbulo proximal (Li *et al.*, 2005).

O XNT é de difícil dissolução em meio aquoso e possui alto custo, o que dificulta o seu uso nos diversos protocolos experimentais. Diante disto, outro ativador da ECA2 endógena, o aceturato de diminazeno (DIZE), foi descrito com o objetivo de obter um composto com características físico-químicas e financeiramente mais favoráveis. Assim, utilizando a mesma técnica empregada para a identificação do XNT, o composto DIZE foi descrito como um ativador da ECA2 (Kulemina *et al.*, 2011). Este composto foi sintetizado pela primeira vez em 1954 para ser utilizado como um antiparasitário em doenças causadas por protozoários (Hochst,1954). Ele ainda continua sendo comercializado com essa finalidade após seis décadas de sua descoberta.

Utilizando o DIZE como um ativador da ECA2 endógena, estudos recentes demonstram que o tratamento oral com esse composto atenua o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, estimula o eixo vasoprotetor do SRA, melhora a função cardíaca e modula a ação das citocinas inflamatórias (Shenoy *et al.* 2013). Em um estudo realizado por Foureaux e colaboradores (2013), foi demonstrado que o tratamento crônico com o DIZE reduz a pressão intraocular de ratos, sendo que esse efeito foi parcialmente mediado pelo receptor Mas. A terapia com DIZE também causou efeito protetor na cardiomiopatia diabética (Coutinho *et al.*, 2014) e na isquemia cardíaca (Qi *et al.*, 2013), no controle do processo inflamatório em camundongos com uveíte (Zheng *et al.*, 2014) e na modulação do perfil metabólico, reduzindo o acúmulo de gordura em ratos (Macedo *et al.*, 2015).

II. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O impacto das doenças renais no organismo humano é considerável, tendo em vista as múltiplas funções desempenhadas pelos rins. A LRA é um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial da atualidade e o número de novos casos tem crescido exponencialmente nos últimos anos (Lameire *et al.*, 2013). Assim, os esforços para reduzir o impacto da LRA são de suma importância no mundo atual. Conseqüentemente, estudos que visem o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese e na fisiopatologia da LRA são fundamentais para a criação de novas estratégias preventivas e terapêuticas para retardar ou mesmo impedir a progressão da lesão renal. É notório na literatura o envolvimento do SRA na progressão da LRA (Cao *et al.*, 2016). Por sua vez, a ECA2 exerce um papel importante no equilíbrio e manutenção do SRA. Estudos utilizando o tratamento crônico com o ativador da ECA2 endógena, o XNT, demonstraram que este composto melhora a função cardíaca, diminui a fibrose renal e cardíaca e reduz a pressão arterial em SHR (Hernandez-Prada *et al.*, 2008; Murça *et al.*, 2012; Haber *et al.*, 2014). Por outro lado, até o momento, poucos estudos avaliaram os efeitos do DIZE em ratos com LRA utilizando diferentes modelos experimentais. Assim, considerando o papel protetor da ECA2, hipotetizamos que a ativação dessa enzima utilizando o composto DIZE possa estar associado a ações benéficas na LRA induzida por gentamicina em ratos.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do ativador da ECA2, o composto DIZE, na LRA em ratos Wistar.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a função renal de ratos tratados e não tratados com DIZE durante e após indução experimental de LRA.
- Avaliar o perfil inflamatório e a expressão de citocinas por histomorfometria e ELISA, respectivamente, de ratos tratados e não tratados com DIZE durante e após indução experimental de LRA.
- Mensurar componentes do SRA em urina de ratos tratados e não tratados com DIZE durante e após indução experimental de LRA.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com idade média de três meses e peso variando entre 250 e 300 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Os animais foram mantidos em biotério apropriado, sob temperatura ambiente e controle de luz automática (7-19 h). Os animais receberam ração para animais de laboratório e água *ad libitum*. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo de número 435/15.

4.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (Quadro 1), sendo que cada grupo foi composto por 7 animais.

Quadro 1: Grupos experimentais e tratamentos administrados.

GRUPOS	TRATAMENTOS
1- CONT/SAL	salina + salina
3 - CONT/DIZE	salina + DIZE
2 - GM/CONT	GM + salina
4 – TERAPÊUTICO	GM + DIZE (7 dias)
5 – PREVENTIVO	GM + DIZE (14 dias)

CONT: controle; DIZE: aceturato de diminazeno; GM: gentamicina; SAL: salina.

4.3. Indução da LRA e Tratamento com DIZE

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas durante 16 dias. Os três primeiros dias foram destinados à aclimação. No quarto dia os animais receberam gentamicina (Gentatec®) por via subcutânea (80 mg/kg/dia, 0,1 mL/100 g de peso corporal da solução 40 mg/mL), duas vezes ao dia, sendo a primeira dose às 08:00 h da manhã e a segunda às 16:00 h (Figura 1). Eles foram tratados de modo preventivo e terapêutico de acordo com os grupos experimentais especificados no Quadro 1. O DIZE (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo, USA) foi administrado por via oral (1 mg/kg via gavagem) diluído em salina. A gavagem controle foi realizada com salina 0,9 % em volume equivalente ao do DIZE.

4.4. Coleta, Eutanásia e Preparação dos Órgãos e Tecidos

Alíquotas de urina (~1 mL) e de sangue de uma das veias da cauda (~1 mL) foram coletadas em cada momento pré-determinado em tubos apropriados (Figura 4). Os tubos das amostras de sangue continham o anticoagulante citrato de sódio. O plasma foi separado por centrifugação (5000 rpm, 10 min) e, juntamente com a urina, foi armazenado a -20°C para análises posteriores da creatinina, osmolalidade, proteinúria e NGAL. O fluxo urinário (FU) e a ingestão de água também foram medidos utilizando gaiolas metabólicas (Figura 4).

Na manhã seguinte ao último dia de tratamento, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1 mL/100 g), utilizado como relaxante muscular, e cloridrato de ketamina 10% (0,1 mL/100 g), anestésico geral. Após a laparotomia e a coleta de sangue pela veia cava inferior, os ratos foram perfundidos com solução de PBS, através de cânula inserida no ventrículo esquerdo, até os rins expostos cirurgicamente tornarem-se limpos. Posteriormente, com a ajuda de uma tesoura, os rins foram rapidamente extraídos, descapsulados e armazenados de acordo com os protocolos a seguir. O rim direito foi seccionado transversalmente e colocado em frascos para fixação por imersão em formalina neutra tamponada (FNT) 10% à temperatura ambiente e, então, transferidos para uma solução de etanol 70%, para análises histológicas. O rim esquerdo foi cortado, transversalmente, na região do hilo. As duas partes foram

colocadas em dois pequenos tubos de plástico vazios, imersos em nitrogênio líquido e em seguida armazenados a -80°C para os ensaios de biologia molecular e imunoenzimáticos.

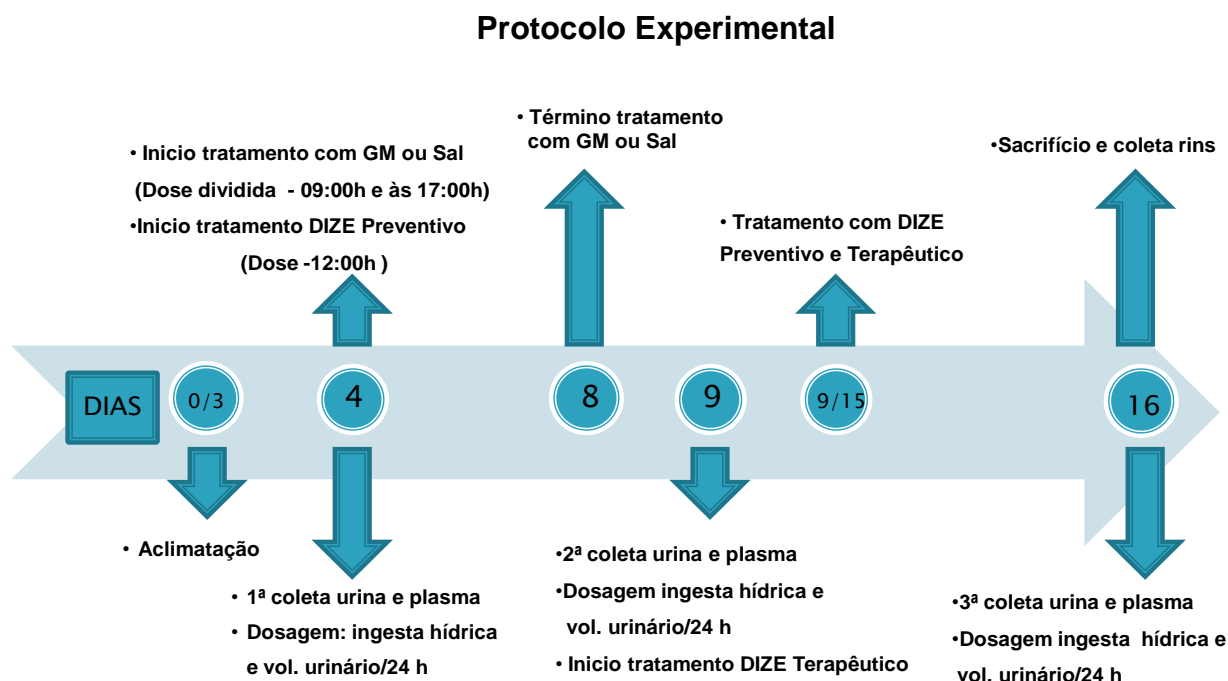


Figura 4: Protocolo experimental de indução de LRA utilizando GM e tratamento com o DIZE. DIZE: aceturato de diminazeno; GM: gentamicina; SAL: salina.

4.5. Procedimentos Analíticos para Avaliação da Função Renal

4.5.1. Dosagem de Creatinina

O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado por meio do *clearance* de creatinina. As dosagens de creatinina urinária e sérica foram realizadas com o kit Bioclin K016 (Quibasa, Brasil), conforme instruções do fornecedor. Esse método consiste em uma reação colorimétrica entre a creatinina e o ácido pícrico, cujo produto é amarelo-avermelhado. Os meios de reação foram preparados de acordo com as orientações do fabricante. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37°C por 10 min. As absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV - 160 A, Japão) em comprimento de onda de 510 nm, acertando o zero com o branco. Essa absorbância foi utilizada para a determinação da

concentração de creatinina nas amostras de urina. Para as amostras de plasma, esse primeiro valor de absorbância foi denominado de A1. Após a leitura de A1, às amostras de plasma e ao branco foram adicionados 0,05 mL do reagente nº 4 (acidificação) e, após a homogeneização, uma segunda leitura de absorbância das amostras de plasma (A2) foi feita também a 510 nm, acertando o zero com o branco. As amostras de urina foram previamente diluídas 1:25 e não passaram pela etapa de acidificação como o plasma.

A concentração de creatinina, em mg/dL, foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = (A1-A2/\text{absorbância padrão}) \times 3$$

Como a reação segue a lei de Lambert-Beer, o fator de calibração pode ser usado.

$$\text{Fator de calibração} = \text{concentração do padrão} / \text{absorbância do padrão}$$

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = (A1-A2) \times \text{fator de calibração}$$

$$\text{RFG (mL/min)} = ([\text{creatinina}] \text{ urina} \times \text{fluxo urinário}) / [\text{creatinina}] \text{ plasma}$$

4.5.2. Osmolalidade Plasmática e Urinária

A medida da osmolalidade sérica e urinária foi feita utilizando um osmômetro de ponto de congelamento (Microsmette, Advanced Instruments). As amostras de plasma foram diluídas 1:2 e as amostras de urina foram diluídas 1:4. Previamente à leitura das amostras, o osmômetro foi calibrado com soluções padrões cujas concentrações eram de 100 mOsm/kg, 290 mOsm/kg e 500 mOsm/kg.

4.5.3. Cálculos de Outros Parâmetros Renais

Conhecendo-se os valores do RFG e do FU, bem como da osmolalidade plasmática e urinária, calculou-se outros parâmetros renais, como descritos a seguir:

- **Fração de excreção de água:** $FE_{H_2O} (\%) = FU / RFG \times 100$
- **Clearance de água livre:** $CH_2O (\text{Litros}/24\text{h}) = FU - Cosm$

- **Clearance osmolar:** $\text{Cosm (Litros/24h)} = \frac{\text{Osmolalidade}_{\text{urina}} \times \text{FU}}{\text{Osmolalidade}_{\text{plasma}}}$

4.5.4. Proteinúria

Para determinar a concentração de proteína na urina, as amostras de urina (24h) coletadas ao final de cada período de coleta foram armazenadas a -20 °C até o momento da dosagem. Essa dosagem foi feita utilizando o kit comercial Sensi Prot (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fornecedor. A reação ocorre entre o vermelho de pirogalol e o molibdato de sódio que, quando combinado com a proteína presente na amostra, em meio ácido, desenvolve um cromóforo de cor azul. A intensidade da cor formada foi quantificada a 600 nm, sendo proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

Os valores foram calculados com base no fator de calibração e a concentração de proteína foi expressa em mg/dL.

4.5.5. NGAL

Os valores de NGAL foram obtidos por meio da técnica de ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA). Após a coleta, as amostras de urina foram centrifugadas (5000 rpm, 10 min) e armazenados a -80 °C. A dosagem foi realizada utilizando o kit específico da Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA, Lipocalin-2/NGAL ELISA, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

4.6. Determinação da Migração Celular para o Rim e Quantificação de Mediadores Inflamatórios

4.6.1. Dosagem da Atividade de Mieloperoxidase e N-Acetil-β-D-Glicosaminidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. A quantificação de MPO é uma técnica utilizada como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos para o foco

inflamatório e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (Mullane *et al.*, 1985; Cross *et al.*, 2003). Já a N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem de NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (Bailey., 1988).

4.6.2. Preparo das Amostras para Dosagem da Atividade de Mieloperoxidase e N-Acetil- β -D-Glicosaminidase

Para realizar o processamento dos tecidos para os ensaios de MPO e NAG, adicionou-se 100 mg de rim a 1 mL da solução composta de NaCl 0,4 mol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, cloreto de benzalcônio 0,1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, tween 20 0,05% (p/v), BSA 0,5% (p/v) e aprotinina 20 UI utilizando um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 4 °C, 10 min). O *pellet* foi homogeneizado em 1,9 mL do Tampão 1, pH 4,7, contendo 0,1 mol/L de NaCl, 0,02 mol/L de Na₂HPO₄ e 0,015 mol/L de EDTA, e centrifugado (10.000 rpm 4°C,10 min). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* submetido à lise de hemácias através da adição de 1,5 mL de NaCl 0,2% (p/v) por um período de aproximadamente 30 segundos. Decorrido esse tempo, foi adicionado 1,5 mL de uma solução de NaCl 1,6% (p/v) com glicose 5% (p/v) e a solução final foi homogeneizada e dividida igualmente em dois eppendorfs que foram centrifugados (10.000 rpm 4 °C, 10 min). O sobrenadante foi novamente desprezado, cada tubo devidamente identificado (NAG e MPO) e foram adicionados 800 μ L de salina 0,9% (p/v) com triton X-100 1% (p/v), para o ensaio de NAG; ou 800 μ L de tampão fosfato [0,05 mol/L de Na₃PO₄ e 0,5% (p/v) de hexadecil-trimetil brometo de amônia (HETAB), pH 5,4] para o ensaio de MPO. Cada solução foi homogeneizada e congelada em freezer -80°C para posterior realização de ensaio enzimático.

4.6.3. Dosagem da Atividade da Mieloperoxidase

O tecido processado foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para liberação da enzima das vesículas citoplasmáticas e centrifugado (10.000 rpm, 4°C,15 min). O sobrenadante,

diluído em tampão fosfato [0,05 mol/L de Na_3PO_4 e 0,5 % (p/v) de hexadeciltrimetil brometo de amônia em pH 5,4] na proporção de 1:2 foi utilizado para o ensaio enzimático. A reação se inicia com a adição de 25 μL tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração final de 1,6 mmol/L em 25 μL da amostra diluída em uma placa de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A placa foi levada a estufa a 37°C por 10 min e depois foram adicionados 100 μL de peróxido de hidrogênio 1,2 mmol/L em tampão fosfato de sódio 80 mmol/L, pH 5,4, e, em seguida, foi feita uma nova incubação a 37°C por 10 min. Para o término da reação, adicionou-se 100 μL de H_2SO_4 1 mol/L. A atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm. Os resultados foram expressos como unidades relativas de MPO em 100 mg de tecido.

4.6.4. Dosagem da Atividade da N-Acetil- β -D-Glicosaminidase

O tecido processado foi centrifugado (3.000 rpm, 4°C, 10 min) e o sobrenadante diluído na proporção de 1:2 em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 mol/L e Na_2HPO_4 0,1 mol/L em pH 4,5). A reação iniciou-se com a adição de 100 μL das amostras diluídas em uma placa de 96 poços. Às amostras foram adicionados 100 μL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina, Sigma) diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5 na concentração de 2,24 mol/L. Sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 10 min. Após essa incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de tampão glicina 0,2 mol/L, pH 10,6. A absorbância foi analisada por espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos como unidades relativas de NAG em 100 mg de tecido.

4.6.5. Processamento dos Tecidos para Quantificação de Citocinas

Adicionou-se 100 mg de rim em 1 mL de solução de extração de citocinas [NaCl 0,4 mol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, cloreto de benzalcônio 0,1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tween 20 0,05 % (p/v), BSA 0,5% (p/v) e a protinina 20 UI] para o processamento em homogeneizador de tecidos

(Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 4°C, 10 min), o sobrenadante foi recolhido em eppendorf e congelado a -80 °C para a detecção de citocinas por ELISA.

4.6.6. Determinação dos Níveis de Citocinas e Quimiocinas

A quantificação dos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) no rim dos animais foi realizada através de ELISA, utilizando-se de kits específicos da Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, EUA, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. Todos os kits são baseados na técnica de ELISA em sanduíche. As concentrações foram expressas como pg/mL. A sensibilidade dos ensaios foi de 5 pg/mL para TNF- α e IL-1 β , 10 pg/mL para IL-10 e 36 pg/mL para IL-6.

4.7. Análise Histopatológica

O rim direito de todos os animais foi coletado, colocado em solução de formol tamponado a 10 % e submetido à análise histológica. Técnicas convencionais de coloração com hematoxilina e eosina foram usadas na preparação das lâminas. Os cortes dos blocos foram não seriados com a intenção de visualização de néfrons diferentes. As fotos foram capturadas na objetiva de 40 vezes.

4.8. Análise Morfométrica

Todos os cortes histológicos foram visualizados pela objetiva de 40 vezes para digitalização de 40 imagens através da microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan), perfazendo uma área total de $21,3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de interstício cortical renal analisado em cada animal. Uma sequência de algoritmos do programa KS300 foi elaborada para o processamento das imagens, segmentação, definição das condições de morfometria e contagem dos núcleos (Caliari *et al.*, 1997).

As técnicas de processamento de imagens foram aplicadas para evidenciar os núcleos das células. Através da segmentação, foram

selecionados os pixels dos núcleos de todos os tipos celulares presentes no interstício renal e excluídos aqueles do citoplasma celular e de outras estruturas do corte histológico. Mediante esse processo, foi criada uma imagem binária e contados os núcleos de todos os tipos celulares presentes no interstício renal.

A contagem obtida nos animais controles foi considerada como o padrão normal de celularidade do interstício renal, sem infiltrado inflamatório. Já nos animais tratados com GM, foram contados os núcleos dos tipos celulares normalmente presentes no interstício renal e os núcleos dos leucócitos recrutados no processo inflamatório, permitindo a avaliação quantitativa da inflamação.

4.9. Avaliação dos Níveis Urinários de Componentes do SRA

Os níveis de Ang II, Ang-(1-7), ECA e ECA2 foram medidos por meio da técnica de ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA). Após a coleta, as amostras de urina foram centrifugadas (5000 rpm, 10 min) e armazenadas a -80 °C. A dosagem foi realizada utilizando o kit específico da MyBioSource, San Diego, CA, USA, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Todos os kits são baseados na técnica de ELISA em sanduíche, com exceção da mensuração da ECA, onde o kit utiliza o método ELISA competitivo. As concentrações foram expressas como pg/mL. A sensibilidade dos ensaios foi de 1 pg/mL para ECA e ECA2, 2 pg/mL para Ang-(1-7) e 18,75 pg/mL para Ang II.

4.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com a utilização do *software* Graph Pad Prism 5. O teste estatístico empregado para a comparação das médias de vários grupos contendo dados com distribuição paramétrica foi One-way ANOVA seguido do pós-teste de Neuman-Keuls ou Bonferroni.

Os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade da ocorrência do erro do tipo 1 foi menor que 5% ($p < 0,05$). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

V. RESULTADOS

5.1. Peso Corporal

Os ratos que receberam GM com ou sem o tratamento com o DIZE tiveram redução acentuada do peso corporal em comparação aos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE (Figura 5). O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esse parâmetro.

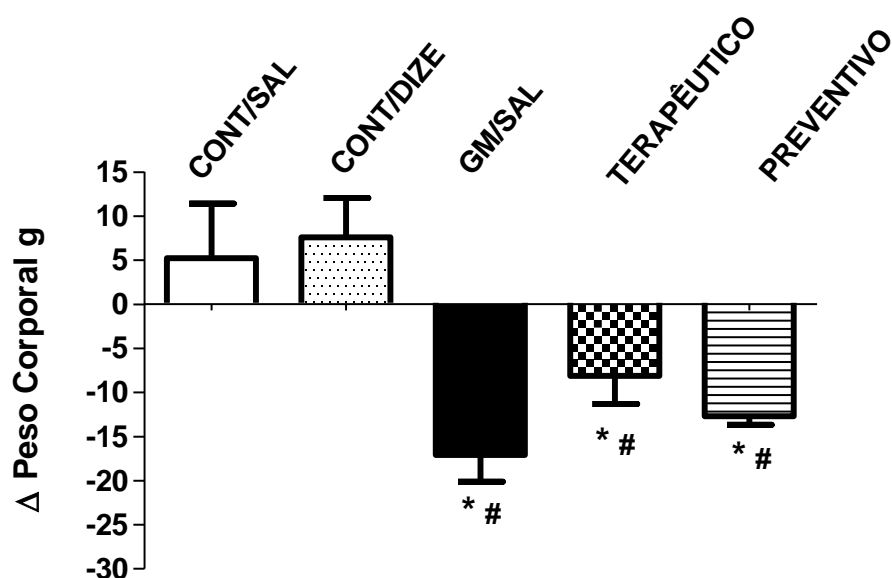


Figura 5 – Efeitos do DIZE no peso corporal de ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0.05 vs. CONT/DIZE (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

5.2. Peso dos Rins

A Figura 6 mostra os efeitos da GM e do DIZE no peso dos rins direito e esquerdo dos ratos ao término do período experimental. Os ratos administrados com GM apresentaram um aumento no peso renal direito e esquerdo quando comparados aos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE. Esse efeito não foi bloqueado pelo DIZE. O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esse parâmetro.

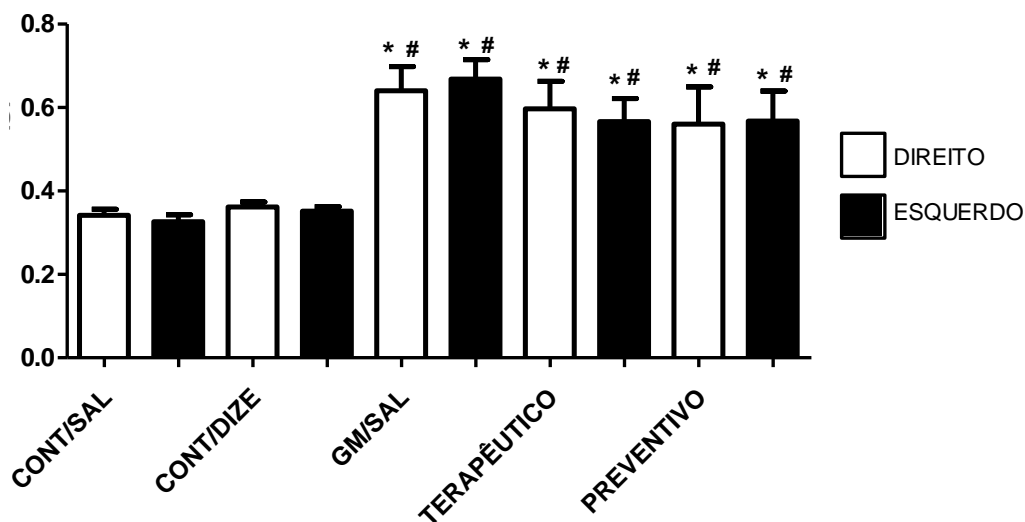


Figura 6 – Efeitos do DIZE no peso do rim direito e esquerdo em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0.05 vs. CONT/DIZE (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

5.3. Ingesta Hídrica, Volume Urinário e Balanço Hídrico

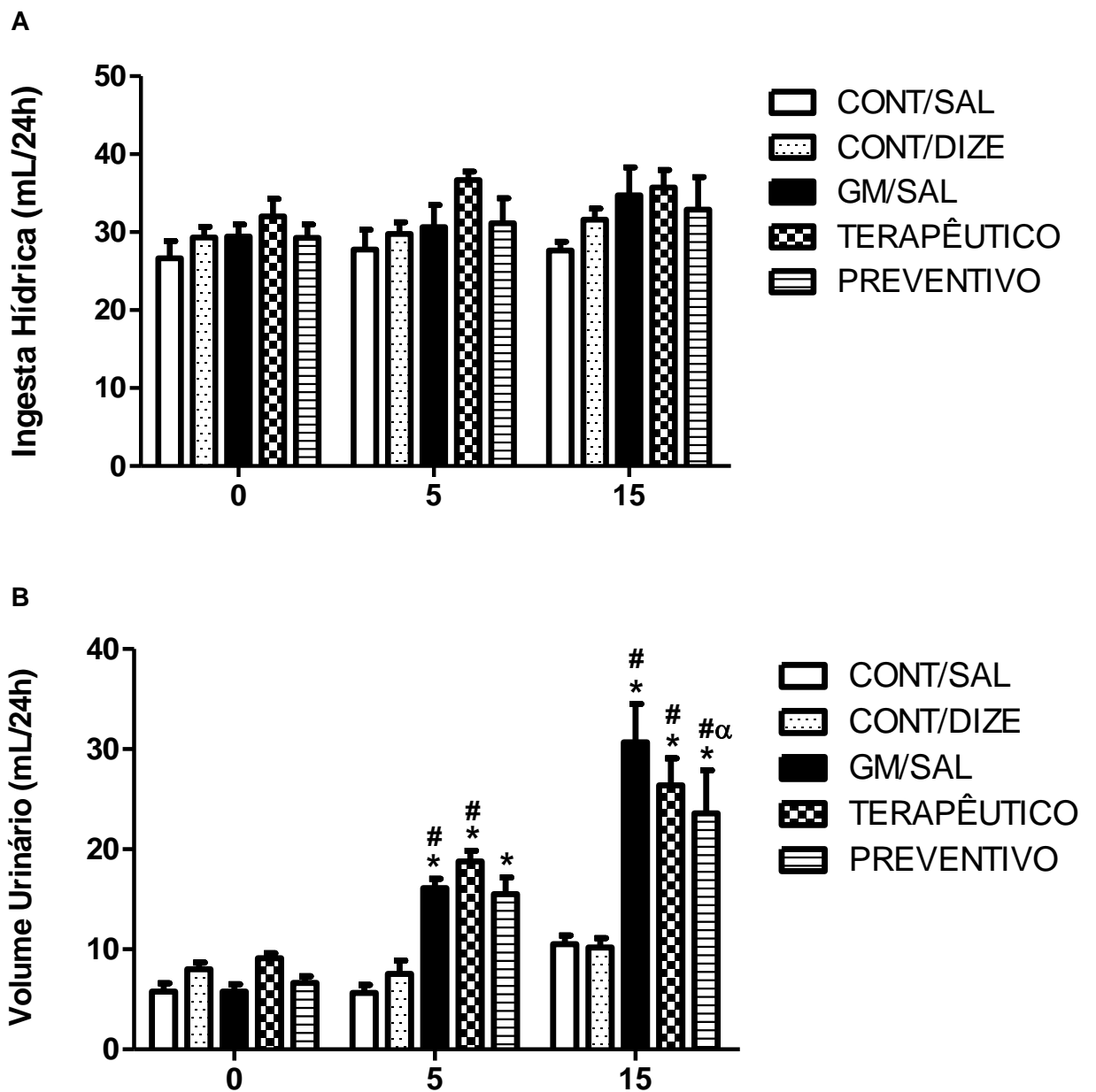
O resultado da avaliação da ingestão hídrica, volume urinário e do balanço hídrico é indicado nas Figuras 7A, 7B e 7C, que mostram os efeitos da administração da GM e do tratamento com o ativador da ECA2 (DIZE) ao longo dos quinze dias do período experimental. A Figura 7A mostra que não houve alterações na ingestão hídrica ao longo dos 15 dias de experimento em todos os grupos avaliados.

Já a Figura 7B mostra que não houve alteração no volume urinário no período basal e que a administração da GM após o 5º dia foi capaz de aumentar significativamente o volume urinário dos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo, quando comparados ao grupo CONT/SAL. Esse aumento permaneceu até o final do experimento. Observa-se que o DIZE foi capaz de reduzir o volume urinário do grupo Preventivo em relação ao grupo GM/SAL (15º dia).

Em relação ao balanço hídrico, a Figura 7C demonstra que a GM foi capaz de aumentar o balanço hídrico dos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo ao longo do experimento. Exceção pode ser vista no grupo

Preventivo após a indução da LRA (5º dia) onde esse aumento não foi observado. Assim, a administração do DIZE não foi capaz de atenuar o aumento observado no balanço hídrico em ambos os grupos, preventivo e terapêutico, ao final do experimento. As alterações no volume urinário foram refletidas no balanço hídrico, ou seja, aumentos no volume urinário foram acompanhados por aumentos no balanço hídrico após a indução da LRA nos grupos GM, Terapêutico e Preventivo.

A administração do DIZE no grupo CONT/DIZE não alterou nenhum dos parâmetros avaliados.



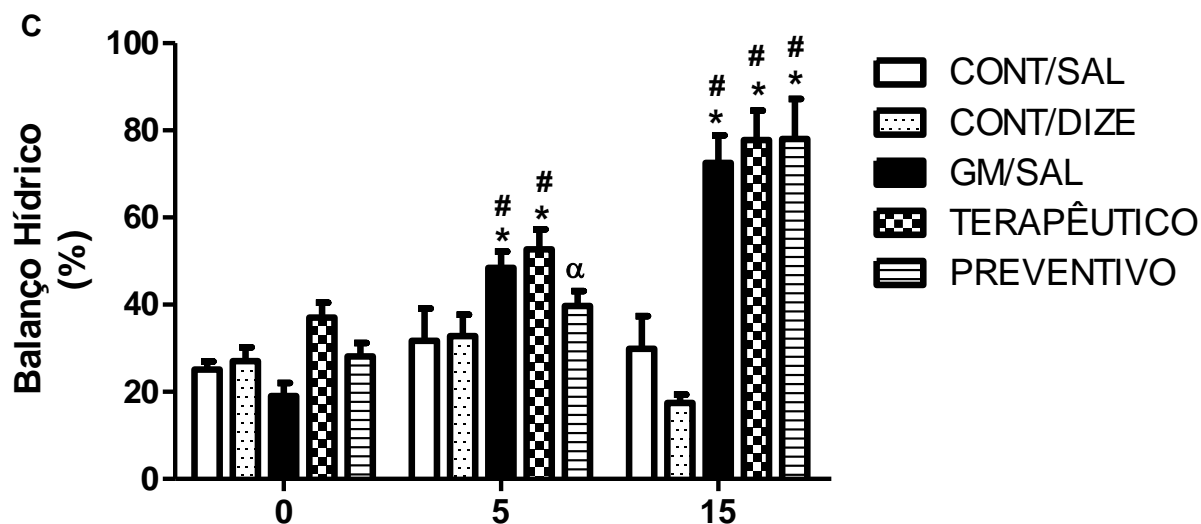


Figura 7 – Efeitos do DIZE na função renal de ratos com LRA induzida pela gentamicina (GM) sobre a ingesta hídrica (A), volume urinário (B) e balanço hídrico (C). Tempo 0, 5 dias após a administração da GM e do DIZE e ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0.05 vs. CONT/DIZE, ^αP<0,05 vs. GM/SAL (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

5.4. Creatinina Plasmática e Ritmo de Filtração Glomerular

Como mostrado na Figura 8A, a creatinina plasmática não estava alterada no tempo 0 em nenhum grupo experimental. A GM promoveu um aumento significativo da creatinina plasmática em ratos do grupo GM/SAL e Terapêutico no 5^o e 15^o dia do experimento. Essa alteração foi parcialmente revertida no grupo Terapêutico após o tratamento com o DIZE no 5^o dia. Não foi observado nenhuma alteração no grupo CONT/DIZE.

O RFG (Figura 8B) foi significativamente reduzido pela GM nos ratos dos grupos CONT/GM e Terapêutico no 5^o dia e ao final do experimento. Esse efeito não foi observado no grupo Preventivo após o tratamento com o DIZE no dia 5 após a indução da LRA, sendo que houve uma normalização desse parâmetro após o 15^a dia de experimento em relação ao grupo CONT/SAL. O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esses parâmetros e também não foram observadas alterações entre os grupos no

tempo 0.

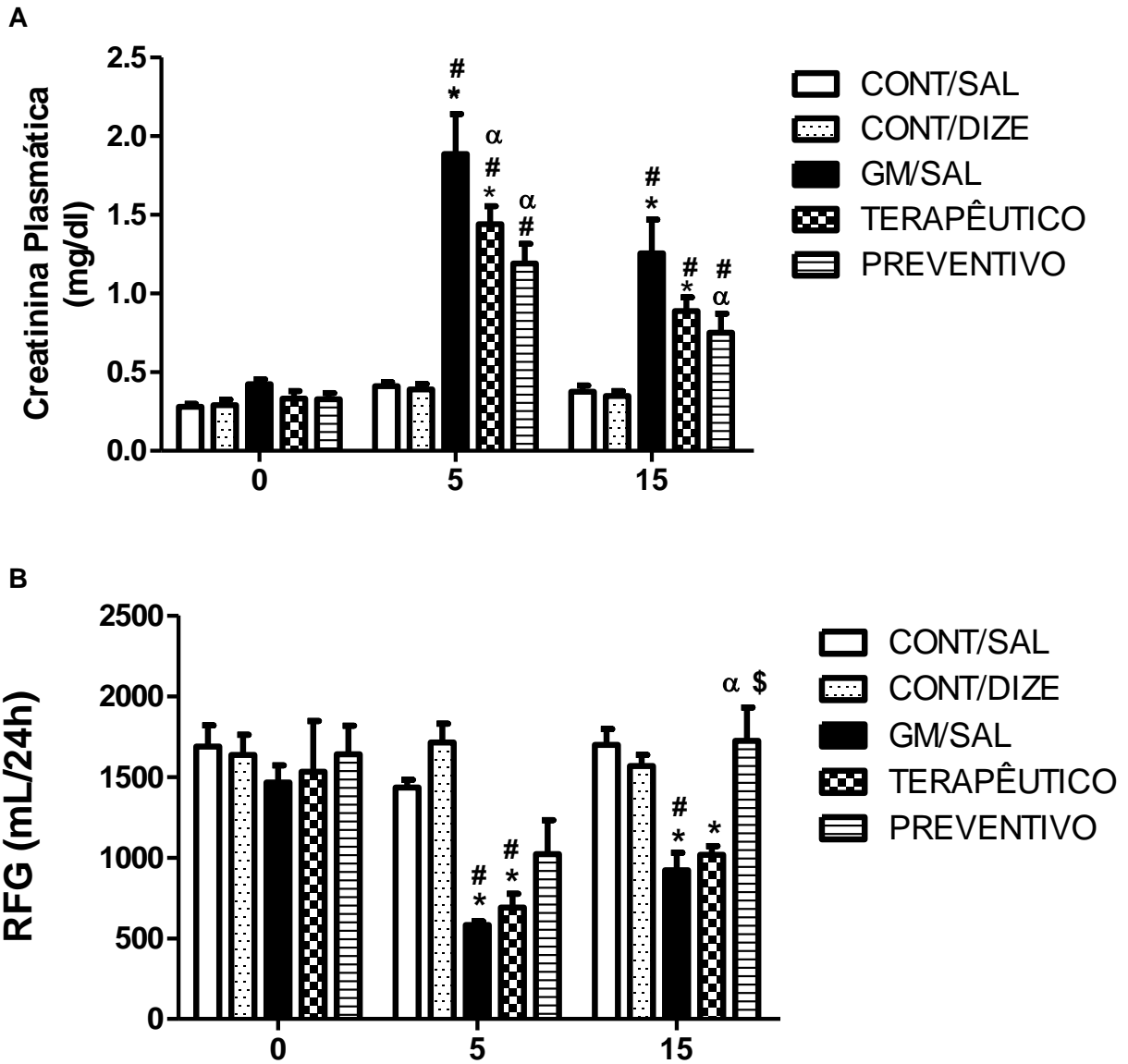


Figura 8 – Efeitos do DIZE na concentração plasmática de creatinina (A) e no RFG (B) de ratos com LRA. Tempo 0, 5 dias após a administração da GM e do DIZE e ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0,05 vs. CONT/DIZE, ^αP<0,05 vs. GM/SAL e ^{\$}P<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

5.5. Clearance Osmolar e Clearance de Água Livre

A Figura 9A ilustra os efeitos do DIZE no *Cosm* em ratos normais e em ratos com LRA induzida pela GM. Nenhuma alteração foi observada no tempo basal. No 5º dia após a indução da LRA, o grupo Terapêutico apresentou um aumento significativo em relação aos grupos CONT/SAL, CONT/DIZE e GM/SAL, sendo que o grupo Preventivo apresentou uma redução em relação ao grupo Terapêutico (5º dia). Ao final dos 15 dias, um aumento significativo foi observado apenas no grupo GM/SAL.

Já o CH₂O livre (Figura 9B) foi significativamente reduzido apenas no grupo GM/SAL após 5 dias da administração, da GM. Nenhuma outra alteração significativa foi observada nos tempos 0, 5º e 15º dias nos grupos avaliados.

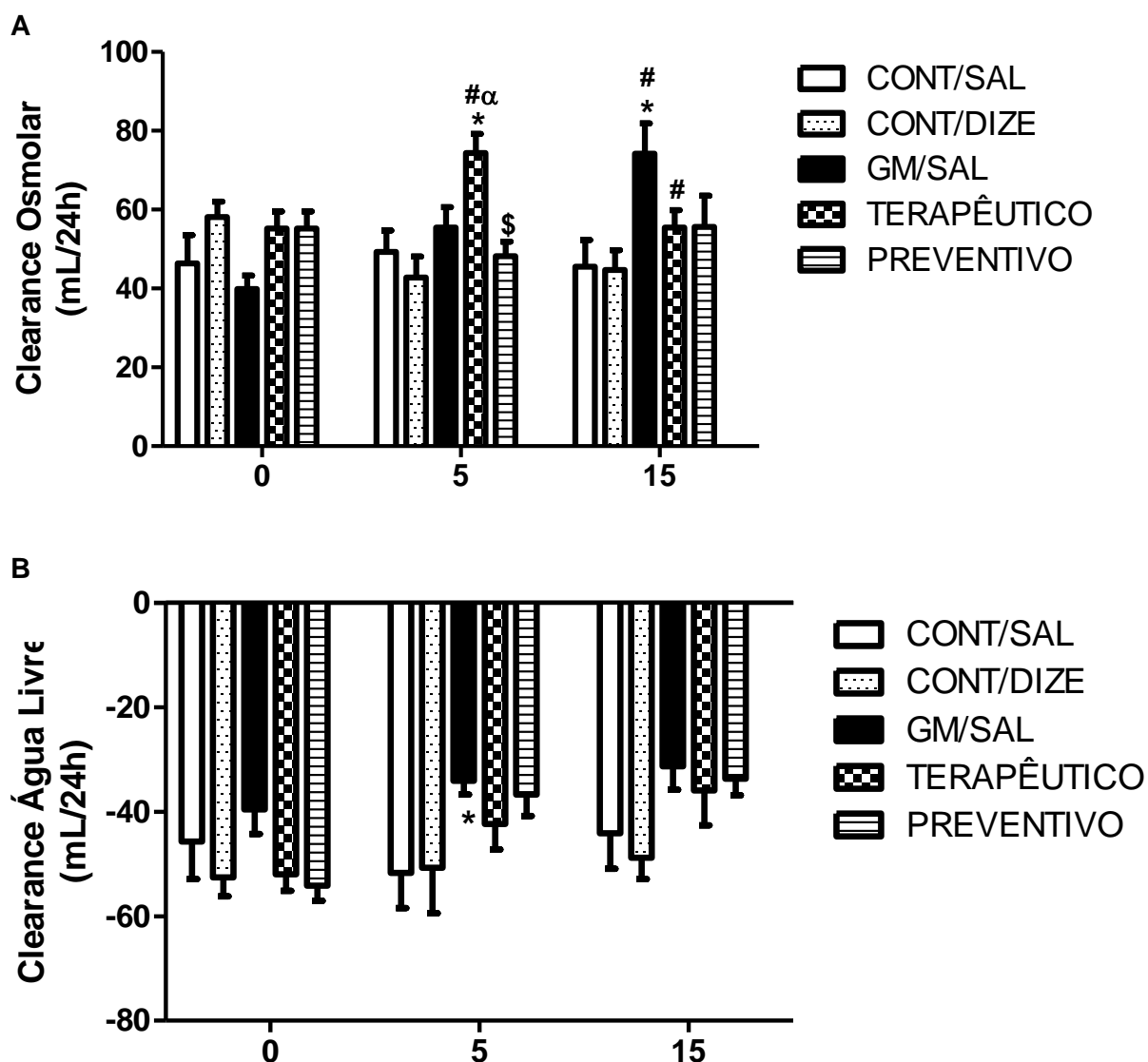
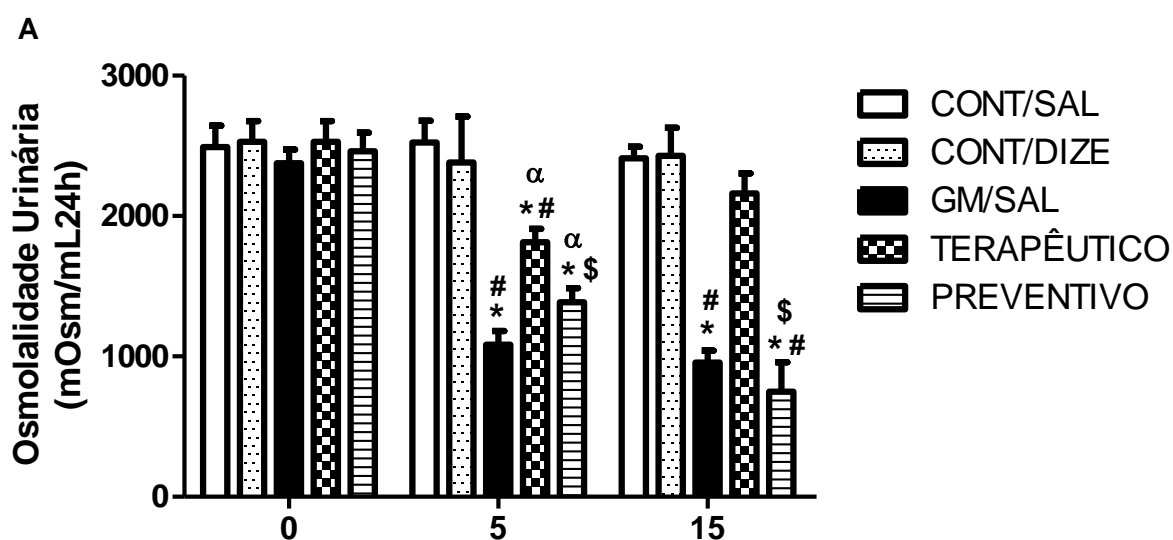


Figura 9 – Efeitos do DIZE no clearance osmolar (A) e no clearance de água livre (B) em ratos com LRA. Tempo 0, 5 dias após a administração da GM e do DIZE e ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0.05 vs. CONT/DIZE, °P<0,05 vs. GM/SAL e \$P<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

5.6. Osmolalidades Urinária e Plasmática

As Figuras 10A e 10B mostram os valores das osmolalidades urinária e plasmática nos grupos experimentais propostos. Observamos uma redução significativa na osmolalidade urinária nos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo no 5^a dia após indução da LRA em relação ao grupo CONT/SAL. No 15^a dia, essa redução não foi observada no grupo Terapêutico. Além disso, o tratamento com o DIZE (preventivo ou terapêutico) reduziu o efeito da GM na osmolalidade urinária no dia 5 (Figura 10A). Não foram observadas alterações significativas nos três tempos experimentais na osmolalidade plasmática (Figura 10B). O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esses parâmetros.



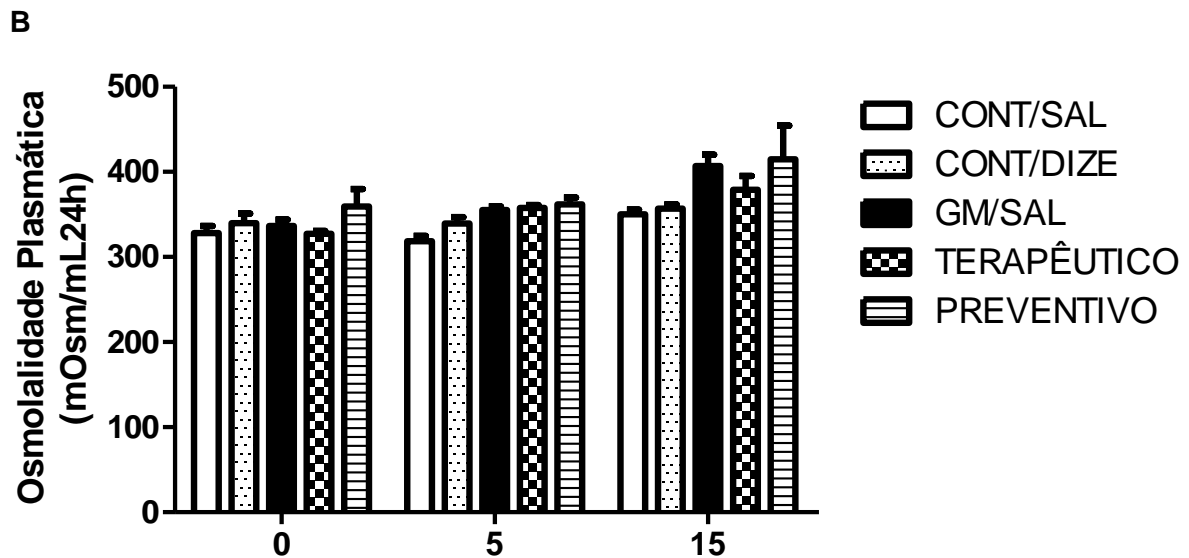


Figura 10 – Efeitos do DIZE na osmolalidade urinária (A) e na osmolalidade plasmática (B) em ratos com LRA. Tempo 0, 5 dias após a administração da GM e do DIZE e ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0.05 vs. CONT/DIZE, ^aP<0,05 vs. GM/SAL e ^sP<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

5.7. Fração de Excreção de Água Livre

Não houve alterações nesse parâmetro no tempo basal. A GM promoveu uma elevação significativa da fração de excreção de água no 5º dia de tratamento nos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo em comparação com o grupo CONT/SAL. No 15º dia, esse resultado foi prevenido parcialmente no grupo Preventivo. O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esse parâmetro em nenhum dos tempos propostos.

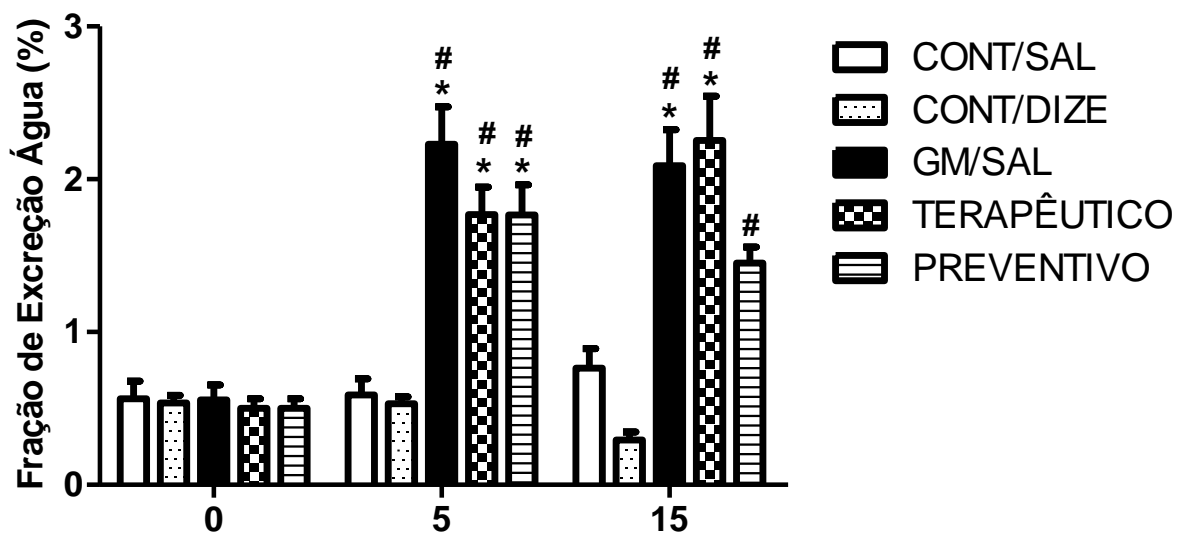


Figura 11 – Efeitos do DIZE na fração de excreção de água livre em ratos com LRA. Tempo 0, 5 dias após a administração da GM e do DIZE e ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL e #P<0.05 vs. CONT/DIZE (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

5.8. Proteinúria

A GM promoveu um aumento significativo na concentração de proteína excretada na urina (mg/24h) nos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo (5^o dia) em relação ao grupo CONT/SAL. A quantidade de proteínas na urina no grupo Preventivo mostrou-se menor quando comparada ao grupo Terapêutico após o dano agudo renal. O uso do ativador da ECA2 foi capaz de amenizar a ação da gentamicina sobre os glomérulos nos grupos Terapêutico e Preventivo no 15^o dia. Não ocorreram alterações significativas nos grupos experimentais no tempo 0. O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esse parâmetro.

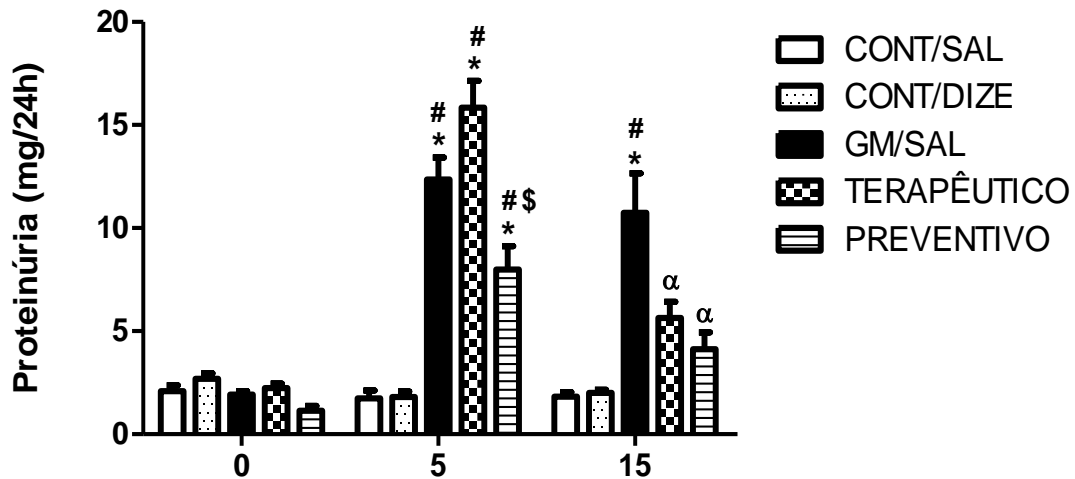


Figura 12 – Efeitos do DIZE na excreção urinária de proteína em ratos com LRA. Tempo 0, 5 dias após a administração da GM e do DIZE e ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0,05 vs. CONT/DIZE, α P<0,05 vs. GM/SAL e $\text{\textcircled{S}}$ P<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

5.9. NGAL

Os níveis da proteína NGAL na urina ao final do protocolo experimental apresentaram-se significativamente aumentados nos ratos submetidos à administração da GM com ou sem o tratamento com o DIZE em comparação aos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE (Figura 13). O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esse parâmetro.

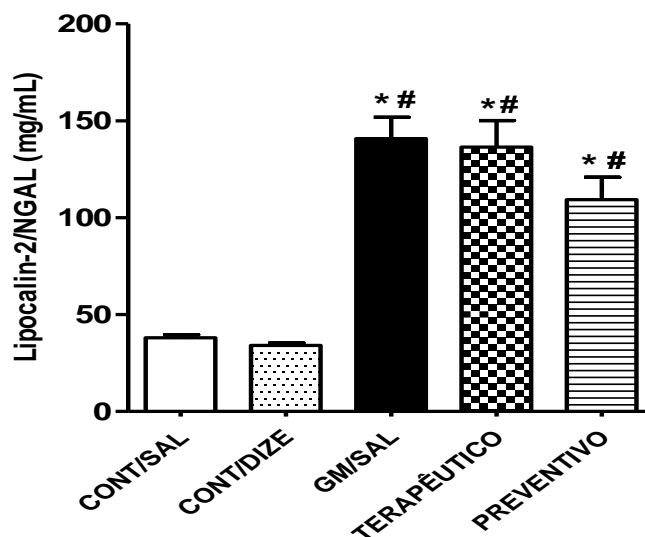


Figura 13 – Efeitos do DIZE na excreção urinária da proteína NGAL em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL e #P<0.05 vs. CONT/DIZE (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

5.10. Atividade da Mieloperoxidase Renal

Ao final dos 15 dias do experimento, a atividade da enzima MPO renal estava acentuadamente aumentada nos ratos do grupo GM/SAL, Terapêutico e Preventivo em comparação com os ratos ao grupo CONT/SAL e CONT/DIZE. Esse aumento foi significativamente reduzido nos ratos dos grupos Terapêutico e Preventivo quando comparados ao grupo GM/SAL. Essa diminuição foi maior no grupo Preventivo em comparação ao grupo Terapêutico (Figura 14). O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esse parâmetro.

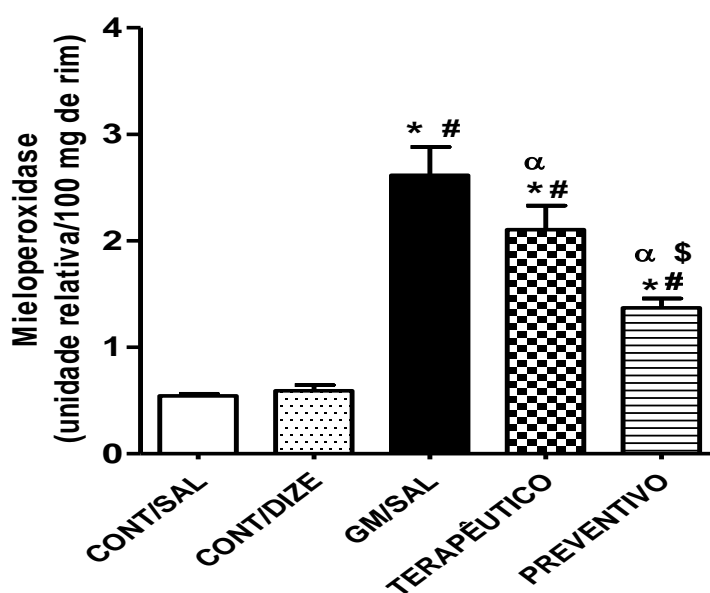


Figura 14 – Efeitos do DIZE na atividade da enzima MPO em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0.05 vs. CONT/DIZE, α P<0,05 vs. GM/SAL e \$P<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

5.11. Atividades da N-Acetil-β-D-Glicosaminidase Renal

A concentração de NAG no tecido renal nos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo estava aumentada em relação ao grupo CONT/SAL. Efeito esse parcialmente prevenido pelo tratamento com o DIZE, que apresentou uma redução significativa em relação aos grupos GM/SAL e Terapêutico (Figura 15). O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esse dado.

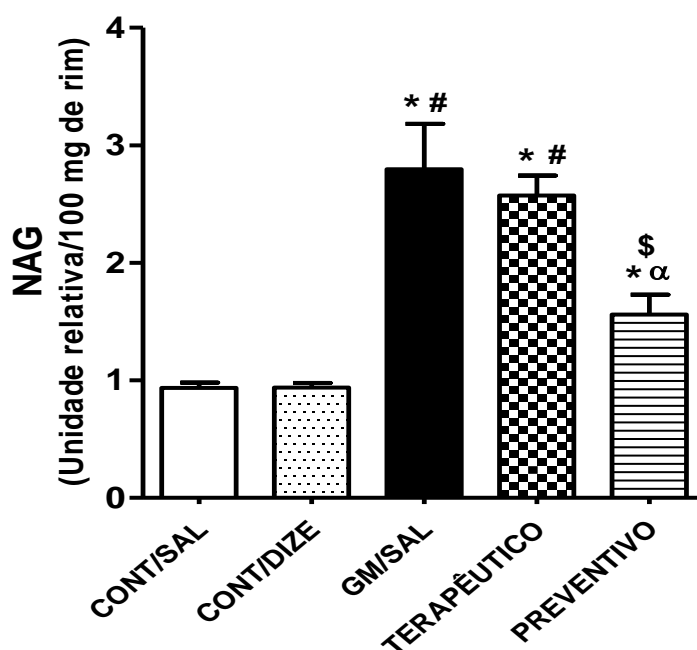


Figura 15 – Efeitos do DIZE na atividade da enzima NAG em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0.05 vs. CONT/DIZE, αP<0,05 vs. GM/SAL e \$P<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

5.12 Citocinas Renais

A análise das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α presentes no tecido renal indica um aumento nos grupo GM/SAL, Terapêutico e Preventivo em relação aos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE ao final do experimento. Esse efeito foi prevenido pelo DIZE (grupo Preventivo), quando comparado ao grupo GM/SAL. O protocolo Terapêutico também foi capaz de reduzir o efeito da GM no que se refere ao TNF-α. A citocina IL-10 demonstrou um aumento somente no grupo

Preventivo quando comparado aos demais grupos. O DIZE quando administrado em animais saudáveis não alterou esses parâmetros (Figura 16).

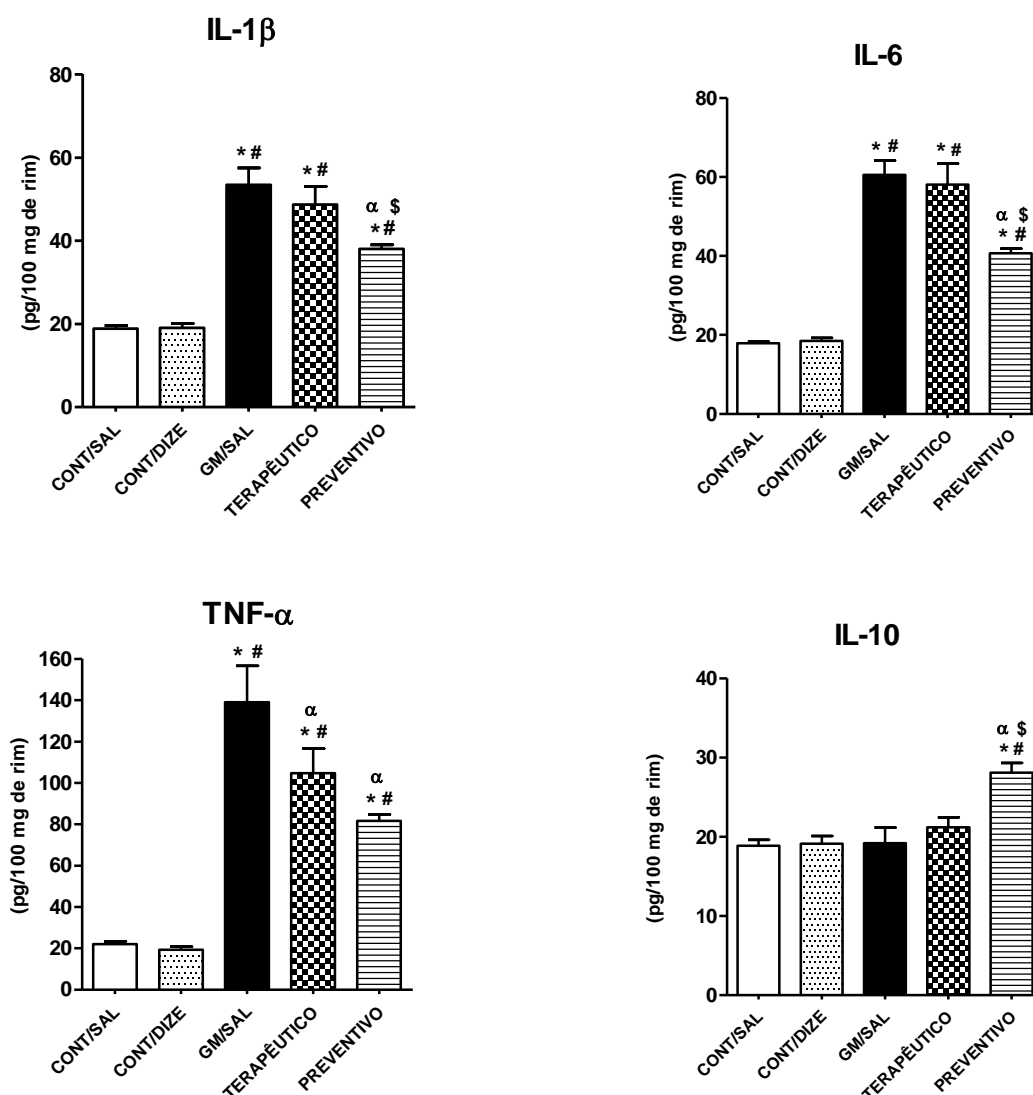


Figura 16 – Efeitos do DIZE nos níveis renais das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0,05 vs. CONT/DIZE, αP<0,05 vs. GM/SAL e \$P<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

5.13. Análise Histopatológica

A análise histopatológica dos rins dos animais dos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE apresentaram aspecto normal, com preservação da arquitetura do

parênquima renal (Figuras 17A e 17B). A GM atuou como um agente pró-inflamatório causando um aumento focal do infiltrado inflamatório de células mononucleares, assim como da área intersticial e da necrose tubular, com uma evidente descamação tubular (Figura 17C). Nos grupos Terapêutico e Preventivo esse quadro foi observado com menor intensidade, com uma redução do infiltrado inflamatório, maior integridade tecidual e redução da necrose tubular (Figuras 17D e 17E).

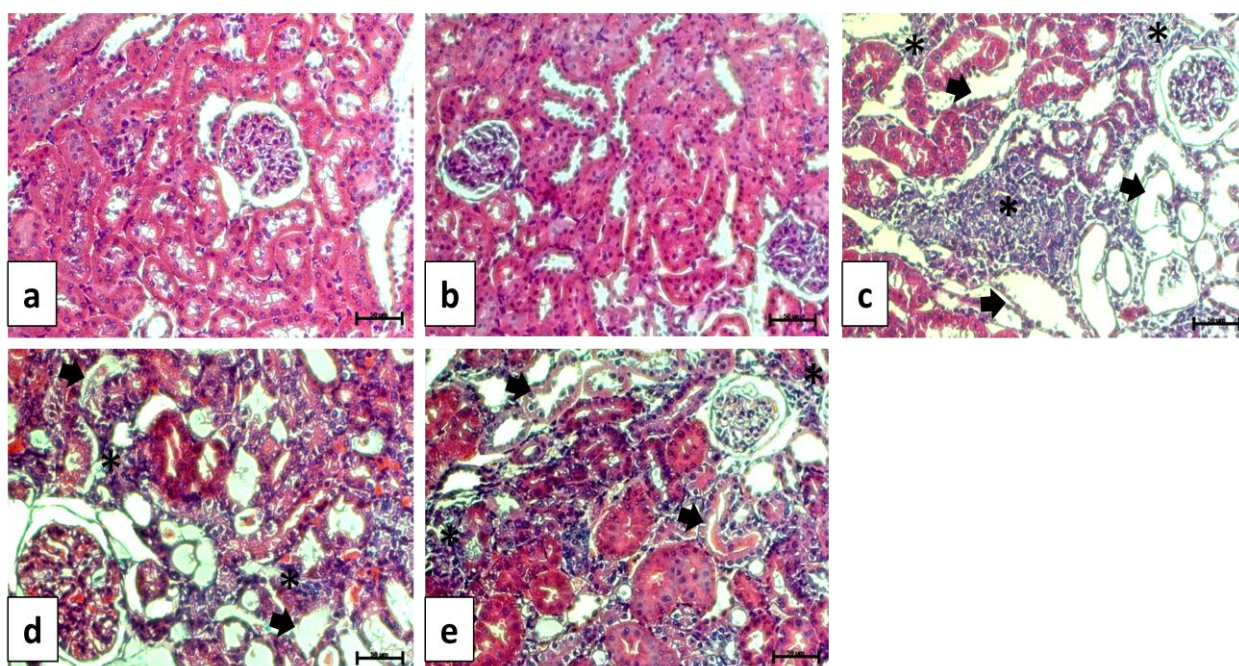


Figura 17 – Fotomicrografias representativas dos efeitos do DIZE na morfologia renal em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: (A) CONT/SAL n=7, (B) CONT/DIZE n=7, (C) GM/SAL n=7, (D) Terapêutico n=7 e (E) Preventivo n=6. (*) infiltrado celular e (seta) necrose tubular. H & E; barra 50 μ m.

5.14. Análise Morfométrica da Resposta Inflamatória

O resultado da análise de celularidade do interstício renal está apresentado na Figura 18. Constata-se que nos grupos onde a GM foi administrada há um aumento do número de células inflamatórias quando comparado aos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE. Esses valores foram significativamente reduzidos nos grupos tratados com GM e DIZE, tanto no protocolo preventivo quanto no terapêutico, confirmando, assim, a análise

morfológica mostrada anteriormente (Figura 18).

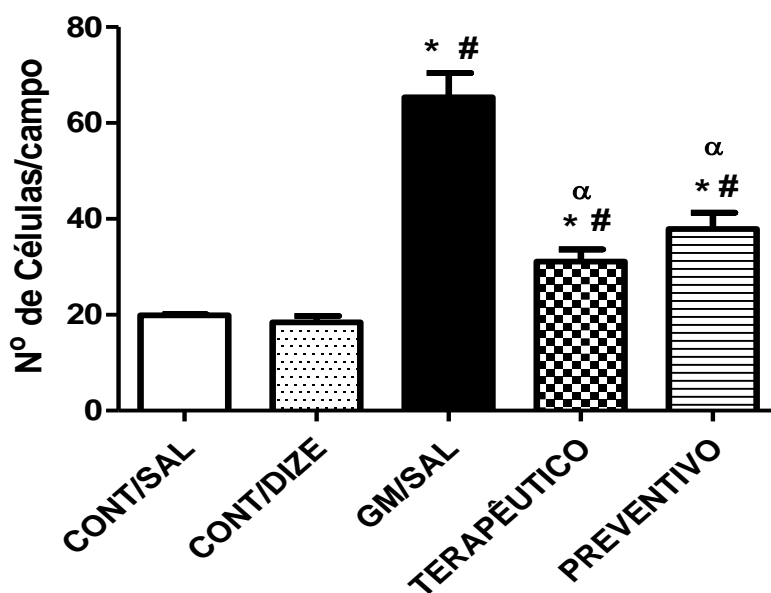


Figura 18 – Efeitos do DIZE no número de células inflamatórias em ratos com LRA ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0,05 vs. CONT/DIZE e ^αP<0,05 vs. GM/SAL (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

5.15. Níveis Urinários dos Componentes do SRA

Conforme apresentado na Figura 19, logo após a indução da LRA não foram observadas alterações nos níveis urinários de ECA, Ang II e ECA2. Entretanto, o mesmo não foi visto na concentração da Ang-(1-7), cujos níveis urinários foram significativamente maiores no grupo Preventivo que nos demais grupos avaliados. Ao final do protocolo experimental, os níveis renais de ECA e Ang II nos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo foram reduzidos em relação aos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE. Em relação à Ang-(1-7) ocorreu um aumento na concentração desse peptídeo no grupo Terapêutico em comparação com os grupos controles. O grupo Preventivo apresentou redução nos níveis de Ang-(1-7) em relação ao grupo Terapêutico. Não foram observadas alterações nos níveis de ECA2 no final do experimento.

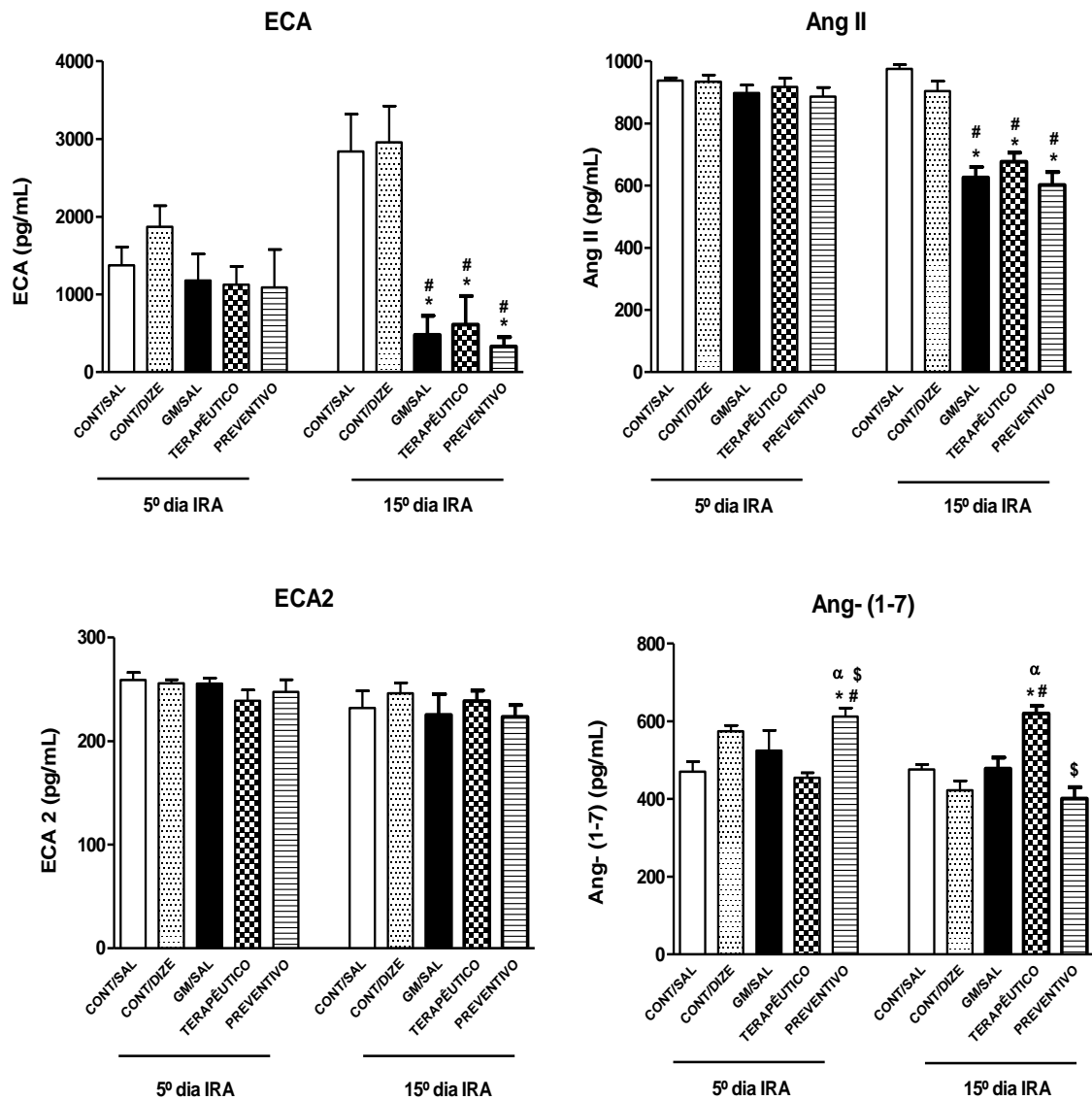


Figura 19 – Efeitos do DIZE nos níveis urinários de ECA, Ang II, ECA2 e Ang-(1-7) em ratos com LRA. Tempo 5 dias após a administração da GM e do DIZE e ao final dos 15 dias de experimento. Grupos: CONT/SAL n=7, CONT/DIZE n=7, GM/SAL n=7, Terapêutico n=7 e Preventivo n=6. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. CONT/SAL, #P<0,05 vs. CONT/DIZE, °P<0,05 vs. GM/SAL e §P<0,05 vs. Terapêutico (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

VI. DISCUSSÃO

A busca por possíveis estratégias terapêuticas que possam prevenir ou atenuar as graves alterações causadas em virtude da instalação de um quadro de LRA são de extrema importância e cada vez mais desperta o interesse de pesquisadores (Michael *et al.*, 2009). O diagnóstico e tratamento instituídos precocemente podem tornar reversível uma lesão nefrotóxica (Hammerman *et al.*, 2000), contribuindo para a atenuação dos sintomas e evitando o agravamento e progressão para DRC (Robert *et al.*, 2004; Chertow *et al.*, 2005).

No presente estudo foi observado que os animais que receberam GM apresentaram, ao final do experimento, uma perda de peso corporal. Resultado semelhante foi relatado por Sodimbaku (2016), ou seja, a GM induziu uma perda de peso em relação aos animais controle. Essa alteração de peso pode estar associada a um quadro de desidratação, uma vez que ela foi acompanhada por um balanço hídrico negativo e um aumento na eliminação de urina sendo esses achados comumente induzidos pela GM (Feyissa *et al.*, 2013). Interessantemente, os animais tratados com DIZE (Terapêutico e Preventivo) apresentaram uma leve tendência de ganho de peso em relação aos animais GM/SAL.

Como observado por Ali e colaboradores (2009), nosso trabalho também demonstrou que após a administração da GM há um aumento significativo no peso dos rins (direito e esquerdo) em relação aos controles. Essa ação nefrotóxica da GM remete-se possivelmente a um edema causado no órgão associado a um processo inflamatório local (Papanikolaou *et al.*, 1992). O DIZE, por si só, não foi capaz de atenuar esse efeito nos grupos Terapêutico e Preventivo, podendo tal ação ser devido ao modelo patológico agudo, dose ou tempo de exposição usado em nosso trabalho.

Ao avaliar o volume urinário, verificou-se uma elevação significativa do 5° ao 15° dia de experimento em todos os grupos que receberam GM em relação aos controles. Por sua vez, o DIZE não exerceu nenhum efeito atenuante ou redutor no tratamento preventivo ou terapêutico em relação ao grupo CONT/SAL. Achados similares foram obtidos por Velkoska *et al.* (2015), que mostraram que o DIZE, após ser administrado por 2 semanas (15 mg/kg) em ratos Sprague Dawley em um modelo de DRC, *não reduziu a produção de*

urina em relação aos animais não tratados. O quadro de poliúria é bastante característico da NTA em decorrência do uso de GM (Destache *et al.*, 2014), podendo ser explicado por uma alteração na formação de AMP cíclico, havendo uma redução na movimentação das aquaporinas para a membrana apical das células renais e contribuindo para a diminuição da reabsorção de água no ducto coletor com aumento na excreção de água (Lee *et al.*, 2001; Ksiazek *et al.*, 2002).

Nesse estudo, não observamos alterações significativas na ingesta hídrica dos animais de todos os grupos avaliados (5 e 15 dias). Esse parâmetro é variável, pois depende do grau de hidratação do animal (Oliveira *et al.*, 2016). No entanto, o balanço hídrico, que é a razão entre o FU e o volume de água ingerido, se mostrou significativamente elevado nos grupos GM/SAL e Terapêutico em relação ao grupo salina e no grupo Preventivo e demais grupos que receberam GM, logo após a indução de LRA e ao final do experimento, respectivamente. Esse aumento no balanço hídrico pode ter sido consequência de alterações no equilíbrio hidroeletrólítico, já que houve também um aumento do FU.

Desse modo, modelos experimentais de LRA podem ser utilizados a fim de identificar possíveis estratégias terapêuticas (Singh *et al.*, 2012). Em nosso estudo, a presença da LRA foi confirmada através da dosagem da creatinina plasmática, um biomarcador de função renal empregado clinicamente devido à estabilidade em sua formação e excreção (Abdelsameea *et al.*, 2016). Quando mensuramos esse biomarcador no plasma dos animais que receberam GM, observamos um aumento em sua concentração, sendo notória ao final da indução da lesão renal e permanecendo elevada até o final do experimento em relação aos animais do grupo CONT/SAL. Em consonância com nossos resultados, muitos outros estudos têm relatado o mesmo aumento em animais que desenvolveram um quadro de NTA induzida por GM (Lopez-Novoa *et al.*, 2010; Abdel-Raheem *et al.*, 2009). Contudo, apesar dos animais saudáveis que receberam o DIZE não terem apresentado nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de creatinina, nos animais que foram tratados com o DIZE de forma preventiva os efeitos adversos da GM na redução dos níveis de creatinina logo após a indução e ao final do tratamento foram atenuados. Esse resultado corrobora com Malek e colaboradores (2014), que demonstraram

uma redução na concentração dessa molécula em animais que receberam um pré-tratamento (15 mg/kg) por três dias com DIZE antes da indução do modelo de LRA por isquemia/reperfusão renal. O mesmo não foi observado em nosso trabalho, nos animais tratados terapeuticamente, que mantiveram valores similares aos dos animais doentes não tratados com DIZE. Em conformidade, os resultados de Velkoska e colaboradores (2015) mostraram que animais com doença renal secundária e nefrectomia parcial tratados com DIZE (15 mg/kg) por duas semanas não demonstraram nenhuma melhora em relação aos animais controle.

Em paralelo ao aumento da creatinina plasmática, foi constatada uma redução no RFG logo após a indução da LRA e também ao término do protocolo experimental. Essa modificação causada pela GM se deve a contração e a proliferação das células mesangiais do corpúsculo renal, células que dão suporte estrutural ao glomérulo (Martínez-Salgado *et al.*, 2007). Esse efeito causado pela GM não foi observado nos animais que receberam o DIZE preventivo, sendo, portanto, capaz de preservar esse parâmetro de função renal. O RFG é o melhor método disponível para estimar a presença de lesão glomerular difusa de grau leve a moderado com subsequente acúmulo de compostos nitrogenados (Moran *et al.*, 1992). Acreditamos que o tratamento com o DIZE possivelmente ativou a ECA2, que juntamente com a Ang-(1-7), estão associados ao eixo vasodilatador do SRA que contrapõe às ações do eixo ECA/Ang II/AT1. É sabido que um aumento nos níveis renais da enzima ECA e dos receptores AT1 são capazes de ativar o eixo vasoconstritor desse sistema. A Ang II, por exercer esse efeito vasoconstritor, pode diminuir o RFG (Hishida *et al.*, 1994). Em um experimento realizado por Van der Wouden *et al.* (2006) onde eles avaliaram *in vitro* e *in vivo* os efeitos da Ang-(1-7) na vasculatura renal de ratos, foi concluído que a Ang-(1-7) por si só não afeta a função vascular, mas impede que a Ang II induza a vasoconstrição das artérias renais. Esses dados podem ser sustentados quando inibidores de ECA são usados, inativando a via principal de formação da Ang II, com consequente melhora na filtração glomerular de ratos com LRA (Yamada *et al.*, 1992). Em contrapartida, não observamos uma recuperação nos animais tratados terapeuticamente com DIZE em relação aos animais CONT/SAL.

Um aumento na FEH₂O já era esperado, pois observamos um aumento no FU concomitantemente a uma redução do RFG nos animais que receberam GM logo após o fim do período de indução da LRA, persistindo até o fim do experimento. O aumento desse parâmetro se justifica por ser uma variável diretamente proporcional ao FU e inversamente proporcional ao *clearance* de creatinina. Por outro lado, o grupo Preventivo demonstrou uma redução significativa em relação aos demais grupos (GM/SAL e Terapêutico). Além disso, em consequência das alterações na FEH₂O houve uma redução notória na osmolalidade urinária nos grupos GM/SAL, Terapêutico e Preventivo (5^o dia), permanecendo ao final do 15^o dia, com exceção do grupo Terapêutico, que demonstrou uma melhora compatível ao grupo CONT/SAL. É descrito na literatura que animais tratados com GM apresentam uma redução na osmolalidade urinária, não ocorrendo o mesmo com a osmolalidade plasmática, cuja alteração não é característica da NTA causada pela GM (Lee *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2007). De acordo com relatos de Joyner *et al.* (2008), ratas que receberam um tratamento com Ang-(1-7) apresentaram um aumento na osmolalidade urinária e uma redução no fluxo urinário, podendo assim, justificar a atenuação na FEH₂O e na osmolalidade urinária nos animais com LRA tratados com DIZE observadas em nosso trabalho.

A excreção urinária de proteínas ou proteinúria é um reflexo da alteração na integridade da estrutura glomerular e tubular indicando a progressão da lesão renal e é usada também para comprovar a eficácia de determinados tratamentos (Gowda *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, houve uma acentuada NTA nos animais de todos os grupos administrados com GM, evidenciando pelo aumento da proteinúria logo após a indução da LRA. Nos animais tratados preventivamente com o DIZE, houve uma tendência de atenuação da proteinúria. Ao final do experimento, uma redução estatística na excreção urinária de proteínas foi demonstrada nos animais tratados com DIZE, preventivamente ou terapeuticamente em relação ao grupo GM/SAL. Esses dados indicam que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas desempenha um papel fundamental na função renal, como já relatado por Jorge e colaboradores (2011). Esses autores mostraram que ratos espontaneamente hipertensos tratados com Ang-(1-7) reduziram significativamente os níveis de proteinúria e apresentaram uma melhoria na depuração da creatinina. Presume-se, assim,

que a ação do DIZE como ativador da ECA2 possa estar envolvida na melhora dos animais com LRA.

Verificamos que a administração da GM aumentou significativamente o Cosm do grupo Terapêutico ao final do período da indução da LRA em relação ao grupo CONT/SAL, não permanecendo ao final do tratamento com o DIZE. Além disso, esse aumento não foi observado no grupo Preventivo, existindo, assim, um efeito protetor do DIZE na reabsorção de água nos ductos coletores. Contudo, em relação ao grupo GM/SAL, após a indução da LRA, foi observada apenas uma tendência de aumento desse parâmetro quando comparado ao grupo CONT/SAL, havendo ao final do experimento uma elevação expressiva.

Em relação ao CH_2O , a GM, por si só, tornou-o menos negativo. Essa alteração apesar de demonstrar uma tendência, não se manteve ao final do experimento, sugerindo uma correta reabsorção de água pelos segmentos distais do néfron. A elevação da excreção de CH_2O é uma consequência do aumento da excreção urinária causada pela GM em virtude da NTA.

Entre os biomarcadores de função renal usados na atualidade, a NGAL vem sendo empregada por determinar precocemente a LRA, sendo uma ferramenta útil no diagnóstico de lesões e recuperação renal. As células tubulares renais são capazes de produzir e liberar NGAL diante de uma alteração no tecido renal. Um aumento drástico urinário e plasmático pode ocorrer em até duas horas após as primeiras alterações renais causadas pela LRA (Bolignano *et al.*, 2008; Kuwabara *et al.*, 2009). Em contraste, um aumento na concentração plasmática de creatinina só ocorre em 1 a 3 dias após a lesão renal (Bennett *et al.*, 2008). Nosso trabalho evidenciou um aumento de NGAL urinário em animais com LRA, sendo que o DIZE não apresentou nenhum efeito protetor nos animais tratados preventivamente ou terapêuticamente. Recentemente, Luo e colaboradores (2016) mostraram em ratos tratados com GM por 1, 3 ou 7 dias um aumento renal expressivo da NGAL. Pressupomos que esse aumento urinário persistiu nos animais tratados com DIZE devido à persistência da lesão tecidual, principalmente dos túbulos proximais, já que é sabido que uma regulação de NGAL ocorre após a recuperação tecidual à lesão renal (Supavekin *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2003).

Deve ser enfatizado que a fisiopatologia da maioria das doenças renais, seja aguda ou crônica, está associada a um processo inflamatório no tecido

renal. Vários sistemas estão envolvidos na modulação do processo inflamatório nesse tecido, sendo que o SRA parece ter uma ação central nessa função (Benigni *et al.*, 2010). Acredita-se que o SRA possa modular o processo inflamatório e que a Ang II aja na regulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas renais (Ferrario *et al.*, 2011). A LRA desencadeia uma cascata inflamatória que desempenhará um papel fundamental na fisiopatologia da doença (Stroo *et al.*, 2010). A resposta inflamatória está relacionada ao aumento dos níveis do fator de crescimento tumoral β (TGF- β), endotelina, Ang II, ativação de células residentes e um aumento na produção de citocinas (Klahr *et al.*, 2000; Geleilate *et al.*, 2002; Bledsoe *et al.*, 2006).

Na doença renal progressiva, incluindo a nefropatia induzida pela GM, a inflamação renal, caracterizada pela infiltração de células como monócitos/macrófagos, vem sendo associada ao processo de evolução dessas doenças (Schlondorff *et al.*, 2008). Com isso, o controle das respostas inflamatórias emerge como um alvo terapêutico para a LRA. Estudos relatam que o DIZE exerce propriedades antiinflamatórias. Tal ação foi verificada por Zheng e colaboradores (2015) que observaram uma redução significativa no quadro inflamatório de ratos com uveíte tratados com DIZE. O tratamento com o ativador de ECA2 também foi capaz de atenuar o processo inflamatório nas veias respiratórias em ratos asmáticos (Dhawale *et al.*, 2016) e de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF e IFN- γ) em um processo infeccioso causado por *Trypanosoma congolense* (Kuriakose *et al.*, 2012).

Inúmeros estudos apontam um papel crucial para o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas inibindo os efeitos inflamatórios em várias patologias (Regenhardt *et al.*, 2013). Esse conceito está de acordo com nossos achados, nos quais os animais com LRA apresentaram um aumento nos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β e os níveis de IL-10 permaneceram basais, sendo que nos animais que receberam o DIZE preventivamente esse aumento foi parcialmente abolido e um aumento na concentração da citocina IL-10 foi observado. Cabe ressaltar que nos animais com LRA tratados terapêuticamente com DIZE a única melhora observada foi nos níveis de TNF- α .

Outro parâmetro inflamatório avaliado foi a atividade de MPO que se mostrou elevada nos animais com LRA, assim como foi demonstrado por

Grone *et al.* (2002) que observaram um aumento dessa enzima em tecidos renais com lesão aguda. No entanto, nos animais que receberam o DIZE como ação preventiva aos efeitos da GM, esse quadro foi abolido significativamente, não ocorrendo o mesmo com os animais tratados terapeuticamente quando comparado com o grupo CONT/SAL. Entretanto, em relação ao GM/SAL uma redução significativa foi observada. A avaliação histopatológica, no presente estudo, constatou que na contabilização dos núcleos de células monucleadas que compõem o infiltrado inflamatório tecidual, o DIZE promoveu uma redução no número dessas células nos grupos Preventivo e Terapêutico em relação ao grupo GM/SAL. Esses achados são de extrema relevância, pois demonstram que o DIZE foi capaz de modular o processo inflamatório no grupo Preventivo e de atenuar esse quadro no grupo Terapêutico. Corroborando tais resultados, quando ocorre a deleção do gene ECA2 em camudongos com LRA, há um aumento significativo na inflamação celular, expressão de citocinas pró-inflamatórias, apoptose e estresse oxidativo, demonstrando um efeito protetor da ECA2 (Fang *et al.*, 2003). Sendo assim, o controle das respostas inflamatórias emerge como alvo terapêutico para cessar a LRA.

Nos rins, a enzima NAG é encontrada predominantemente nos túbulos proximais e devido ao seu alto peso molecular não é livremente filtrada, de modo que um aumento em sua atividade pode indicar um quadro de lesão tubular (Bazzi *et al.*, 2002; Vaidya *et al.*, 2008). Uma alta atividade urinária de NAG pode evidenciar a presença de doença renal ou dano tóxico (Sirota *et al.*, 2011), como evidenciado em nosso trabalho nos animais que receberam a GM. Porém, a ativação da ECA2 foi capaz de diminuir preventivamente a atividade renal de NAG nos animais com LRA, sugerindo que o DIZE foi capaz de regular a atividade dessa enzima diante da lesão renal.

Dentre as ações desempenhadas pelo SRA renal, destaca-se sua participação na progressão ou melhora da lesão renal, basicamente pelo balanço entre os dois eixos principais que compõem esse sistema (Otte *et al.*, 2009). Por conseguinte, a avaliação e identificação dos componentes do SRA são de extrema importância, sobretudo em condições patológicas ou após uma intervenção terapêutica (Mark *et al.*, 1998) e na possível aplicabilidade desses componentes como biomarcadores (Efrati *et al.*, 2012). A ECA, por exemplo, tem importante papel no SRA por atuar na conversão da Ang I em sua forma

ativa vasoconstritora, a Ang II (Wong *et al.*, 2015). Nesse aspecto, quando avaliamos nossos dados, nenhuma alteração na concentração urinária da enzima ECA foi observada no 5º dia após a administração da GM em nenhum grupo avaliado. Diferentemente, ao final do 15º dia houve uma redução dessa enzima nos grupos GM/SAL, Preventivo e Terapêutico em relação aos grupos CONT/SAL e CONT/DIZE. Tais alterações refletiram diretamente nos resultados de Ang II obtidos, onde não foi observada nenhuma alteração nos grupos propostos imediatamente após a indução da LRA, mas ao final do experimento uma redução urinária foi observada nos grupos que receberam GM em relação aos grupos controle. Esses resultados podem ser explicados por um possível aumento do peptídeo Ang II somente evidenciado com o progresso da LRA. É bem descrito na literatura que a Ang II desempenha um papel importante na progressão da lesão renal (Funk, 2001). Um aumento de Ang II no tecido renal poderia justificar alterações no RFG, proteinúria e no quadro inflamatório de animais com NTA. A redução de excreção urinária de Ang II tem sido relatada em pacientes hipertensos (Fukuchi *et al.*, 1974).

Em 2015 foi relatado pela primeira vez por Velkoska e colaboradores que ratos tratados por 2 semanas com DIZE (15 mg/kg/dia) antes da indução de DRC apresentam um aumento da atividade da ECA2 urinária associada a uma redução da mesma no córtex renal dos animais doentes. Ainda assim, eles não constataram nenhum efeito benéfico do DIZE na pressão arterial e função renal desses animais. Observação oposta foi vista em nossos resultados, onde nenhuma alteração nos níveis urinários da ECA2 em todos os tempos analisados foi descrita. Entretanto, presumimos que possa ter havido um aumento tecidual dessa enzima com consequente aumento urinário do peptídeo Ang-(1-7) no grupo Preventivo posteriormente à implantação da LRA. Ao final do protocolo proposto, um aumento também foi demonstrado no grupo Terapêutico em relação ao grupo GM/SAL. Ferrario e colaboradores (2005) descreveram um aumento da atividade da ECA2 no tecido renal de ratos que receberam um inibidor de ECA, com aumento dos níveis urinários e teciduais de Ang-(1-7). Por fim, o aumento urinário da Ang-(1-7) nos grupos Preventivo (5 dias) e Terapêutico (15 dias), juntamente com os dados da literatura, sustentam a hipótese de que a ativação da ECA2 desencadeia efeitos renoprotetores. Entretanto, uma limitação que deve ser pontuada é de que,

além dos níveis urinários dos componentes do SRA, as suas concentrações renais também devem ser avaliadas, uma vez que nem sempre existe uma correlação positiva entre esses dois ambientes no que diz respeito às concentrações de membros do SRA.

Em conjunto, os dados desse estudo mostram que a GM induz lesão renal aguda, pois altera a maioria dos parâmetros renais avaliados. Além disso, o DIZE nas condições utilizadas de dose e tempo de tratamento foi capaz de modificar a maior parte dessas alterações.

VII. CONCLUSÕES

O DIZE melhorou os parâmetros de função renal dos animais com LRA. Esses efeitos foram mais evidentes quando o composto foi administrado de maneira preventiva, modulando o perfil inflamatório dos animais, o que não foi observado de maneira clara nos animais do grupo Terapêutico. A administração do DIZE alterou os níveis urinários de componentes do SRA nos dois protocolos avaliados. Assim, de uma maneira geral, esses resultados sugerem que a ativação da ECA2 é uma possível estratégia terapêutica para prevenir, bem como para tratar, a LRA.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA, Mohamed GA. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32(1): 61-7.
- Abdelsameea AA, Mohamed AM, Amer MG, Attia SM. Cilostazol attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2016; 68(4): 247-53.
- Alarifi S, Al-Doaiss A, Alkahtani S, et al. Blood chemical changes and renal histological alterations induced by gentamicin in rats. *Saudi J Biol Sci.* 2012; 19: 103-110.
- Ali BH, Al Za'abi M, Blunden G, Nemmar A. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 109(4): 225-32.
- Ali BH, Al-Salam S, Al-Husseini I, Nemmar A. Comparative protective effect of N-acetyl cysteine and tetramethylpyrazine in rats with gentamicin nephrotoxicity. *J Appl Toxicol.* 2009; 29(4): 302-7
- Ali MN, Lewington AJ. Invited manuscript poster on renal-related education American Society of Nephrology. Do medical trainees receive adequate training in the management of acute kidney injury? *Ren Fail.* 2011; 33(7): 669-71.
- Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: S30-S39.
- Ávila MO, Zanetta DM, Yu ALF, Abdulkader ECR, Yu L, Burdmann EA. Is diuresis (D) important in AFR mortality? How much is enough? *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8: 122.
- Ávila MO, Rocha PN, Zanetta DM, Yu L, Burdmann ED. Water balance, acute kidney injury and mortality of intensive care unit patient. *J Bras Nefrol.* 2014; 36(3): 379-388.
- Bae EH, Kim IJ, Joo SY, Kim EY, Choi JS, Kim CS, Ma SK, Lee J, Kim SW. Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014; 15(4): 348-61.
- Bae EH, Oh YW, Park JW, Ma SK, Choi KC, Lee J, Kim SH, Kim SW. Gentamicin decreases guanylyl cyclase activity in rat glomerulus. *Kidney Blood Press Res.* 2007; 30(2): 81-7.
- Bailey PJ. Sponge implants as models. *Methods Enzymol.* 1988; 162:327-34.
- Balakumar P, Rohilla A, Thangathirupathi A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res.* 2010; 62(3): 179-86.
- Barros ML, Varanda WA, Lachat JJ, Alves CG, Coimbra TM. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25(4): 409-17.
- Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Napodano P, Paparella M. Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17:1890-6.
- Benndorf RA, Krebs C, Hirsch-Hoffmann B, Schwedhelm E, Cieslar G, Schmidt-Haupt R, Steinmetz OM, Meyer-Schwesinger C, Thaiss F, Haddad M, Fehr S, Heilmann A,

Helmchen U, Hein L, Ehmke H, Stahl RA, Böger RH, Wenzel UO. Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice. *Kidney Int.* 2009; 75(10): 1039-49.

Bell S, Davey P, Nathwani D, Marwick C, Vadiveloo T, Sneddon J, Patton A, Bennie M, Fleming S, Donnan PT: Risk of AKI with gentamicin as surgical prophylaxis. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25: 2625-2632.

Benigni A, Cassis P, Remuzzi. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med.* 2010; 2(7): 247-57.

Bennett M, Dent CL, Ma Q, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: A prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 665-673.

Bennett WM, Mela-Riker LM, Houghton DC, Gilbert DN, Buss WC. Microsomal protein synthesis inhibition: an early manifestation of gentamicin nephrotoxicity. *Am J Physiol.* 1988; 255: F265-9.

Bledsoe G, Crickman S, Mao J, Xia CF, Murakami H, Chao L, Chao J. Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(3): 624-33.

Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis.* 2008; 52: 595-605.

Bolisetty S, Zarjou Um, Zarjou Um, Agarwal A. Heme Oxygenase 1 as a therapeutic target in acute kidney injury. *Am J Kidney Dis.* 2017; 27: S0272-6386(16)30700-4

Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 2600-2610.

Braun M E, Page IH. Suggested revision of nomenclature--Angiotensin. *Science.* 1958; 127(3292): 242.

Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med.* 2004; 116: 263-272.

Caliari MV. Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte: UFMG, 1997

Cao W, Jin L, Zhou Z, Yang M, Wu C, Wu L, Cui S. Overexpression of intrarenal renin-angiotensin system in human acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res.* 2016; 41:746-756.

Cerda J, Bagga A, Kehr V, Chakravarthi RM. The contrasting characteristics of acute kidney injury in developed and developing countries. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2008; 4 (3): 138-53.

Chappell MC, Modrall JG, Diz DI, Ferrario CM. Novel aspects of the renal rennin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol.* 2004; 143: 77-89.

Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality length of stay and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16: 3365-3370.

Choudhury. Acute kidney injury: current perspectives. *D.Postgrad Med.* 2010; 122(6): 29-40.

Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J. Renin–angiotensin–aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ.* 2007; 293: 2009-2023.

Coutinho DC, Foureaux G, Rodrigues KD, Salles RL, Moraes PL, Murça TM, De Maria ML, Gomes ER, Santos RA, Guatimosim S, Ferreira AJ. Cardiovascular effects of angiotensin A: a novel peptide of the renin-angiotensin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014; 15(4): 480-6.

Cross AS, Sakarya S, Rifat S, Held TK, Drysdale BE, Grange PA, Cassels FJ, Wang LX, Farese A, Casey D, Powell J, Bhattacharjee AK, Kleinberg M, Goldblum SE. Recruitment of murine neutrophils *in vivo* through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem.* 2003; 278(6): 4112-20.

Crowley SD, Rudemiller NP. Immunologic effects of the Renin-Angiotensin System. *J Am Soc Nephrol.* 2017; pii: ASN.2016101066.

De Barros ML, Varanda WA, Lachat JJ, Alves DS, Coimbra TM. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25 (4): 409-17.

Destache CJ. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity-a focus on on monitoring: a review of literature. *J Pharm Pract.* 2014; 27: 562-566.

Dhawale VS, Amara VR, Karpe PA, Malek V, Patel D, Tikoo K. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attenuates allergic airway inflammation in rat asthma model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016; 306: 17-26.

Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *Scientific World Journal.* 2009; 9, 522-535.

Ding X, Cheng Z, Qian Q. Intravenous fluids and acute kidney injury. *Blood Purif.* 2017; 43 (1-3): 163-172.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87: E1-9.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; (9): 87(5): E1-9.

Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, Pratt RE. A Comparative Study of the Distributions of Renin and Angiotensinogen Messenger Ribonucleic Acids in Rat and Mouse Tissues. *Endocrinology.* 1987; 120(6): 2334-2338. Eftekhari P. Evaluation of acute kidney injury in the hospital setting. *Prim Care.* 2014; 41, 779-802.

- Efrati S, Berman S, Hamad RA, Siman-Tov Y, Ilgiyaev E, Maslyakov I, Weissgarten J. Effect of captopril treatment on recuperation from ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27(1): 136-45.
- El-Kashef DH, El-Kenawi AE, Suddek GM, Salem HA. Flavocoxid attenuates -induced nephrotoxicity in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015; 388 (12): 1305-15.
- Esteban V, Heringer WS, Sterner KA, Bruin R, Engel S, Wang Y, Mezzano S, Egido J, Schultheiss HP, Ruiz-Ortega M, Walther T. Angiotensin-(1-7) and the G protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation. *PLoS One*; 2009; 4:5406.
- Fähling M, Seeliger E, Patzak A, Persson PB. Understanding and preventing contrast-induced acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2017.
- Fang F, Liu GC, Zhou X. Loss of ACE2 exacerbates murine renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS ONE*. 2013; 8 (8): 71433.
- Félix L, Oliveira MM, Videira R, Maciel E, Alves ND, Nunes FM, Alves A, Almeida JM. Carvedilol exacerbate gentamicin-induced kidney mitochondrial alterations in adult rat. *Exp Toxicol Pathol*. 2017; 69(2): 83-92.
- Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, Smith RD, Chappell MC. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int*. 2005; 68(5): 2189-96.
- Ferrario CM. New physiological system from the investigation of precursors and products of Angiotensin I metabolism. *Hypertension*. 2006; 55: 445-52.
- Ferreira AJ, Moraes PL, Foureaux G, Andrade AB. et al. The angiotensin-(1-7) /Mas receptor axis is expressed in sinoatrial node cells of rats. *J Histochem Cytochem*. 2011; 59 (8):761-8.
- Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005; 38 (4): 499-507.
- Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RAS, Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol*. 2011; 96 (3): 287-294.
- Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, Castellano RK, Ostrov DA, Oh SP, Katovich MJ, Raizada MK. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179 (11): 1048-54.
- Ferreira AJ, Santos RAS, Bradford CN. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the RAS in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2010; 55(2): 207-213.
- Feyissa T, Asres K, Engidawork E. Renoprotective effects of the crude extract and solvent fractions of the leaves of *Eucleadivorum Hierns* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol*. 2013; 145(3): 758-66.
- Foureaux G, Nogueira JC, Nogueira BS, Fulgêncio GO, Menezes GB, Fernandes SO, Cardoso VN, Fernandes RS, Oliveira GP, Franca JR, Faraco AA, Raizada MK, Ferreira

- AJ. Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(6): 4296-306.
- Fukuchi S. Estimation of urinary angiotensin II by radioimmunoassay. *J Exp Med.* 1974; 114: 205-213.
- Funk JL: A role for parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1: 1101-1121.
- Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Me.* 2008; 36: 264-224.
- Gallagher M. Long-term survival and dialysis dependency following acute kidney injury in intensive care: extended follow-up of a randomized controlled trial. *Plos Medicine.* 2014; 11, e1001601.
- Geleilate TJ, Melo GC, Costa RS, Volpini RA, Soares TJ, Coimbra TM. Role of myofibroblasts, macrophages, transforming growth factor-beta endothelin, angiotensin-II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *J Nephrol.* 2002; 15(6): 633-42.
- Giuliano RA, Verpooten GA, De Broe ME. The effect of dosing strategy on kidney cortical accumulation of aminoglycosides in rats. *Am J Kidney Dis.* 1986; 8(5): 297-303.
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *The Journal of Experimental Medicine* 1934; 59 (3): 347-379.
- Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AAK, Vernekar SN. *N Am J Med Sci.* 2010; 2(4): 170-173.
- Grone HJ, Grone E, Malle E. Immuno histochemical detection of hypochlorite-modified proteins in glomeruliof human membranous glomerulonephritis. *Lab Invest.* 2002; 82(1): 5-14.
- Guang RD, Phillips BJ, Milani. Three keyproteases—angiotensin-I-converting enzyme (ACE),ACE2 and reni—withinand beyond the renin-angiotensin system.*Arch. Cardiovasc Dis.* 2012; 105: 373-385.
- Gupta A, Rhodes GJ, Berg DT et al. Activated protein C amelio- rates LPS-induced acute kidney injury and down regulates renal INOS and angiotensin 2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293: 245-254.
- Haber PK, Ye M, Wysocki J, Maier C, Haque SK, Batlle D. ACE2-Independent action of presumed ACE2 activators: studies in vivo, ex vivo and In vitro. *Hypertension.* 2014; 63 (4): 774-782.
- Hallberg M, Sävmarker J, Hallberg A. Angiotensin peptides as AT2 receptor agonists. *Curr Protein Pept Sci.* 2017; Feb 3.
- Hammerman MR, Safirstein R, Harris RC, Toback FG, Humes HD. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol.* 1998; 274: 236-44.

Herichová I. Angiotensin II in the Human physiology: novel ways for synthetic compounds utilization. *Curr Med Chem*. 2016; 23(42): 4735-4752.

Hering D, Winklewski PJ. R1 autonomic nervous system in acute kidney injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017; 44(2): 162-171

Hernández-Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, Castellano RK, Lampkins AJ, Gubala V, Ostrov DA, Raizada MK. Structure-Based Identification of Small-Molecule Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activators as Novel Antihypertensive Agents. *Hypertension*. 2008; 51, 1312-1317.

Hishida A, Nakajima T, Yamada M, Kato A, Honda N. Roles of hemodynamic and tubular factors in gentamicin-mediated nephropathy. *Renal Fail*. 1994; 16:109-116.

Hochst MM, Basic diazoaminobenzene compounds. 1954; US2673197; 1954.

Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, Ferrario CM, Raizada MK. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol*. 2005; 90 (5): 783-90.

Inagami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: S2-S7.

Jankowski V, Vanholder R, Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J. Mass-Spectrometric identification of a novel Angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(2): 297-302.

Jöhren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovascular Research*. 2004; 62: 460-467.

Jorge FG, Marina CM, Romina AP, Gabriel C, Jorge ET, Daniel T, Fernando PD. Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300(1): F272-82.

Joyner J, Neves LA, Stovall K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) serves as an aquaretic by increasing water intake and diuresis in association with downregulation of aquaporin-1 during pregnancy in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 294(3): R1073-80.

Juan SH, Chen CH, Hsu YH, Hou CC, Chen TH, Lin H, Chu YL, Sue YM. Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22 (3): 732-9.

Junya N, Hiroaki T, Naoki N, Teruo M, Mikiyoshi T. Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 281(2): F337-44.

Kalayarasan S, Prabhu PN, Sriram N, Manikandan R, Arumugam M, Sudhandiran G. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 606 (1-3): 162-71.

Kaloyanides GJ, Ramsammy LS. Possible role of altered polyamine metabolism in gentamicin toxicity in OK cells. *Contrib Nephrol*. 1993; 101: 199-205.

Karnik SS, Unal H, Kemp JR. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacol Rev.* 2015; 67(4): 754-819.

Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signaling and function. *Blood Press.* 2003; 12 (2): 70-88.

Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: form angiotensin I to angiotensin-(1-7). *Cardiovascular Research.* 2007; 73, 463-469.

Kellum JA, Bellomo R, Ronco C, Mehta R, Clark W, Levin NW: The 3rd international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI). *Int J Artif Organs.* 2005; 28: 441-444.

Kitayama H, Maeshima Y, Takazawa Y, Yamamoto Y, Wu Y, Ichinose K, Hirokoshi K, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H. Regulation of angiogenic factors in angiotensin II infusion model in association with tubulointerstitial injuries. *Am J Hypertens.* 2006; 19: 718-727.

Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney Int Suppl.* 2000; 75:S7-14.

KsiazekK, Witowski J. Aquaporin water channels in water balance regulation in the kidney. *Przeegl Lek.* 2002; 59 (12): 1013-7.

Kulemina LV, Ostrov DA. Prediction of off-target effects on angiotensin-converting enzyme 2. *J Biomol Screen.* 2011; 16: 878-885.

Kuriakose S, Muleme HM, Onyilagha C, Singh R, Jia P, Uzonna JE. Diminazene Aceturate (Berenil) modulates the host cellular and inflammatory responses to *Trypanosoma congolense* infection. Rottenberg ME. *PLoS ONE.* 2012; 7(11).

Kusserow H,Unger T.Vasoactive peptides, their receptors and drug development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2004; 94: 512.

Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int.* 2009; 75(3): 285-94.

Lameire NH, Bagga A, Cruz D, De Maeseneer J, Endre Z, Kellum JA, Liu KD, Mehta RL, Pannu N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet.* 2013; 382: 170-179.

Lameire NH. Contrast-induced nephropathy prevention and risk reduction. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(6): i11-23.

Laura CO, Cibebe BZ, Edson AP, Fernanda TB. Determination of elements in kidney, serum and urine of Wistar rats with Acute Renal Insufficiency using NAA. *J Radioanal Nucl Chem.* 2012; 291: 395-398.

Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva NC, Verano-Braga T, Costa-Fraga F. Discovery and characterization of Alamandine, a novel component of the Renin-Angiotensin System. *Circ Res.* 2013; 112(8): 1104-11.

Lee IC, Kim SH, Lee SM, Baek HS, Moon C, Kim SH, Park SC, Kim HC, Kim JC. Melatonin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Arch Toxicol*. 2012; 86 (10): 1527-36.

Lee JU, Yoo KS, Kang DG, Kim SW, Choi KC. Gentamicin decreases the abundance of Aquaporin Channels in rat kidney. *J Pharmacol*. 2001; 85: 391-398.

Lee YJ, Song IK, Jang KJ, Nielsen J, Frøkiaer J, Nielsen S, Kwon TH. Increased AQP2 targeting in primary cultured IMCD cells in response to angiotensin II through AT1 receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292(1): 340-50.

Leehey DJ, Braun BI, Tholl DA, Chung LS, Gross CA, Roback JA. Can pharmacokinetic dosing decrease nephrotoxicity associated with aminoglycoside therapy. *J Am Soc Nephrol*. 1993; 4(1): 81-90.

Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol*. 2007; 580: 31-7.

Lenkei Z, Nuyt AM, Grouselle D, Corvol P, Llorens-Cortès C. Identification of endocrine cell populations expressing the AT1B subtype of angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology*. 1999; 140(1): 472-7.

Li NJ, Cheng K, Wilkins JA, Burns KD. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288(2): 353-62.

Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: Pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15:1-12.

Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int*. 2011; 79(1): 33-45.

Lovelles MO, Kohlhepp SJ, Gilbert DN. The influence of aminoglycoside antibiotics on the in vitro function of rat liver ribosomes. *J Lab Clin Med*. 1984; 103(2): 294-303.

Lubel JS, Herath CB, Velkoska E, Casley DJ, Burrell LM, Angus PW. Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity in fetal calf serum: implications for cell culture research. *Cytotechnology*. 2008; 58(3).

Luo QH, Chen ML, Chen ZL, Huang C, Cheng AC, Fang J, Tang L, Geng Y. Evaluation of KIM-1 and NGAL as early indicators for assessment of gentamycin-induced nephrotoxicity. *Kidney Blood Press Res*. 2016; 41(6): 911-918.

Macedo SM, Guimaraes TA, Andrade JM, Guimaraes AL, Batista de Paula AM, Ferreira AJ, Sousa Santos SH. Angiotensin converting enzyme 2 activator DIZE modulates metabolic profile in mice decreasing lipogenesis, *Protein Pept. Lett*. 2015; 332-340.

Malek M, Nematbakhsh M. The preventive effects of Diminazene Aceturate in renal ischemia/reperfusion injury in male and female rats. *Adv Prev Med*. 2014; 2014: 740647.

- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(7): 367-74.
- Mark CC, Debra ID, Carla Y, Carlos MF. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl.* 1998; 68: S3-6.
- Martínez-Salgado C, López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 223(1): 86-98.
- Michael R, Lattanzio DO, Nelson P, Kopyt DO. Acute kidney injury: new concepts in definition, diagnosis, pathophysiology and treatment. *J Am Osteopath Assoc.* 2009; 109:13-19
- Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(5): 1003-12.
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(10): 2534-43.
- Miura S, Imaizumi S, Saku K. Recent progress in molecular mechanisms of angiotensin II type 1 and 2 receptors. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(17): 2981-7
- Monteiro JL. Revisão: Medidas de Prevenção da insuficiência renal aguda. *J. Bras. Nefrol.* 1997; 19 (2): 189-192.
- Morales AI, Demaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arévalo M, Leverage X, López-Novoa JM, El-Mir MY. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney Int.* 2010; 77(10): 861-9.
- Moran K, Mulhall J, Kelly D, Sheehan S, Dowsett J, Dervan P, Fitzpatrick J M. Morphological changes and alterations in regional intrarenal blood flow induced by graded renal ischemia. *J of Urol.* 1992; 148(2 1): 463-466.
- Mrozikiewicz-Rakowska B, Maroszek P, Nehring P. Genetic and environmental predictors of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and diabetic foot ulcer: a pilot study. *J Physiol Pharmacol.* 2015; 66: 751-761.
- Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods.* 1985; 14(3): 157-67.
- Murça TM, Moraes PL, Capuruço CAB, et al. Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction. *Regulatory peptides.* 2012; 177(1-3): 107-115.
- Nagai J, Takano M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004; 19(3): 159-70.
- Negrette GM, Huerta YS, Medina CON. Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 135314.

- Norbert L, Wim VB, Raymond V. The changing epidemiology of acute renal failure. *Nature Reviews Neph.* 2006; 2: 364-377.
- Oliveira CS, Rodrigues AM, Nogueira GB, Nascimento MA, Punaro GR, Higa EM. Moderate aerobic exercise on the recovery phase of gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Life Sci.* 2016; S0024-3205 (16): 30630-0.
- Oliveira JFP, Silva CA, Barbieri CD, Oliveira GM, Zanetta DM, Burdmann EA. Prevalence and risk factors for aminoglycoside nephrotoxicity in intensive care units. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(7): 2887-91.
- Oliveira JFP, Cipullo J P, Burdmann EA. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Braz J Cardiovasc.* 2006; 21(4): 444-452.
- Ortega M, Walther T. Angiotensin-(1-7) and the G protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation. *PLoS One.* 2009; 4:5406.
- Otunctemur A, Ozbek E, Cekmen M. Protective effect of montelukast which is cysteinyl-leukotriene receptor antagonist on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Ren Fail.* 2013; 35: 403-410
- Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (Angiotonin) resulting from the reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med.* 1940; 71 (1): 29-42.
- Papanikolaou N, Peros G, Morphake P, Gkikas G, Maraghianni D, Tsiapas G, Kostopoulos K, Arambatze C, Gkika EL, Bariety J. Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1992; 45(2): 131-6.
- Paquette F, Bernier-Jean A, Brunette V, Ammann H, Lavergne V, Pichette V, Troyanov S, Bouchard J. Acute kidney injury and renal recovery with the use of aminoglycosides: a large retrospective study. *Nephron.* 2015; 131(3): 153-60.
- Perazella, MA. Drug-induced renal failure: update on new medications and unique mechanisms of nephrotoxicity. *Am J Med Sci.* 2003; 325: 349-362.
- Probstfield J L, O'Brien KD. Progression of cardiovascular damage: the role of renin-angiotensin system blockade. *Am J Cardiol.* 2010; 105 (1):10-20.
- Queiroz-Junior CM, Silveira KD, de Oliveira CR, Moura AP, Madeira MF, Soriani FM, Ferreira AJ, Protective effects of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in infection-induced and arthritis-associated alveolar bone loss. *J Periodontal Res.* 2015; 50(6): 814-23.
- Qi Y, Zhang J, Cole-Jeffrey CT, Shenoy V, Espejo A, Hanna M, Song C, Pepine CJ, Katovich MJ, Raizada MK. Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension.* 2013; 62(4): 746-52.
- Quintavalle C, Anselmi CV, De Micco F, Roscigno G, Visconti G, Golia B, Focaccio A, Ricciardelli B, Perna E, Papa L, Donnarumma E, Condorelli G, Briguori C. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and contrast-induced acute kidney injury. *Circ Cardiovasc Interv.* 2015; 8(9): 002673.

- Ramracheya RD, Muller DS, Wu Y. Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans. *Diabetologia*. 2006; 49: 321-31.
- Raveh D, Kopyt M, Hite Y, Rudensky B, Sonnenblick M, Yinnon AM. Risk factors for nephrotoxicity in elderly patients receiving once-daily aminoglycosides. *QJM*. 2002; 95: 291-297.
- Regenhardt RW, Desland F, Mecca AP, Pioquinto DJ, Afzal A, Mocco J, Summers C. Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology*. 2013; 71: 154-63.
- Robert WS, Wei W, Brian P. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*. 2004; 114(1): 5-14.
- Rossaint J, Zarbock A. Acute Kidney Injury – definition, diagnosis and epidemiology. *Minerva Urol Nefr*. 2015; 9-11.
- Ruiz Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006; 15 (2): 159-66.
- Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J. Angiotensin II: the inflammatory and fibrotic a key factor in response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21(1): 16-20.
- Rüster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2985-91.
- Sande MA, Mandell GL. The aminoglycosides. *The Pharm Basis of Therapeutics*. 1985; 1150-1169.
- Santos RAS, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 2008; 93 (5): 519-27.
- Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Pinheiro SVB, Ferreira AJ. The Renin-Angiotensin System: Emerging Concepts. *Curr Hypertens Rev*. 2006; 2 (3): 219-26.
- Santos RAS, Ferreira AJ, Simões e Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 2008; 93 (5): 519-527.
- Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 8258-63.
- Schlondorff DO. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int*. 2008; 74: 860-866.
- Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int*. 1981; 19 (2): 288-96.
- Seegerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11: 152-176.

Selby NM, Shaw S, Woodier N, Fluck RJ, Kolhe NV. Gentamicin-associated acute kidney injury. *QJM*. 2009; 102 (12): 873-80.

Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 187(6): 648-657.

Silan C, Uzun O, Comunoğlu NU, Gokçen S, Bedirhan S, Cengiz M. Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol. *Biol. Pharm. Bull* 2007; 30 (1): 79-83.

Simões e Silva AC, Pinheiro SVB, Pereira RM, Ferreira AJ, Santos RAS. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. *Mini Ver Med Chem*. 2006; 6 (5): 603-9.

Simões e Silva AC. Pathophysiology of arterial hypertension. *Curr Pediatr Rev*. 2006; 2 (3): 209-23.

Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep*. 2012; 64(1): 31-44.

Sirota JC, Klawitter J, Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *J Toxicol*. 2011; 328-120.

Skeggs LT, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The Existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med*. 1954; 99 (3): 275-282.

Sodimbaku V, Pujari L, Mullangi R, Marri S. Carrot (*Daucus carota* L.): Nephroprotective against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Indian J Pharmacol*. 2016; 48(2):122-7.

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*. 2014; 4(3): 1201-1228.

Srinivas NR. Altered disposition of drugs in acute renal failure rat models: drug development strategies and perspectives. *Arzneimittelforschung*. 2010; 60(12): 731-48.

Stroo I, Stokman G, Teske GJ, Raven A, Butter LM, Florquin S. Chemokine expression in renal ischemia/reperfusion injury is most profound during the reparative phase. *Int Immunol*. 2010; 22: 433-42.

Sue YM, Cheng CF, Chang CC, Chou Y, Chen CH, Juan SH. Antioxidation and anti-inflammation by haem oxygenase-1 contribute to protection by tetramethylpyrazine against gentamicin-induced apoptosis in murine renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24 (3): 769-77.

Sun X, Zhang B, Hong X, Zhang X, Kong X. Histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity by increasing prohibitin protein expression in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013; 707(1-3): 147-54.

Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int*. 2003; 63(5): 1714-24.

- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 881-900.
- Teslariu O, Pasca AS, Mititelu-Tartau L, Schiriac CE, Gales C, Saftencu PM, Nechifor M. The protective effects of zinc in experimental gentamicin induced acute renal failure in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2016; 67(5): 751-757.
- Thomas WG, Mendelsohn FAO. Angiotensin receptors: form, function, and distribution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 774-779.
- Tiegerstedt R, Bergman P. Niere und Kreislauf. *Skandinävisches Archiv für Physiologie.* 1898; 223-71.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33238-43.
- Towler P, Staker B, Prasad SG, Menon S, Tang J, Parsons T, Ryan D, Fisher M, Williams D, Dales NA, Patane MA, Pantoliano MW. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem.* 2004; 279 (17): 17996-8007.
- Tulkens PM, Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol Lett.* 1989; 46(1-3): 107-23.
- Urata, H., Healy, B., Stewart, R. W., Bumpus, F. M. and Husain, A. Angiotensin li-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res;* 1990; 66(4): 883-890.
- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48: 463-93.
- Van der Wouden EA, Ochodnický P, Van Dokkum RP, Roks AJ, Deelman LE, de Zeeuw D, Henning RH. The role of angiotensin (1-7) in renal vasculature of the rat. *J Hypertens.* 2006; 24(10): 1971-8.
- Van Kats JP, Danser AH, Sassen LM, Verdouw PD, Schalekamp MA. 1998. Angiotensin Production by the Heart: A Quantitative Study in Pigs with the Use of Radiolabeled Angiotensin Infusions. *Circulation.* 1998; 98(1): 73-81.
- Velkoska E, Patel SK, Griggs K, Pickering RJ, Tikellis C, Burrell LM. Short-Term treatment with Diminazene Aceturate Ameliorates the reduction in kidney ACE2 activity in rats with subtotal nephrectomy. *PLoS ONE.* 2015; 10(3): 0118758.
- Verdonk K, Durik M, Abd-Alla N, Batenburg WW, van den Bogaerdt AJ, van Veghel R, Roks AJ, Danser AH, van Esch JH. Compound 21 induces vasorelaxation via an endothelium-and angiotensin II type 2 receptor-independent mechanism. *Hypertension* 2012; 60(3): 722-9
- Volpini RA, Costa RS, Da Silva CG, Coimbra TM. Inhibition of Nuclear Factor- κ B activation attenuates tubule interstitial nephritis induced by gentamicin. *Nephron Physiol.* 2004; 98 (4): 97-106.
- Waikar SS, Liu KD, Chertow GM. Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 844-861.

Wong, Philip Ching Yat. A hypothesis on the conflicting results of angiotensin converting enzyme inhibitor in the prevention of contrast-induced nephropathy. *Med Hypotheses*. 2015; 85(6): 874-7.

Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines the plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 1998; 496-502.

Xiao F, Burns KD. Measurement of angiotensin converting enzyme 2 activity in biological fluid (ACE2). *Methods Mol Biol*. 2017; 1527: 101-115.

Zhao YX, Yin HQ, Yu QT, Qiao Y, Dai HY, Zhang MX, Zhang L, Liu YF, Wang LC, Liu de S, Deng BP, Zhang YH, Pan CM, Song HD, Qu X, Jiang H, Liu CX, Lu XT, Liu B, Gao F, Dong B. ACE2 over expression ameliorates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of myocardial infarction. *Hum Gene Ther*. 2010; 21(11): 1545-54.

Zheng C, Lei C, Chen Z. Topical administration of diminazene aceturate decreases inflammation in endotoxin-induced uveitis. *Molecular Vision*. 2015; 21: 403-411.

Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, McCluskey RT. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, Gp330 and LRP/α2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem*. 1994; 42: 531-542.