



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCO CLEBER SILVA FERREIRA

**[8]-GINGEROL E METILSULFONILMETANO ATENUAM A LESÃO RENAL
AGUDA INDUZIDA POR VANCOMICINA EM MODELO MURINO**

FORTALEZA-CE

2025

FRANCISCO CLEBER SILVA FERREIRA

[8]-GINGEROL E METILSULFONILMETANO ATENUAM A LESÃO RENAL AGUDA
INDUZIDA POR VANCOMICINA EM MODELO MURINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

FORTALEZA – CE

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F441[Ferreira, Francisco Cleber Silva..

[8]-gingerol e metilsulfonilmetano atenuam a lesão renal aguda induzida por vancomicina em modelo murino / Francisco Cleber Silva. Ferreira. – 2025.

123 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Alexandre Havt Bindá.

1. Lesão renal aguda. 2. Vancomicina. 3. Zingiber officinale. 4. Composto Sulfurado. I. Título.

CDD 615.1

[8]-GINGEROL E METILSULFONILMETANO ATENUAM A LESÃO RENAL AGUDA
INDUZIDA POR VANCOMICINA EM MODELO MURINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 23/08/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. James Almada da Silva
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Advane de Paulo Rodrigues
Instituto Federal do Ceará

RESUMO

A vancomicina (VCM) é um antibiótico glicopeptídico comumente utilizado contra cocos Gram-positivos resistentes à meticilina e a sua utilização tem sido associada a Lesão Renal Aguda (LRA), um evento adverso, com incidência que varia entre 5% e 43% dos pacientes, tornando-se assim, um importante problema clínico. O mecanismo de nefrotoxicidade não está bem elucidado, estudos sugerem que o estresse oxidativo é um dos mecanismos responsáveis pela sua fisiopatogênese, bem como que o uso de antioxidantes poderia prevenir o dano renal. Nessa perspectiva o composto [8]-gingerol (8G), substância bioativa proveniente do gengibre (*Zingiber officinale*), surge com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O composto metilsulfonilmetano (MSM) é um organosulfurado natural que tem sido amplamente utilizado como suplemento dietético, apresentando efeitos protetores contra vários distúrbios através de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Ambos compostos poderiam exercer um efeito renoprotetor. O presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial nefroprotetor dos compostos 8G e MSM na LRA induzida por VCM. Os protocolos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFC sob número de protocolo 9270120318. Foram utilizados camundongos Swiss machos. Primeiramente realizou a caracterização do tempo de indução (3, 5 e 7 dias) da LRA por VCM (400mg/kg/dia i.p.). Em termos de nefrotoxicidade optou-se pelo tempo de 7 dias de indução. Para bloco experimental tratamento com os compostos 8G e MSM, dividiu-se os animais em 5 grupos (n=6-8): controle (CTR), Lesão (VCM) e os grupos tratamentos 8G (VCM+20 mg/kg/dia de 8G) e MSM (VCM+500 mg/kg/dia de MSM e VCM+700 mg/kg/dia de MSM) administrado por via oral (gavagem) na dose 20mg/kg para 8G e as doses 500mg/kg e 750mg/kg para o MSM, administradas duas vezes ao dia pelo mesmo período de tempo escolhido de indução da LRA. Percorrido período experimental de indução de VCM realizou-se a coleta das amostras de urina de 24hs para os ensaios bioquímicos, em seguida os animais foram eutanasiados para coleta de amostras de plasma para dosagem de ureia e creatinina plasmáticas. Os rins coletados, pesados e utilizados para as análises histopatológica, atividade da mieloperoxidase (MPO) e transcrição gênica de mediadores inflamatórios, antioxidante e biomarcadores precoce de lesão renal por reação da polimerase em cadeia tempo real (qPCR). O composto 8G alterou significativamente o peso renal, creatinina e ureia plasmática, proteína e volume urinário, NGAL, TNF α , NFkBp65, IL-1 β , STAT-3, JNK e aumentou a expressão de SOD-1 e SIRT-1 (P<0,05). O MSM na dose 1g/kg/dia atenuou de forma significativa (P<0,05) a creatinina e ureia plasmática, MPO, NGAL, IL-1 β , CXCL-1 e STAT-3. O MSM na dose 1,5g/kg/dia foi o grupo que apresentou os melhores resultados, refletidos nos achados de peso renal, creatinina e ureia sérica, proteína e volume urinário, MPO, KIM-1, NGAL, IL-1 β , TNF α , CXCL-1, NFkBp65 e STAT-3. Foi observado melhora no parâmetro histológico de perda de borda em escova nos tubulos renais para ambos os compostos. Conclui-se que o presente estudo estabeleceu um modelo de LRA induzido por VCM e que os compostos 8G e MSM foram capazes de proteger a disfunção morfofuncional renal desencadeada pela VCM, através de ações anti-inflamatórias e antioxidante, possivelmente pela supressão da atividade de NFkBp65/STAT-3/JNK e o envolvimento de SIRT-1.

Palavras-chave: Lesão renal aguda, Vancomicina, *Zingiber officinale*, Composto Sulfurado.

ABSTRACT

[8]-GINGEROL AND METHYLSULFONYLMETHANE ATTENUATE VANCOMYCIN-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY IN A MURINE MODEL

Vancomycin (VCM) is a glycopeptide antibiotic commonly used against methicillin-resistant Gram-positive cocci and its use has been associated with Acute Kidney Injury (AKI), with an incidence of between 5% and 43% of patients, making it an important clinical problem. The mechanism of nephrotoxicity is not well understood, but studies suggest that oxidative stress is one of the mechanisms responsible for its pathophysiology, and that the use of antioxidants could prevent kidney damage. From this perspective, the compound [8]-gingerol (8G), a bioactive substance from ginger (*Zingiber officinale*), has antioxidant and anti-inflammatory properties. The compound methylsulfonylmethane (MSM) is a natural organosulfur that has been widely used as a dietary supplement, showing protective effects against various disorders through its anti-inflammatory and antioxidant properties, both compounds could exert a renoprotective effect. This study aims to investigate the nephroprotective potential of the compounds 8G and MSM in VCM-induced AKI. The protocols were carried out in accordance with the rules of the National Council for Animal Control and Experimentation (CONCEA) and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA)-UFC under protocol number 9270120318. Male Swiss mice were used. Firstly, the time of induction (3, 5 and 7 days) of AKI by VCM (400mg/kg/day i.p.) was characterized. In terms of nephrotoxicity, an induction time of 7 days was chosen. For the experimental block treatment with the compounds 8G and MSM, the animals were divided into 5 groups (n=6-8): control (CTR), Lesion (VCM) and the treatment groups 8G (VCM+8G) and MSM (M5+VCM and M7+VCM) administered orally (gavage) at a dose of 20mg/kg for 8G and the doses 500mg/kg and 750mg/kg for MSM, administered twice a day for the same period of time chosen for AKI induction. After the experimental period of VCM induction, 24-hour urine samples were collected for biochemical tests, after which the animals were euthanized to collect plasma samples to measure plasma urea and creatinine. The kidneys were collected, weighed and used for histopathological analysis, myeloperoxidase (MPO) activity and gene transcription of inflammatory mediators, antioxidants and early biomarkers of kidney damage by real-time polymerase chain reaction (qPCR). The induction of AKI by VCM significantly altered the parameters of kidney weight, plasma creatinine and urea, urinary protein and volume, MPO, GSH, KIM-1, NGAL, IL-1 β , TNF α , CXCL-1, NF κ Bp65, HO-1, SOD-1, SIRT-1, STAT-3, JNK and histopathological parameters ($P < 0.05$). Compound 8G significantly altered kidney weight, plasma creatinine and urea, urinary protein and volume, NGAL, TNF α , NF κ Bp65, IL-1 β , STAT-3, JNK and increased the expression of SOD-1 and SIRT-1 ($P < 0.05$). MSM at a dose of 1g/kg/day significantly ($P < 0.05$) reduced plasma creatinine and urea, MPO, NGAL, IL-1 β , CXCL-1 and STAT-3. MSM at a dose of 1.5g/kg/day was the group that showed the best results, reflected in the findings of kidney weight, serum creatinine and urea, urinary protein and volume, MPO, KIM-1, NGAL, IL-1 β , TNF α , CXCL-1, NF κ Bp65 and STAT-3. Improvement in the histological parameter of border loss was observed for both compounds. It is concluded that the present study established a model of VCM-induced AKI and that the compounds 8G and MSM were able to protect the renal morphofunctional dysfunction triggered by VCM, through anti-inflammatory and antioxidant actions, possibly through the suppression of NF κ Bp65/STAT-3/JNK activity and the involvement of SIRT-1.

Keywords: Acute kidney injury, Vancomycin, *Zingiber officinale*, Sulfur Compounds.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo Seu cuidado e proteção, por Sua presença constante em minha vida, por me proporcionar diversas graças, mesmo diante das minhas falhas;

Aos meus pais Francisco Gomes Ferreira e Raimunda da Silva Ferreira, meus principais incentivadores, por acreditarem no meu potencial, por todos esforços realizados que culminaram com mais essa conquista na minha vida;

A minha irmã Cledia Ferreira, a quem sempre tive e sempre terei na minha vida em qualquer circunstância. Obrigado por todo apoio. Sempre teremos um ao outro!

Aos meus avós Rita Simão (*in memoriam*) e Manoel Pinto (*in memória*), por terem sido tão presentes na minha vida e responsáveis por minha formação humana. Sei o quanto vocês estão felizes por verem o neto de agricultores, de pouco estudos, concluindo um doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Havt, por ter me acolhido e aceito como orientando, por toda sua disponibilidade, atenção, compreensão, incentivo, orientação e paciência durante todo esse percurso desde o mestrado. Muito obrigado!

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira, Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes e o Prof. Dr. Francisco Advane de Paulo Rodrigues por todas considerações, correções e sugestões de melhoria do trabalho. Obrigado por terem aceitado o convite.

A Profa. Dra. Karina Moreira de Alencar Cunha, da graduação e monitoria, por ter acreditado no meu potencial e por ter sido a ponte que me levou até a concretização desse doutorado. Muitíssimo obrigado!

Ao Prof. Dr. James Almada da Silva, pela colaboração com pesquisa, por ter nos cedido gentilmente o composto [8]-gingerol e o Prof. Dr. Mario Rogério Lima Mota,

pela realização das análises histopatológicas.

Ao NEMPI pela colaboração no processamento das amostras para análise histopatológica, Ao LEFFAG, na pessoa do Pós-doc Carlos Monteiro, pela contribuição e colaboração na execução do *Western Blotting*, ao CENAUREMN, na pessoa da Profa. Dra. Nilce Gramosa e Prof. Dr. Elenilson Alves, pela execução das análises de metabolômica. Muito obrigado.

A todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica do Laboratório de Toxinologia Molecular e do Laboratório de Doenças Infecciosas que de alguma forma contribuíram na minha caminhada de pós-graduando, meu muito obrigado.

Aos amigos Thiago Miranda, Dayara Silva e Mykael Lima, não existem palavras para agradecer a contribuição e apoio de vocês nesse percurso, que foi fundamental na execução desse trabalho. Muito obrigado!

Aos meus amigos de longa data e aqueles que ganhei na pós-graduação, por serem meu apoio nos momentos adversos, por cada palavra de motivação e por estarem presente em minha vida.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, a todos muito obrigado!

Ao CNPq pelo o apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Biomarcadores e os locais específicos de alteração relacionada a Lesão Renal Aguda.....	18
Figura 02 -	Mecanismo de nefrotoxicidade induzida por medicamentos.....	21
Figura 03 -	Estrutura química da Vancomicina.....	22
Figura 04 -	Mecanismo proposto na Lesão Renal Aguda Induzida por VCM.....	25
Figura 05 -	<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre) Planta e Rizoma.....	27
Figura 06 -	Estruturas Químicas/Moleculares dos compostos de Gingeróis.....	29
Figura 07 -	Estrutura Molecular do MSM e DMSO.....	32
Figura 08 -	Fluxograma de distribuição dos animais experimentais de acordo com o tempo de administração da vancomicina.....	40
Figura 09 -	Desenho experimental dos grupos caracterização do tempo de indução de LRA por VCM.....	41
Figura 10 -	Fluxograma de distribuição dos animais no bloco experimental tratamento com os compostos [8]-gingerol e Metilsulfonilmetano.....	42
Figura 11 -	Desenho experimental dos grupos tratamento como os compostos [8]-gingerol e Metilsulfonilmetano (MSM) na lesão renal por VCM....	44
Figura 12 -	Administração de Vancomicina aumenta o peso renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss.	55
Figura 13 -	Administração de Vancomicina aumenta os níveis plasmáticos de Creatinina e Ureia na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss.....	56
Figura 14 -	Administração de Vancomicina aumenta a atividade de MPO no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss.....	57
Figura 15 -	Administração de Vancomicina atenua a atividade de GSH no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss.....	58
Figura 16 -	Administração de Vancomicina aumenta a expressão gênica da KIM-1 e IL-1 β no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss.....	59

Figura 17 -	Administração de Vancomicina atenua a expressão gênica de SOD-1 no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos <i>Swiss</i>	60
Figura 18 -	Administração de Vancomicina aumentou a expressão gênica de HO-1 no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos <i>Swiss</i>	61
Figura 19 -	Administração de Vancomicina altera as análises histopatológicas no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos <i>Swiss</i>	62
Figura 20 -	Resultados PLS-DA de plasma sanguíneo de camundongos controle.....	64
Figura 21 -	Resultados PLS-DA de plasma sanguíneo de camundongos na indução de LRA por VCM.....	65
Figura 22 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam o Peso Renal na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	67
Figura 23 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam os níveis de creatinina e ureia plasmática na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	68
Figura 24 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano alteram dos parâmetros de volume urinário de 24 horas na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	69
Figura 25 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano melhoram os valores de <i>Clearance de Creatinina</i> na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	70
Figura 26 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam a excreção de proteína urinária na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	71
Figura 27 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano reduzem a atividade de MPO na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	72
Figura 28 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de KIM-1 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	73
Figura 29 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de NGAL na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	74
Figura 30 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de	

	IL-1 β na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	76
Figura 31 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de TNF α na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	77
Figura 32 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de CXCL-1 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	79
Figura 33 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de NF κ Bp65 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	80
Figura 34 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de SOD-1 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	82
Figura 35 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de HO-1 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	83
Figura 36 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de NrF-2 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	85
Figura 37 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de SIRT-1 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	86
Figura 38 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de STAT-3 na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	88
Figura 39 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam os níveis de expressão proteica de NF κ B, IL-1 β e JNK na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	89
Figura 40 -	[8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam as alterações histopatológicas no tecido renal na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	92
Figura 41 -	Mapa integrativo das alterações moleculares observadas no modelo de nefrotoxicidade por vancomicina tratada com [8]-Gingerol (8-G) e metilsulfonilmetano (MSM).....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Critérios de classificação para lesão renal aguda (LRA), doença/distúrbio renal agudo (DRA) e doença renal crônica (DRC).....	14
Tabela 02 - Critérios de diagnóstico da LRA de acordo com as classificações RIFLE, AKIN, KDIGO e CK.....	15
Tabela 03 - Sequência de iniciadores de PCR para os genes avaliados.....	48
Tabela 04 - Administração de Vancomicina altera as estruturas histológicas no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos <i>Swiss</i>	62
Tabela 05 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam as alterações histopatológicas no tecido renal na indução da LRA por VCM em camundongos <i>Swiss</i>	91
Tabela 06 - Resumo dos resultados encontrados na pesquisa.....	93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Lesão renal aguda: aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos.....	14
1.1.1 Lesão renal aguda induzida por fármacos.....	19
1.2 Vancomicina: Características gerais, propriedades Farmacocinética e Farmacodinâmica e Efeitos adversos.....	22
1.3 <i>Zingiber officinale</i> (Gengibre), Gingeróis e suas características.....	27
1.4 Metilsulfonilmetano: características e propriedades.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Animais e comitê de ética.....	39
4.2 Substância utilizada.....	39
4.3 Caracterização da indução da lesão renal aguda por vancomicina.....	39
4.4 Grupos experimentais.....	40
4.4.1 Padronização do tempo de indução da lesão renal aguda por vancomicina.....	40
4.4.2 Grupo experimental tratamento.....	42
4.5 Análise da Função Renal.....	45
4.5.1 Marcadores bioquímicos de Função Renal.....	45
4.6 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	45
4.7 Avaliação da atividade antioxidante.....	46
4.7.1 Avaliação dos níveis de Glutathione reduzida (GSH).....	46
4.8 Avaliação dos marcadores inflamatórios, antioxidante e de lesão renal por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	46
4.8.1 Extração do RNA Total.....	46
4.8.2 Síntese de cDNA.....	47
4.8.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	47

4.9 Expressão proteica de NFκB, IL-1β, JNK por Western Blotting.....	49
4.10 Análise histopatológica.....	50
4.11 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e identificação de metabólitos plasmáticos.....	51
4.11.1 Espectros de RMN e identificação dos metabólitos.....	51
4.11.1.1 Análise Quimiométrica.....	52
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Caracterização do tempo de indução de lesão renal aguda por vancomicina.....	54
5.1.1 Vancomicina aumenta o Peso renal na indução da LRA em camundongos Swiss.....	54
5.1.2 Vancomicina altera os parâmetros bioquímicos plasmáticos renais na indução da LRA em camundongos Swiss.....	54
5.1.3 Vancomicina altera os níveis de Mieloperoxidase (MPO) e Glutathione reduzida (GSH) renais na indução da LRA em camundongos Swiss.....	57
5.1.4 Vancomicina modula a expressão gênica de marcadores precoces de lesão renal, inflamatório e antioxidante na indução da LRA em camundongos Swiss.....	58
5.1.5 Vancomicina altera as estruturas histológicas na indução da LRA em camundongos Swiss.....	61
5.1.6 Variabilidades dos compostos orgânicos (metabólicos) plasmáticos por RMN em diferentes tempos indução de vancomicina.....	63
5.2 O tratamento com [8]-Gingerol e Metilsulfanilmetano na lesão renal aguda por Vancomicina.....	66
5.2.1 Os tratamentos com 8G e MSM atenuam o Peso renal na indução da LRA por VCM.....	66
5.2.2 Os tratamentos com 8G e MSM melhoram os parâmetros bioquímicos de função renal na indução da LRA por VCM.....	66
5.2.3 Os tratamentos com 8G e MSM melhoram o volume de urina excretada, Clearance de creatinina e proteína urinária na indução da LRA por VCM.....	69

5.2.4 Os tratamentos com 8G e MSM reduzem a atividade de MPO na indução da LRA por VCM.....	71
5.2.5 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica de biomarcadores precoce na indução da LRA por VCM.....	72
5.2.6 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica de marcadores inflamatórios na indução da LRA por VCM.....	75
5.2.7 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica de marcadores antioxidantes na indução da LRA por VCM.....	81
5.2.8 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica dos marcadores SIRT-1 e STAT-3 na indução da LRA por VCM.....	86
5.2.9 Os tratamentos com 8G e MSM alteram a expressão proteica de IL-1β, NFκB e Janus Quinase (JNK) na indução da LRA por VCM.....	89
5.2.10 Os tratamentos com 8G e MSM alteram as estruturas histológicas na indução da LRA por VCM.....	91
6 DISCUSSÃO.....	94
7 CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXO.....	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão renal aguda: aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos.

A lesão renal aguda (LRA) está relacionada com declínio abrupto e rápido da taxa de filtração glomerular, resultando na incapacidade do sistema renal excretar compostos nitrogenados, como ureia e creatinina, um marcador da função excretora renal, compostos estes provenientes do metabolismo orgânico e na redução do débito urinário (oligúria), um marcador quantitativo da produção de urina (Koza, 2016; Kellum et al., 2021).

A LRA compõe uma diversidade de condições funcionais renais, que são denominadas como doença e distúrbios renais agudos (DRA), podendo variar de leves e autolimitadas, a graves e persistentes. A **Tabela 1** apresenta a classificação da LRA, onde esta possui duração no máximo de 7 dias e após esse período são classificadas como distúrbio/doença renal. O termo “doença renal aguda” foi recentemente sugerido para descrever LRA prolongada. Ressalta-se que LRA e DRA ocorrem frequentemente em pacientes com ou sem DRC precedente (Levey et al., 2020).

Tabela 1 - Critérios de classificação para lesão renal aguda (LRA), doença/distúrbio renal agudo (DRA) e doença renal crônica (DRC)

Duração	Critérios funcionais	Critérios estruturais
LRA ≤ 7 dias	Aumento da Creatinina sérica em 50%; Aumento da Creatinina sérica maior que 0.3mg/dL; Oligúria maior ou igual a 6 horas.	Não definidos
DRA < 3 meses	LRA ou taxa de filtração glomerular TFG<60ml/min/1.73m ² ; Redução da TFG maior que 35%; Aumento da Creatinina Sérica >50%.	Aumento da albuminúria e hematuria (mais comum)
DRC > 3 meses	TFG < 60ml/min/1.73m ² .	Aumento da albuminúria

Fonte: adaptado de Kellum et al. (2021).

No intuito de padronizar, definir e classificar a LRA, grupos de consensos interdisciplinares vem propondo nos últimos anos critérios de classificações, a saber: AKIN (*Akute Kidney Injury Network*), RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss, End Stage*) e KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), esse último criou novas diretrizes para ajudar a melhorar o diagnóstico da LRA, com base nas definições propostas por AKIN e RIFLE. Em ambos os critérios de classificação, o estágio da doença é determinado com base nas alterações dos valores basais de creatinina sérica, taxa de filtração glomerular ou diurese (Zhou et al., 2016). Em 2009 surge um novo método de avaliação da LRA, que leva em consideração a cinética da creatinina sérica (CK), ou seja, o aumento absoluto ao longo de 24h e 48h (Waikar; Bonventre, 2009), conforme simplificado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Critérios de diagnóstico da LRA de acordo com as classificações RIFLE, AKIN, KDIGO e CK

Classificação	Definição de IRA	Estágio	Critérios
RIFLE	Aumento de SCr $\geq$ 50% dentro de 7 dias	Risco	$\geq 1,5$ vezes o valor basal Diurese $<0,5$ mL/Kg/h em 6h
		Injúria	≥ 2 vezes o valor basal Diurese $<0,5$ mL/Kg/h em 12h
		Falha	≥ 3 vezes o valor basal ou $\geq 0,5$ mg/dL até chegar a 4,0 mg/dL Anúria por 12h
		Perda	LRA persistente = perda completa da função renal > 4 semanas
		Estágio final	Doença renal em estágio terminal > 3 meses
AKIN	Aumento de SCr $\geq 0,3$ mg/dL ou 50% dentro de 48h	I	$\geq 0,3$ mg/dL ou de 1,5 a 1,9 vezes o valor basal. Diurese $<0,5$ mL/Kg/h em 6h
		II	> 2 -2,9 vezes o valor basal Diurese $<0,5$ mL/Kg/h em 12h
		III	≥ 3 vezes o valor basal, ou $\geq a$ 0,5 mg/dL para pelo menos 4,0 mg/dL ou TSR Diurese $<0,3$ mL/Kg/h em 24h ou anúria por 12h

Fonte: adaptada de Waikar, Bonventre (2009); Zhou et al., (2016); Yagub et al., (2022); Scr: creatinina sérica, TSR: terapia de substituição renal.

A incidência de LRA é variável, em parte devido aos diferentes critérios que definem e à falta de um “padrão ouro” para sua identificação. A LRA foi estimada em 21% em países de baixa a média renda e entre 3,0% e 18,3% em países de alta renda. Relatório publicado pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2018, no qual analisou as tendências de hospitalização por IRA nos EUA de 2000 a 2014, indicou que a taxa de hospitalizações por IRA aumentou, passando de 3,5 para 11,7 por 1.000 pessoas, o que representou um aumento de 230% (Chang-Panesso, 2022).

A LRA é responsável por 5% das hospitalizações e aproximadamente 30% das internações nas unidades de terapia intensiva (Nunes et al., 2010; Quiros et al., 2011). A sua incidência em pacientes hospitalizados varia de 5% a 7,5% e podendo chegar a 50%-60% em pacientes gravemente enfermos (Yoon et al., 2022). Além disso, apresenta uma taxa de mortalidade em média de 23%, podendo chegar a 49% em pacientes que necessitam de terapia de substituição renal (Kellum et al., 2021) e que nos últimos anos tem permanecido elevada, excedendo as taxa de mortalidade por câncer de mama, por insuficiência cardíaca e por diabetes (Lewington; Cerda; Mehta, 2013), foi projetado que até 2040, a DRC se tornará a quinta principal causa de morte em todo o mundo (Kamt; Liu; Yan, 2023).

No Brasil, no período de 2012 a 2022, a partir dos dados coletados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATA/SUS), foram registrados no país aproximadamente 1,2 milhões de internações hospitalares por insuficiência renal, sendo a região Sudeste a representar o maior índice, correspondendo 46%, seguido do Nordeste (22%), Sul (19%), Norte (7%) e Centro-oeste (6%). Quando se avaliou os dados de mortalidade (dividindo pelo número de internações), observou-se que no Brasil foi registrado uma taxa de mortalidade entre os pacientes de 12,74%, sendo as regiões Nordeste (13,44%) e Norte (13,96%), a apresentarem os maiores números de óbitos, o que pode ser explicado pelos seus indicadores socioeconômicos e a falta de centros especializados, dificultando assim o acesso ao tratamento (Duarte et al., 2023)

De acordo com os critérios KDIGO, as estimativas de incidência de LRA em populações hospitalizadas variam amplamente entre países e regiões, como cerca de 22,3% na América do Norte, 20,8% na Europa Ocidental, 19,4% no Leste Asiático, 16,9% na Austrália e Nova Zelândia e 23,5% na África Central (Gui et al., 2023).

Embora a etiologia da LRA seja multifatorial, dentre os diversos fatores de risco associados incluem os fatores ambientais, socioeconômicos, culturais, bem como fatores relacionados aos próprios pacientes (sexo e idade) e as comorbidades existentes. Dos fatores relacionados aos pacientes, podem ser modificáveis (hipotensão, desidratação, anemia e uso de fármacos nefrotóxico) ou não modificáveis (diabetes, doença crônica renal, cardíaca, hepática ou gastrointestinal, infecções graves e sepse). Outros fatores de risco são importantes para desenvolvimento da LRA, como: doença renal pré-existente, trauma grave, falência aguda de órgãos, hipovolemia, grandes cirurgias (como exemplo cirurgias cardíacas), permanências na UTI com uso de fármacos nefrotóxicos, quimioterapias, transplante renal, doenças autoimunes, obstrução do trato urinário, venenos de animais, infecção por HIV e recentemente a COVID-19 tem se apresentado um fator de risco relevante para LRA em todo o mundo (Kellum et al., 2021).

De acordo com estudo multinacional, a idade média dos pacientes com LRA são de 60 anos, mas isso pode se reduzir com diminuição das condições socioeconômicas do indivíduo para 45-50 anos nos países de baixa a média-baixa renda, e que independente das condições econômicas, 60% dos pacientes com LRA são do sexo masculino. No que diz respeito às diferenças étnico-racial, estudo realizado nos EUA apontou que as condições socioeconômicas eram responsáveis pelo maior risco de LRA em indivíduos afro-americanos do que em indivíduos brancos (Grams et al., 2014; Mehta et al., 2016).

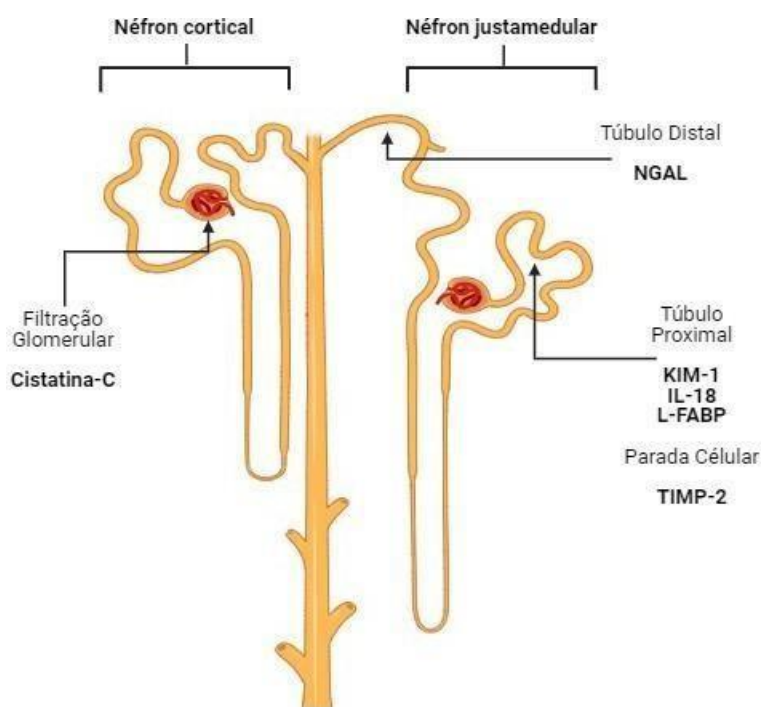
Ao contrário de outras patologias, a LRA não apresenta sintomas alarmantes de início imediato, mas o seu diagnóstico tem como base na creatinina sérica, TFG e no débito urinário, sendo a TFG o melhor índice da função renal, mas sua medição é difícil, pois sua mensuração é estimada usando níveis séricos de creatinina. No entanto vários estudos demonstraram que pequenos aumentos na creatinina sérica estão associados a piores desfechos de LRA, por ser um biomarcador tardio com pouca especificidade e sensibilidade, pois o seu aumento pode demorar de 48h a 72h após um insulto renal e pode ser afetado por diversos fatores. Outro ponto é relação não linear entre a creatinina e a TFG, pois grandes alterações na TFG significam apenas pequenas alterações na creatinina, que em grande parte é negligenciada por estarem dentro do intervalo de referência (Makris; Spanou, 2016; Oh et al., 2020; Kellum et al., 2021).

Nas últimas décadas, um número crescente de estudos têm sido

conduzidos para padronizar a definição e o diagnóstico, bem como melhor compreensão da LRA, nesse sentido biomarcadores estão sendo estudados no intuito de identificar precocemente a LRA. Tem sido demonstrado potenciais biomarcadores urinários e séricos de LRA que sejam capazes de detectar os estágios iniciais da lesão, no qual se destacam, lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL), molécula de lesão renal 1 (KIM-1), cistatina-C, interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina 18 (IL-18), proteína de ligação a ácidos graxos do tipo fígado (L-FABP) e inibidor tecidual de metaloproteinases-2 (TIMP-2) (Oh et al., 2020; Yoon et al., 2022) (**Figura 01**).

Esses marcadores podem refletir diferentes estágios da fisiopatologia da LRA, portanto a utilização de um painel de vários biomarcadores cobrindo diferentes fases desta síndrome pode fornecer uma melhor ferramenta de diagnóstico precoce para LRA, além de fornecer alvos para tratamentos futuros. Nesse sentido o diagnóstico precoce da LRA é vital, pois permite tempo hábil para implicações terapêuticas para o tratamento da LRA e pode prevenir o desenvolvimento do dano renal crônica (Gameiro et al., 2020; Bufkin; Karim; Silva, 2024).

Figura 01 – Biomarcadores e os locais específicos de alteração relacionada a Lesão Renal Aguda



Fonte: Adaptado de Bufkin, Karim, Silva (2024)

1.1.1 Lesão renal aguda induzida por fármacos

A nefrotoxicidade induzida por medicamentos é uma causa comum de LRA, dependendo do tipo de estudo e da definição utilizada, os medicamentos estão associados nos casos de LRA entre 14% a 37,5% em pacientes adultos hospitalizados, enquanto em crianças podem chegar até 12% (Perazella, 2018). Vale ressaltar que a maior incidência dos casos ocorre em pacientes em unidades de terapia intensiva. E dentro desse cenário os antibióticos representam um dos maiores grupos de medicamentos envolvidos (Kwiatkowska et al., 2021; Perazella; Rosner, 2022).

O potencial nefrotóxico dos medicamentos é um processo complexo que envolve uma combinação de fatores de riscos que incluem o próprio fator inerente do fármaco (estrutura, dose, tempo de tratamento, via excretora através do rim e dentre outras), assim como as características ligadas do paciente (comorbidades, fatores genéticos para metabolização de fármacos, resposta imunológica e inflamatória do paciente) que contribui para o aumento do risco de lesão renal, como também o metabolismo e excreção do medicamento pelo rim (Perazello, 2018, 2019).

Como o rim metaboliza e excreta (através de filtração e secreção tubular) os medicamentos ingeridos, a interação dessas substâncias com diferentes partes do néfron pode estar associada à nefrotoxicidade, sendo os túbulos a região mais exposta a essas lesões por diferentes mecanismos. Em resumo, a lesão renal por medicamentos se desenvolve por meio de três possíveis mecanismos: 1) necrose tubular aguda (NTA), sendo essa a causa mais comum das lesões renais, que consiste em um mecanismo dose-dependente, onde a causa está relacionada ao contato apical com medicamentos ou seus metabólitos, assim como o seu transporte da superfície apical e da secreção de fármacos da superfície basolateral para o lúmen tubular, 2) nefrite intersticial aguda (NIA), que se trata de um mecanismo independente da dose e 3) nefropatia cristalina (Petejova et al., 2020; Kwiatkowska et al., 2021).

A lesão tubular induzida por medicamentos pode ser causada por vários mecanismos (lesão mitocondrial, lesão oxidativa, dano ao DNA) que levam a apoptose, necrose e morte celular. E esse tipo de lesão tubular ocorre com diferentes classes de medicamentos, como agentes antimicrobianos,

quimioterápicos, inibidores de calcineurina e agentes de contraste (Perazello, 2019).

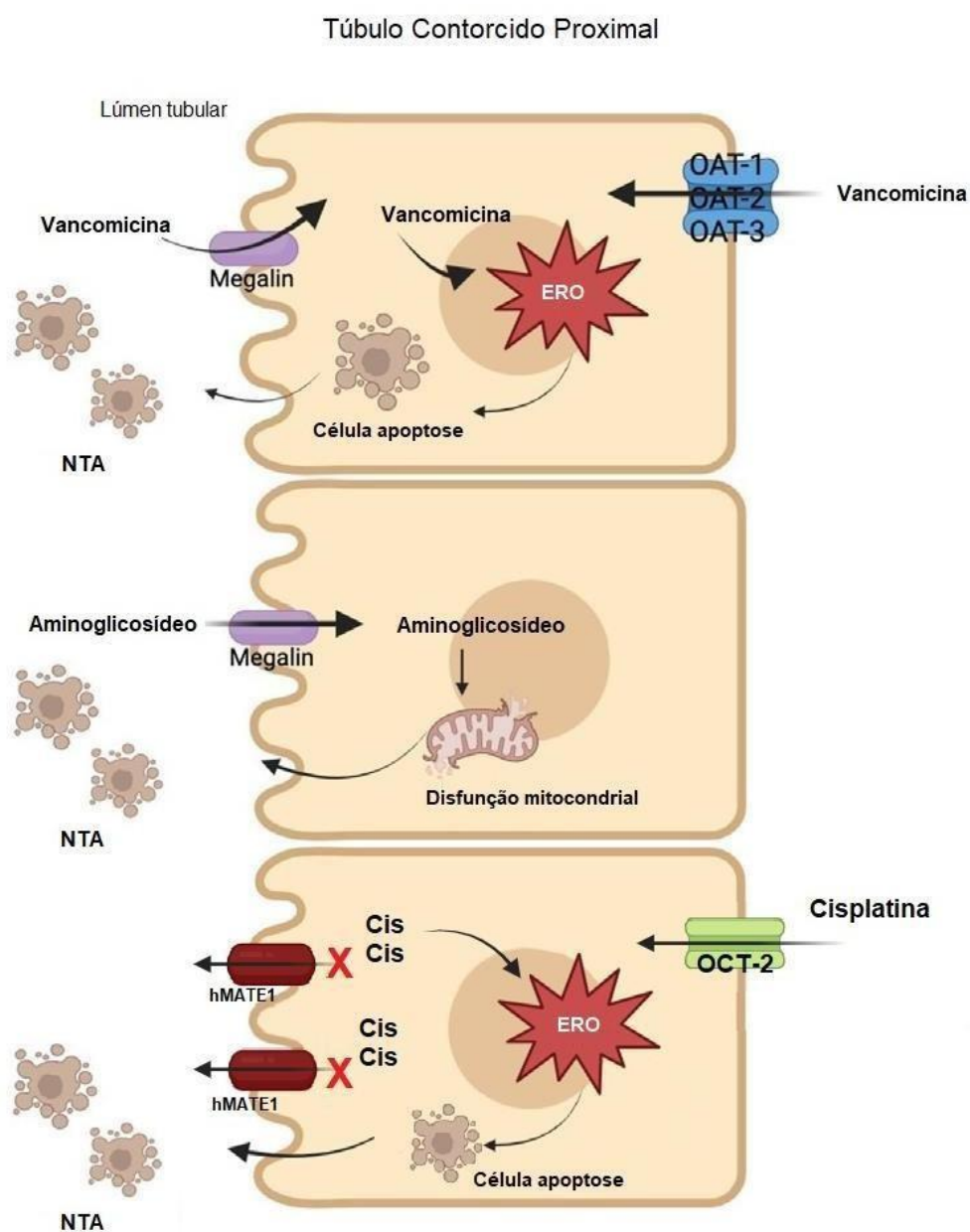
O mecanismo de nefrotoxicidade de cada medicamento interage em partes distintas do néfron. na **Figura 02** observa-se esquematicamente os mecanismos comuns de nefrotoxicidade e exemplos de fármacos envolvidos. Como já mencionado anteriormente, os antibióticos são amplamente prescritos e associados à LRA. Neste contexto, a vancomicina fármaco com características de nefrotoxicidade, adentra as células tubulares proximais por endocitose mediada por receptor de urina e por secreção mediada por transportador da circulação peritubular. O seu acúmulo na célula estimula a fosforilação oxidativa e o consumo de oxigênio, levando aumento da produção de EROs, que induzem a peroxidação lipídica, resultando em dano mitocondrial, que consequentemente induz a liberação de citocromo C, ativação de caspases e apoptose celular (Filippone; Kraft; Farber, 2017; Pais et al., 2020). Outro mecanismo relacionado à vancomicina é formação de cilindro tubular obstrutivo composto de agregados não cristalinos de vancomicina com uromodulina, que pode contribuir para a LRA ao obstruir principalmente os túbulos distais (Luque et al., 2017).

Os aminoglicosídeos, como a gentamicina e a amicacina estão associados à LRA em 10% a 25% dos pacientes expostos (Perazello; Rosner, 2022). Os aminoglicosídeos são livremente filtrados e subsequentemente reabsorvidos pela megalina, ao chegar dentro da célula se acumula nos lisossomos, no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Ao atingir um limiar de concentração esvaziam-se no citosol, levando à disfunção mitocondrial, induzindo apoptose e necrose das células epiteliais tubulares (Campbell; Chen; Edelstein, 2023).

A cisplatina é um dos medicamentos antineoplásicos mais eficazes utilizados para o tratamento de vários tipos de câncer e a nefrotoxicidade é o efeito adverso mais importante, que ocorre em 30–40% dos pacientes tratados (Volarevic et al., 2019).

A cisplatina é transportada para dentro da célula através do transportador de cátions orgânicos humanos-2 (OCT-2) e excretada por vários transportadores apicais para o espaço urinário. O acúmulo intracelular de cisplatina é devido ao aumento da captação basolateral ou ao efluxo deficiente dos transportadores hMATE1 na urina levando à nefrotoxicidade através da produção de uma série de substâncias (EROs, mediadores inflamatórios), que promovem a toxicidade mitocondrial (Prazello, 2019; Kwiatkowska et al., 2021).

Figura 02 – Mecanismo de nefrotoxicidade induzida por medicamentos



Fonte: Adaptado de Campbell, Chen, Edelstein (2023).

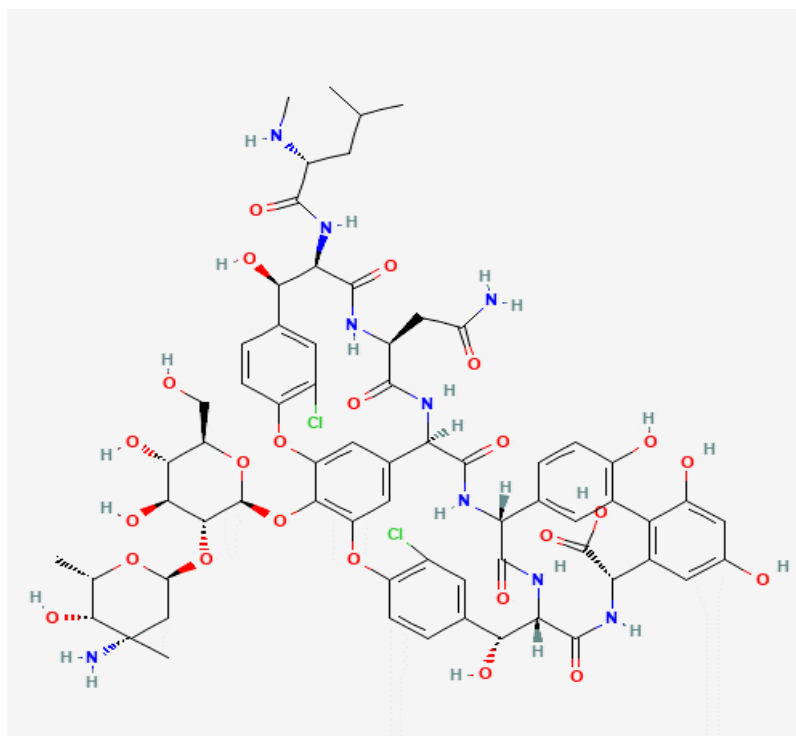
NTA: necrose tubular aguda; ERO: espécie reativa de oxigênio; OAT: transportar de ânions orgânicos; OCT: transportar de cátions orgânicos; hMATE-1: transportador humano de proteínas de extrusão de múltiplas drogas e toxinas.

1.2 Vancomicina: Características gerais, propriedades Farmacocinética e Farmacodinâmica e Efeitos adversos.

A Vancomicina (VCM) é um antibiótico glicopeptídeo comumente utilizado no tratamento de infecções graves, como sepse, osteomielite ou pneumonias causadas por organismos Gram-positivos multirresistente desde sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos em 1958. Atualmente é o antibiótico de escolha (padrão ouro) para infecções, com *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina, *Enterococcus* sp., *Actinomyces* sp., *Clostridium* sp. e *Eubacterium* sp. (Petejova et al., 2020; Kim et al., 2021; Kunming et al., 2023).

A VCM é altamente hidrofílica com peso molecular de 1450 Da e estrutura molecular $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ (**Figura 03**), sendo comercializada para infusão venosa na forma de um pó branco estéril liofilizado. Recomenda-se que sua reconstituição, diluição e infusão sejam realizadas durante uma hora para evitar reações adversas (Brunton, 2012; Kan et al., 2022).

Figura 03 – Estrutura química da Vancomicina



Fonte: PubChem (2025).

A dose recomendada de administração endovenosa (EV) de vancomicina em pacientes com função renal normal, de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, é de 15-20 mg/Kg/dose a cada 8-12 horas, não excedendo 2g por dose (Liu et al, 2011).

A VCM é bem absorvida por via endovenosa, apresentando um volume de distribuição entre 0,4 a 1L/Kg. Ligam-se às proteínas plasmáticas na ordem de 10% a 64% dependendo dos níveis totais de proteínas séricas. Em indivíduos adultos com função renal normal (depuração de creatinina), possui meia-vida de eliminação de 4 a 6 horas e sua excreção se dá principalmente por filtração glomerular com 80-90% da vancomicina na forma não metabolizada (Kan et. al., 2022).

A molécula da VCM forma interações de ligações de hidrogênio com as porções terminais D-alanil-D-alanil da parede do peptidoglicano, essa ligação leva a uma alteração conformacional que impede a transpeptidação, onde ocorrem as ligações cruzadas, levando assim à decomposição da parede celular e à lise bacteriana. A estrutura complexa da VCM (**Figura 03**) impede a sua penetração na membrana externa das bactérias Gram-negativas, limitando assim seu efeito (Cong; Yang; Rao, 2020).

A eficácia terapêutica da VCM, juntamente com seu baixo preço, o torna o antibiótico mais frequentemente prescrito e responsável por até 35% dos pacientes hospitalizados com infecções (Diallo et al., 2020; Mitevska et al., 2021) e o aumento dessa incidência nos últimos anos, tem proporcionado com que VCM seja cada vez mais amplamente distribuída e sendo um dos antibióticos mais administrados nos ambientes hospitalares (Elyasi et al., 2013; Rhodes et al., 2016; Takigawa et al., 2017).

Estudo realizado por Liu e colaboradores (2021) na China, demonstrou que a VCM é o segundo medicamento mais comum que causa LRA adquirida em hospital induzida por medicamentos e sua administração apresenta um risco aumentado de 2,5 vezes mais a desenvolver tal lesão (Ray et al., 2016). Além da nefrotoxicidade, a VCM pode provocar outros efeitos adversos após a sua administração intravenosa como: hipotensão, tontura, dor ou espasmos musculares, respiração ofegante ou falta de ar, reação alérgica e flebite (Kan et al., 2022).

Os fatores risco associados para o desenvolvimento da LRA por VCM são diversos, incluindo fatores relacionados ao paciente (sexo, peso corporal, doenças concomitantes), ao medicamento (dose máxima, duração da terapia) e a uso de

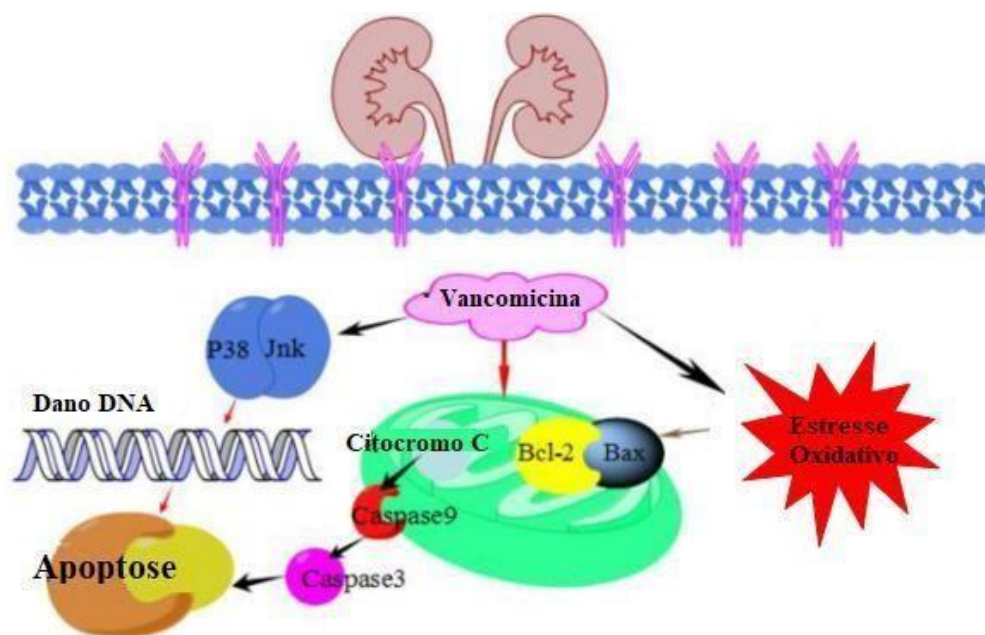
medicamentos nefrotóxicos concomitantes (exemplo: aminoglicosídeos, piperacilina-tazobactam, agentes antivirais e anti-inflamatórios não esteroides) (Kim et al., 2022). O tempo de duração da terapia e a concentração da VCM tende a estar associada a um risco aumentado de LRA, assim tempos maiores que 7 dias têm apresentado associados significativos importantes (Filippone et al., 2017; Kunming et al., 2021). Estudo realizado mostrou que a incidência de LRA relacionada a concentração de VCM em pacientes tratados com 10–15, 15–20, 20–35 e >35 mg/L de VCM foi respectivamente de 3,1%, 10,6%, 23,6% e 81,8% (He et al., 2021).

A incidência de nefrotoxicidade induzida por VCM tem sido relatada entre 5% e 43% em diversos estudos/cenários clínicos (Kim et al., 2021; Kan et al., 2022). Minejima e colaboradores (2011) relataram essa incidência em 19% dos pacientes após a terapia com vancomicina. Da mesma forma, em um estudo retrospectivo realizado por Hanrahan e colaboradores (2015), apontou que 8,8% dos 159 pacientes que receberam vancomicina apresentaram uma lesão renal de novo início. Em uma revisão de literatura realizada por Elyasi e colaboradores (2012), demonstrou que toxicidade renal de vancomicina apresentou uma faixa de 10-20% em pacientes que usaram doses convencionais, enquanto o intervalo foi de 30-40% para aqueles tratados com doses mais elevadas. Um estudo recente realizado na China com pacientes adultos com endocardite infecciosa, apresentou uma incidência de 17% de LRA por VCM. E diversos estudos realizados em diferentes países têm apontado uma incidência entre 10-15% em pacientes adultos em geral (Kunming et al., 2023).

Embora o mecanismo exato da nefrotoxicidade induzida por VCM não esteja bem elucidado, estudos sugerem que a oxidação pró-inflamatória, a disfunção mitocondrial e a apoptose celular como os principais mecanismos patogênicos. A fosforilação oxidativa pela VCM induz radicais livres de oxigênio e, assim, reduz a atividade defensiva de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase e catalases (Elyasi et al., 2013; Bamgbola, 2016; Im et al., 2017).

A produção de superóxido pela VCM provoca a despolarização do potencial da membrana mitocondrial com liberação do citocromo C e uma ativação subsequente de ambas as caspases 9 e 3, sendo a caspase 3 envolvida na morte celular por apoptose (Arimura et al., 2012; Humanes et al., 2015; Im et al., 2017; Shi et al., 2021) (**Figura 04**).

Figura 04 – Mecanismo proposto na Lesão Renal Aguda Induzida por VCM



Fonte: Adaptado de SHI et al. (2018).

A ativação da via NFκB tem um papel fundamental no dano às células epiteliais tubulares e está associado ao aumento dos níveis da proteína pró-apoptótica Bcl-2 e do efetor de morte celular caspase-3 (He et al., 2021). Estudo demonstrou que o VCM pode aumentar a expressão de NFκB e produzir citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α, o que leva a danos renais em ratos (Qu et al., 2019) e que a regulação de sirtuína-1 e NFκB atenuou a lesão renal, reduzindo assim a inflamação das células epiteliais e a apoptose associada ao estresse oxidativo (Qi et al., 2018).

Além disso, a via molecular do fator nuclear eritróide relacionada ao fator-2 (NrF-2)/heme oxigenase-1 (HO-1) representa um papel importante na orquestração de genes antioxidantes perante a elementos de resposta antioxidante. A atividade transcricional de NrF2 é suprimida por estar ligada à proteína 1 associada à Kelch (Keap1) no citoplasma. No entanto, diante do aumento do estresse oxidativo, o NrF2 dissocia-se do Keap1 e transloca-se para o núcleo e aumenta a expressão de várias enzimas antioxidantes, como HO-1, protegendo as células renais contra intoxicação oxidativa e apoptose (Tian et al., 2017; Khalaf et al., 2022).

Estudos em animais sugerem necrose nas células tubulares renais proximal por acumulação de VCM como mecanismo de nefrotoxicidade. Maiores

concentrações de fármaco e maiores taxas metabólicas nos túbulos proximais aumentam a suscetibilidade à toxicidade do fármaco e, consequentemente, os túbulos proximais se tornam um alvo primário da nefrotoxicidade por VCM (King; Smith, 2004; Dimondi; Rafferty, 2013; Elyasi et al., 2013; Carreno; Kenney; Lomaestro, 2014).

A VCM pode alterar a função de reabsorção renal dependente da energia do túbulo proximal e alteração da função mitocondrial. Com base nestes dados de animais, a isquemia tubular renal devido aos efeitos oxidativos da vancomicina é o principal mecanismo conhecido (Elyasi et al., 2013).

Embora a maioria dos eventos nefrotóxicos de VCM sejam considerados reversíveis, o mesmo é responsável pelo prolongamento da hospitalização, aumento da taxa de mortalidade e maior incidência de doença renal de estado inicial. Por essa razão surge a necessidade de estratégia para a sua prevenção, incluindo a perfusão renal adequada, que deve ser mantida assegurando a existência de hidratação intravenosa e o monitoramento de medicamentos terapêuticos em melhorar a eficácia, reduzir os efeitos adversos e otimizar o custo-benefício em indivíduos de alto risco (Bamgbola, 2016).

Diversos estudos estão se utilizando de substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias na prevenção do desenvolvimento da lesão renal por VCM em modelos experimentais em animais, como erdosteína, vitamina E, vitamina C, N-acetilcisteína, éster fenetil do ácido cafeico, curcumina, rutina, luteína e escopoletina em virtude do estresse oxidativo ser descrito como mecanismo principal da sua fisiopatologia. Tais compostos foram capazes de reduzir os níveis de peroxidação lipídica/malondialdeído, aumentarem da atividade da defesa antioxidante (superóxido dismutase, glutathione redutase, catalase) e atenuar o processo inflamatório e apoptótico celular (Oktema et al., 2005; Ocak et al., 2007; Ahmida, 2012; Qu et al., 2019; Emeka et al., 2021; He et al., 2021; Khalaf et al., 2022)

1.3 *Zingiber officinale* (Gengibre), Gingeróis e suas características.

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma das principais espécies pertencentes à família Zingiberaceae. É uma planta herbácea perene com haste frondosa, nodoso, carnudo, de cor amarela e coberto de cicatrizes semelhantes à anéis e com rizoma ramificados e aromáticos (**Figura 05**), originária e nativa do leste e sul da região asiática, cultivada nas regiões tropicais e semitropicais. A família do gengibre é composta por 53 gêneros e mais de 1300 espécies (Capó et al., 2007; Pérez et al., 2010; Kumar et al., 2011, Kumar et al., 2013, Shaharajabian; Sun; Cheng, 2019).

Figura 05 - *Zingiber officinale* (Gengibre) Planta e Rizoma



Fonte: Singletary (2023).

O gengibre é considerado um importante recurso natural, estando entre os produtos fitoterápicos com grande valor econômico, fornecendo muitos produtos úteis para alimentos, especiarias, medicamentos, corantes e perfumes, sendo um dos produtos que apresentaram uma disparada na sua demanda em residências, indústrias farmacêuticas e alimentícias, cervejeiras e outras indústrias relacionadas (Barreto; Toscano; Fortes, 2011; Kumar et al., 2013; Bag, 2018; Sowley; Kankam, 2019).

Os benefícios do gengibre para a saúde humana têm sido estudados e reportado nas últimas décadas em razão de suas propriedades medicinais e seus efeitos terapêuticos já tem sido datado desde o século XIII (Singletary, 2010).

Inúmeros estudos têm relatado diversas propriedades farmacológicas, incluindo: efeito nos distúrbios gastrointestinais (dores de estômago, espasmo abdominal, náuseas, vômitos e colite ulcerativa), anti-inflamatória, antioxidante, anti-obesidade, anti-asmático, antialérgico, anti-diabético, síndrome metabólica, antimicrobiano, anti-carcinogênica, efeito cardioprotetor e hepaprotetor e nefroprotetor (El-Sharaky; Newairy; Kamel; Eweda, 2009; Rodrigues et al., 2014; Qian et al., 2016; Ajayi; Adedara; Farombi, 2015; Halawany et al., 2017; Ballaster et al., 2021; Sampath et al., 2021; Zhu et al., 2021).

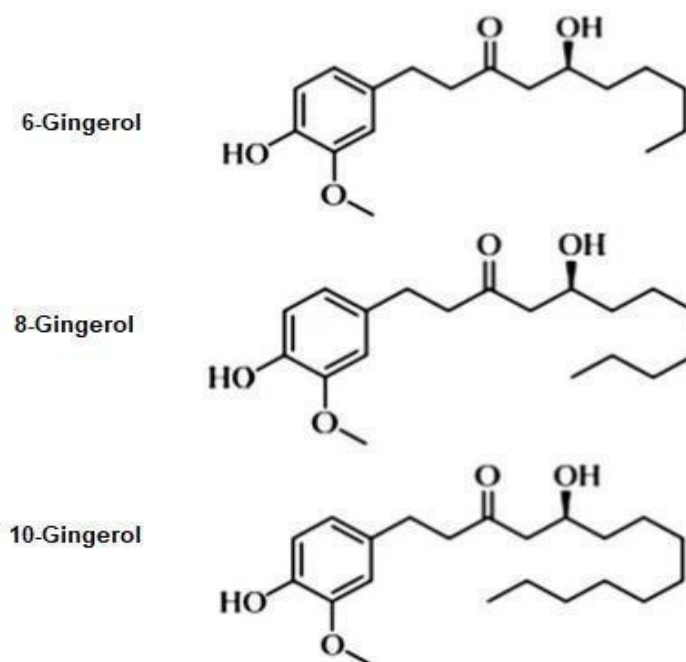
As propriedades medicinais oriundas do gengibre são explicadas pela presença de diversos componentes químicos, mais de 400 componentes bioativos já foram encontrados no gengibre, como: gingeróis, shogaois, paradois e zingerones, que são os princípios ativos responsáveis pela atividade biológica e farmacológica. Os gingeróis e os shogaois são responsáveis pela característica pungente do gengibre, principalmente o [6]-gingerol, um dos homólogos dos gingeróis que apresentam maior pungência (Ajayi; Adedara; Farombi, 2015; Mele, 2019; Zhang et al., 2021).

Os compostos gingeróis são os polifenóis mais abundantes no gengibre fresco e compartilham entre si uma porção cetona aromática, mas se diferem pelo número de carbonos na sua cadeia lateral: 10, 12, 14 átomos de carbonos, dando origem ao [6]-, [8]- e [10]-gingerol, sendo o [6]-gingerol a forma mais abundante no gengibre, seguindo pelo [10]-gingerol e [8]-gingerol. A **Figura 06** apresenta a estrutura química destes principais homólogos de gingerol, que após a desidratação formam os shogaois correspondentes e a hidrogenação dos shogaois produz os paradois (Stoner, 2013; Bernard; McConnery; Hoskin, 2017).

Em doses usuais utilizadas para fins dietéticos ou médicos, o gengibre não apresenta toxicidade aguda registrada. Ensaios clínicos em humanos e estudos em animais demonstraram que o gengibre até a concentração de 2g por dia é bem tolerado (Lashgari et al., 2021), considerado um ingrediente seguro de acordo com FDA do USA (Mukkavilli et al., 2018). Estudo realizado na China avaliou a relação entre o consumo diário de gengibre e o risco de doenças crônicas em adultos. Os resultados demonstraram que o consumo de gengibre entre homens e mulheres neste estudo foi de aproximadamente 6,9 e 4,0 g/dia para um homem de 78 Kg e para uma mulher de 60 Kg respectivamente e que o consumo de gengibre foi associado à diminuição do risco de doenças crônicas (Wang et al., 2017).

A absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos compostos químicos do gengibre têm sido demonstrados em diversos estudos clínicos em humanos, dentre eles, ao administrarem cápsulas de pó da raiz de gengibre em indivíduos na dose de 2g/dia, foi observado que os Gingeróis e shogaols foram rapidamente absorvidos, e detectados no plasma na forma livre e conjugada (glicuronídeo ou sulfato). Quando os dados desses experimentos são considerados em conjunto, o T_{máx} (o tempo para atingir a concentração plasmática máxima) foi de 45 a 120 minutos, e a meia-vida plasmática (t_{1/2}) de todos os metabólitos de gingerol foi de 1 a 3 horas (Mukkavilli et al., 2018; Singletário, 2023).

Figura 06 - Estruturas Químicas/Moleculares dos compostos de Gingeróis



Fonte: Alharbi et al. (2022).

Experimentos com roedores confirmaram a rápida absorção e identificação dos gingeróis e shogaols no plasma sanguíneo na forma livre e conjugada. É interessante notar que os gingeróis, os shogaols e a zingerona se distribuíram ampla e rapidamente em vários tecidos, e alguns foram até detectados no cérebro, pois vários gingeróis e shogaols foram capazes de penetrar a barreira hematoencefálica por difusão passiva (Mukkavilli et al., 2017; Li et al 2019; Simon et al., 2020; Singletário, 2023).

Estudos realizados por Ahmed e colaboradores (2000), demonstraram

que a utilização de gengibre na dieta dos animais no modelo de estresse oxidativo por pesticida (malation) atenuou o dano oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando as concentrações enzimáticas da SOD e da glutational peroxidase. Resultados semelhantes foram observados em um estudo que avaliou os efeitos do extrato aquoso de gengibre (100mg/kg) no edema da pata induzido por carragenina 1%, apresentou uma diminuição acentuada na espessura do edema, tamanho e porcentagem de inflamação. Além disso, este achado foi confirmado pela determinação da atividade antioxidante contra a inflamação, com aumento das atividades de SOD, CAT GPx (Zammel et al., 2021).

Fração enriquecida de gingeróis apresentou propriedades renoprotetoras no modelo de nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos, apresentando melhora nos parâmetros da função renal, redução no dano oxidativo, diminuição na peroxidação lipídica e aumento na atividade das enzimas SOD e glutational reduzida (GSH) e reduções significativas na transcrição de mRNA para TNF- α , IL-2 e IFN- γ (Rodrigues et al., 2014).

Estudos realizados por Zhang e colaboradores (2017) ao analisarem os efeitos dos [6]-, [8]- e [10]-gingerol no modelo de colite ulcerativa por dextrana sulfato de sódio (DSS) em ratos, demonstrou que os compostos de gingeróis atenuaram o dano oxidativo e inflamatório, diminuindo as concentrações de malondialdeído e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes, suprimindo as concentrações IL-1 β e TNF- α e a atividade da mieloperoxidase (MPO).

O tratamento oral de longo prazo com [6]-gingerol, um importante componente bioativo do gengibre, atenuou as expressões de TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B (p65), proteína quimioatraente de monocitos-1 (MCP-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) e aumentou a expressão de IL-10 na colite ulcerativa induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS) em camundongos (Ajayi; Adedara; Farombi, 2018).

Os compostos [6]- e [10]-gingerol foram capazes de suprimirem a lesão renal aguda induzida por sepse. Ambos compostos fenólicos repararam a função renal através da atividade antioxidante relacionada à diminuição do estresse oxidativo/nitrosativo e de citocinas pró-inflamatórias possivelmente pela modulação na produção de dimetilamina e metilsulfonilmetano (Rodrigues et al., 2018).

Nos danos renais ocasionados no modelo de LRA induzida por cisplatina em camundongos, foi observado que o [8]-gingerol na dose 50mg/kg, apresentou atividade nefroprotetora, melhorando a taxa de filtração glomerular,

reduzindo a concentração de proteína na urina, o estresse oxidativo e a inflamação (Santos, 2019).

Tem sido reportado que os compostos de gingeróis exercem seus efeitos através de vias de sinalização específicas associadas à funções/mecanismos celulares, como autofagia, metabolismo celular, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e outras sinalizações e desenvolvimento/diferenciação (Kiyama, 2020).

Diversos estudos vêm demonstrando as possíveis vias sinalização dos compostos de gingeróis: envolvimento nas vias de sinalização relacionadas à MAPK, como a via ERK1/2/JNK/AP-1 para os efeitos inibitórios do [6]-gingerol na apoptose, as vias da MAPK e da proteína quinase A (PKA) para os efeitos inibitórios do [8]-gingerol na melanogênese, a via p38 MAPK / NFkB / ROS para os efeitos protetores do [6]-gingerol contra lesão de isquemia e reperfusão intestinal e a MAPK (ERK/JNK/p38) / via de apoptose mitocondrial para a indução de apoptose por [10]-gingerol (Huang et al, 2013; Radhakrishnan et al., 2014; Ryu; Chung, 2015; Li et al., 2017).

Recentemente dados publicados por Ferreira e colaboradores (2023), demonstraram que [8]- e [10]-gingerol atenuaram os danos urotelial na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, apresentando propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias mediante a estimulação da expressão de IL-10, que por consequentemente ativa intracelularmente a via de sinalização JAK/STAT/FOXO.

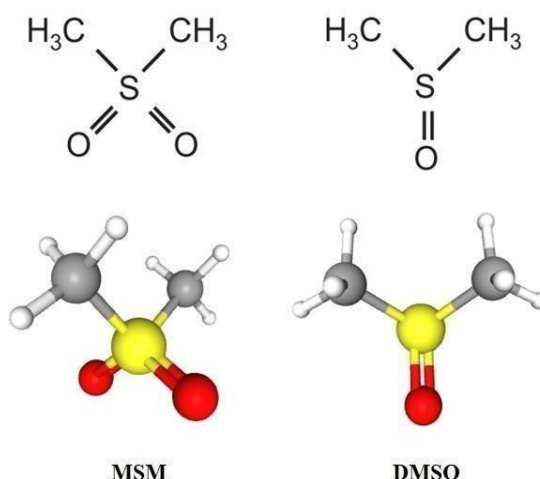
1.4 Metilsulfonilmetano: características e propriedades.

O Metilsulfonilmetano ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$ / MSM) ou dimetilsulfona (DMSO_2) é composto organosulfurado natural, contendo enxofre que corresponde 34% da sua composição, presente em diversas plantas verdes, frutas, vegetais, grãos, carne, peixe, ovo e leite. Sendo o primeiro produto metabólico oxidado do dimetilsulfóxido ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ / DMSO) e a principal substância do corpo para manter o equilíbrio do enxofre biológico, considerado um precursor importante na síntese dos aminoácidos metionina e cisteína. (Magnuson, Appleton, Ames, 2007; Amirshahrokhi; Khalili, 2017; Velusamy; Tamizhselvi, 2018; Toguchi et al., 2023).

MSM e DMSO apresentam propriedades físicas distintas, o primeiro em condições de temperatura e pressão padrão é encontrado como um sólido

branco cristalino, já o DMSO é encontrado no estado líquido. DMSO é um solvente aprótico altamente polar, miscível em água e um excelente ligante. O MSM é menos reativo que o DMSO, pois o átomo S da sulfona já está em seu estado de oxidação mais elevado (Ahn et al., 2015).

Figura 07 - Estrutura Molecular do MSM e DMSO



Fonte: KEEG adaptado (2024).

O MSM tem sido amplamente utilizado nos últimos 20 anos como suplemento dietético em virtude ao seu potencial benefício na saúde humana, principalmente para aliviar os sintomas da artrite (Ahn et al., 2015; Karabay et al., 2016). Em estudos realizados em animais, o MSM demonstrou ser bem tolerado na dose aguda de 2g/kg (Horváth et al., 2002) e não causou qualquer toxicidade materna ou efeito teratogênico na dose até 1g/kg/dia (Magnuson et al., 2007). Essas concentrações utilizadas são cinco vezes maiores que as doses utilizadas em humanos (Karabay et al., 2016).

Estudos farmacocinéticos demonstraram que o MSM é absorvido rapidamente e atinge eficientemente a corrente sanguínea, com concentrações máximas dentro de 2 horas após a sua administração oral e sendo rapidamente eliminado principalmente pela urina (Magnuson et al., 2007; Magnuson; Appleton; Ames, 2007). A rápida eliminação do MSM (aproximadamente 60% em 24 horas) sugere a necessidade de administrações repetidas para manter os níveis teciduais, para assim proporcionar os seus efeitos benéficos em condições crônicas de saúde (Karabay et al., 2016).

Tem sido demonstrado que o MSM melhora os sintomas da dor e da função física em pacientes com osteoartrite do joelho, protege contra distúrbios metabólicos induzidos pela obesidade (hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e inflamação), na inflamação das membranas mucosas, cistite intestinal, rinite alérgica, colite, melhora a cicatrização de feridas, atenua os danos no fígado, pâncreas e pulmões, em razão das suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidante, e isso vem despertando nos pesquisadores o interesse de investigar seus efeitos biológicos de forma mais elaborada (Amirshahrokhi; Bohlooli; Chinifroush, 2011; Sousa-Lima et al., 2016; Butawan; Benjamin; Bloomer, 2017; Velusamy; Tamizhselvi, 2018; Miao et al., 2022).

É conhecido que o MSM apresenta uma defesa notável contra o estresse oxidativo, em razão da ação antioxidante em eliminar as espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua capacidade de aumentar as concentrações de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GSH) e catalase (CAT) e reduzir os níveis de malondialdeído (MDA) em modelos murinos de colite, hepatotoxicidade e lesão aguda de pulmão (Amirshahrokhi; Bohlooli; Chinifroush, 2011; Bohlooli et al., 2013; Amirshahrokhi; Khalili, 2017).

As propriedades antioxidantes do MSM estão relacionadas provavelmente pela influência de modulação de pelo menos quatro tipos de fatores de transcrição: NFκB, transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), p53 e NrF-2. A regulação de tais fatores, o MSM atua no equilíbrio de ERO e enzimas antioxidantes (Butawan et. al. 2017).

O MSM foi relatado como uma molécula com propriedades anti-inflamatória com ação inibitória na sinalização do NFκB e atenuando a expressão de citocinas pró- inflamatórias (IL-1β, TNFα, IL-6) e reduzindo a produção mitocondrial de EROS em células RAW264.7(cultura de macrófagos) estimuladas por lipossacarídeo (LPS) (AHN et al., 2015). O pré-tratamento com MSM também demonstrou proteger lesões hepáticas, reduzindo os níveis de TNFα e IL-6 via inibição na transcrição do NFκB (KIM et al., 2009; KAMEL; EL MORSY, 2013), assim como em células cardíacas submetidas ao processo inflamatório por TNFα (Miller, 2018).

Tem sido demonstrado que o MSM atenuou a expressão ou a atividade dos fatores de transcrição de STAT em várias linhagens celulares de câncer *in vitro* (Butawan et. al. 2017). Estudos apresentaram que o MSM melhorou diferenciação in

vitro de osteoblastos através da ativação das vias de sinalização janus quinase 2 e transdutor de sinal e ativador da transcrição 5b (JAK-2/STAT-5b) (JOUNG et al., 2012) e inibição da via sinalização do NFκB e STAT-3 em macrófagos derivados da medula óssea (Joung et al., 2016).

A via JAK/STAT está envolvida na regulação de genes relacionados à apoptose, diferenciação e proliferação, todos os quais geram ERO como um componente de sinalização necessário (Holl et. al. 2016; Redza-Dutordoir; Averill-Bates, 2016). E a regulação negativa dessa via pode atenuar a produção de EROs e diminuir a expressão de oxidases (Manea et. al. 2010).

Tem sido reportado ainda que o MSM suprime o crescimento do câncer de mama regulando negativamente as vias do STAT-3 e STAT-5b (LIM et al., 2012). Os efeitos protetores do MSM foram associados à supressão do NFκB e quinase regulada por sinal extracelular (ERK) / quinase c-Jun N-terminal (JNK) - via de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) na traqueia e células HD11 (Miao et al., 2022).

Rodrigues e colaboradores (2018) demonstraram que animais tratados com os compostos [6]- e [10]-gingerol apresentavam aumento da excreção do metabólito endógeno MSM. Contudo, a excreção deste mesmo metabólito foi extremamente potencializada quando os animais foram submetidos ao modelo de sepse experimental e tratados com os compostos de gingeróis. Este resultado hipotetiza que o composto MSM pudesse ser um marcador de prognóstico, haja vista que o tratamento com os gingeróis reverteram os efeitos lesivos renais frente ao modelo de sepse utilizado.

Mesmo não possuindo aprovação do FDA, o MSM é considerado um composto seguro, por não apresentar toxicidade em humanos em estudos já realizados. Tem sido reportado pela literatura em estudos clínicos e experimentais os potenciais efeitos preventivos e terapêuticos do MSM, demonstrando fortes atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (Amirshahrokhi; Bohlooli, 2013; Amirshahrokhi; Khalili, 2017).

Diante do exposto e a partir dos possíveis mecanismos terapêuticos proveniente dos compostos [8]-gingerol e MSM, somando a isso a existência de poucos estudos que relatem sua ação nefroprotetora, aqui é proposto investigar os possíveis efeitos de tais compostos na lesão renal causada pelo tratamento com VCM.

2 JUSTIFICATIVA

A VCM é um antibiótico que tem sido amplamente utilizado nos últimos anos nos ambientes hospitalares no tratamento de infecções graves e isso vem ocasionando e proporcionando o aumento de duração da antibióticoterapia e o uso de doses maiores. A sua utilização está associada com efeito adverso de nefrotoxicidade, com ocorrência relativamente significativa entre os pacientes, com incidência entre 5% e 43%, constituindo assim uma principal questão clínica de insuficiência renal (Takigawa et al., 2017; Rhodes et al., 2017; Kim et al., 2021; Kan et al., 2022).

Diante deste fato, surge à base para pesquisa de novas terapias alternativas que possam promover efeitos que amenizem ou evitem complicações provenientes dos eventos adversos renais ocasionados pelo tratamento com a VCM e/ou outros fármacos.

Estudos realizados com o extrato de gengibre ou com seus compostos isolados têm demonstrado a capacidade de proteção sobre a função renal em modelos experimentais (nefrotoxicidade por fármacos e dano renal por isquemia-reperfusão) (Khuad et al., 2006; Uz et al., 2009). Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que a fração enriquecida com os compostos gingeróis apresentou proteção e efeito antioxidante e anti-inflamatório na função renal diante do dano causado na nefrotoxicidade por gentamicina (Rodrigues et al., 2014). Foi demonstrado que o tratamento com os compostos [6]- e [10]-gingerol reverteu os danos lesivos renais no modelo de sepse e aumentou a excreção de metilsulfonilmetano (MSM) (Rodrigues et al., 2018).

E recentemente foi proposto que [8]- e [10]-gingerol atenuaram os danos urotelial na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, apresentando propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias mediante a estimulação da expressão de IL-10 via de sinalização JAK/STAT/FOXO (Ferreira et al., 2023) E que o MSM melhorou a viabilidade celular de HK-2 frente à lesão por VCM in vitro, reduzindo o estresse oxidativo celular, apoptose e necrose, podendo está relacionado com a sinalização das vias Nrf-2/Keap-1 e RAF-1/PPAR- γ (Rodrigues, 2022).

Diante do exposto, e no intuito de descobrir alternativas que venham favorecer, ou até mesmo reverter os efeitos causados pelos processos oxidantes no dano renal pelo uso da VCM, os compostos [8]-gingerol e MSM poderiam ser uma

alternativa farmacológica promissora. Vale ressaltar que os efeitos desses compostos no modelo experimental de lesão renal são escassos na literatura, o que torna relevante a pesquisa desses parâmetros. Portanto, essa pesquisa se propõe a investigar e demonstrar os possíveis efeitos nefroprotetores do [8]-gingerol e MSM no percurso da lesão renal aguda (LRA) por VCM em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial terapêutico nefroprotetor dos compostos [8]-gingerol e metilsulfonilmetano (MSM) na LRA induzida por VCM em camundongos Swiss.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o modelo de lesão renal aguda (LRA) induzida por VCM em camundongos Swiss
- Verificar os efeitos dos compostos [8]-gingerol e MSM sobre os parâmetros de função renal em camundongos submetidos ou não a LRA por VCM;
- Identificar as possíveis alterações histológicas na presença ou ausência de tratamento oral com [8]-gingerol e MSM em camundongos submetidos a LRA por VCM;
- Investigar a atividade de mieloperoxidase (MPO) na LRA por VCM em camundongos tratados ou não com o composto [8]-gingerol e MSM;
- Avaliar o perfil molecular da expressão de mRNA de biomarcadores precoces associados com o processo de lesão renal (KIM-1 e NGAL) em camundongos tratados com os compostos [8]-gingerol e MSM submetidos ou não ao dano renal por VCM;
- Verificar o possível efeito anti-inflamatório e antioxidante dos compostos [8]-gingerol e MSM sobre os marcadores moleculares de lesão inflamatória (IL-1 β , TNF α , CXCL-1, NF κ Bp65), atividade antioxidante (SOD-1, HO-1 e NrF-2) e via de sinalização SIRT-1 e STAT-3 desencadeados na LRA por VCM;

- Analisar a expressão proteica dos marcadores NF κ Bp65, IL-1 β e Janus Quinase (JNK) na lesão renal em camundongos tratados ou não com os compostos [8]-gingerol e MSM;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Comitê de Ética

Foram utilizados camundongos Swiss machos (20-25 gramas; n= 4-8 por grupo), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais ficaram mantidos em condições controladas em estantes ventiladas com ciclo claro/escuro (12/12 horas), temperatura mantida em $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e acesso a alimento e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, com o número de protocolo nº 9270120318.

4.2 Substância utilizada

O composto [8]- gingerol foi isolado conforme descrito previamente por Silva et al., (2012) e cedido gentilmente pelo Prof. Dr. James Almada da Silva da Universidade Federal de Sergipe. O Metilsulfonilmetano (MSM) e os demais produtos químicos e substâncias aqui mencionadas foram adquiridas da Sigma-Aldrich® USA ou Vetec® Brasil.

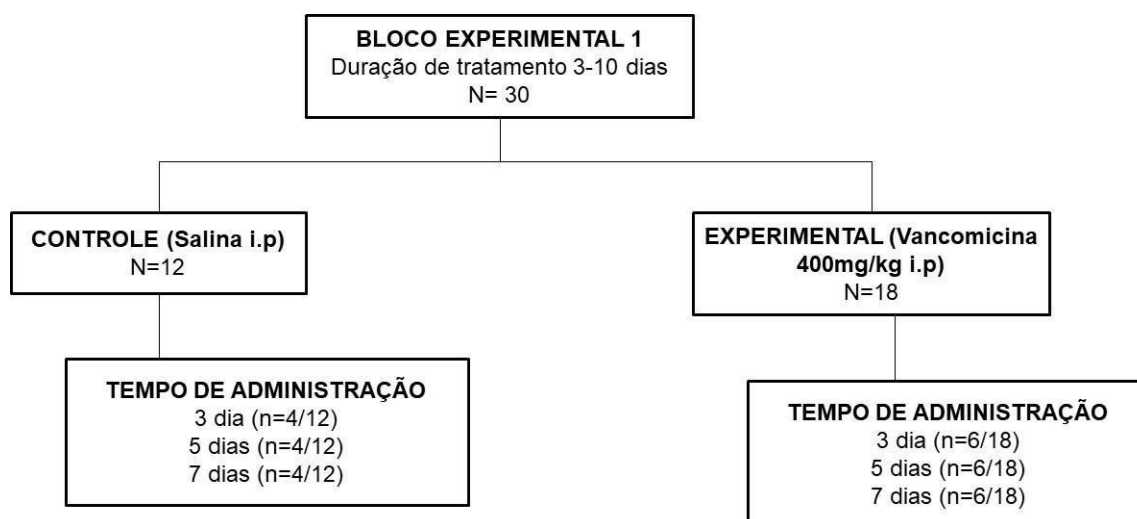
O composto [8]-gingerol foi dissolvido no Tween-80 2% em salina, para aplicação na dose de 20mg/Kg por gavagem (RODRIGUES et al, 2014; FERREIRA et al, 2023). O composto MSM foi dissolvido em solução salina 0,9% e aplicado nas doses de 500mg/Kg e 750mg/kg duas vezes ao dia por gavagem (Velusamy; Tamizhselvi, 2018).

4.3 Caracterização da indução da lesão renal aguda por vancomicina

Para a indução da LRA, os animais receberam doses diárias de vancomicina (VCM) 400mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) pelo período de 3, 5 e 7 dias em grupos distintos. O grupo controle recebeu o volume equivalente de solução salina 0.9% (0,1ml/10g de peso do animal) i.p., conforme a distribuição no

fluxograma representado na **Figura 08** (Takigawa et al., 2017; Im et al., 2017).

Figura 08 - Fluxograma de distribuição dos animais experimentais de acordo com o tempo de administração da vancomicina.



Fonte: Elaborado pelo Autor

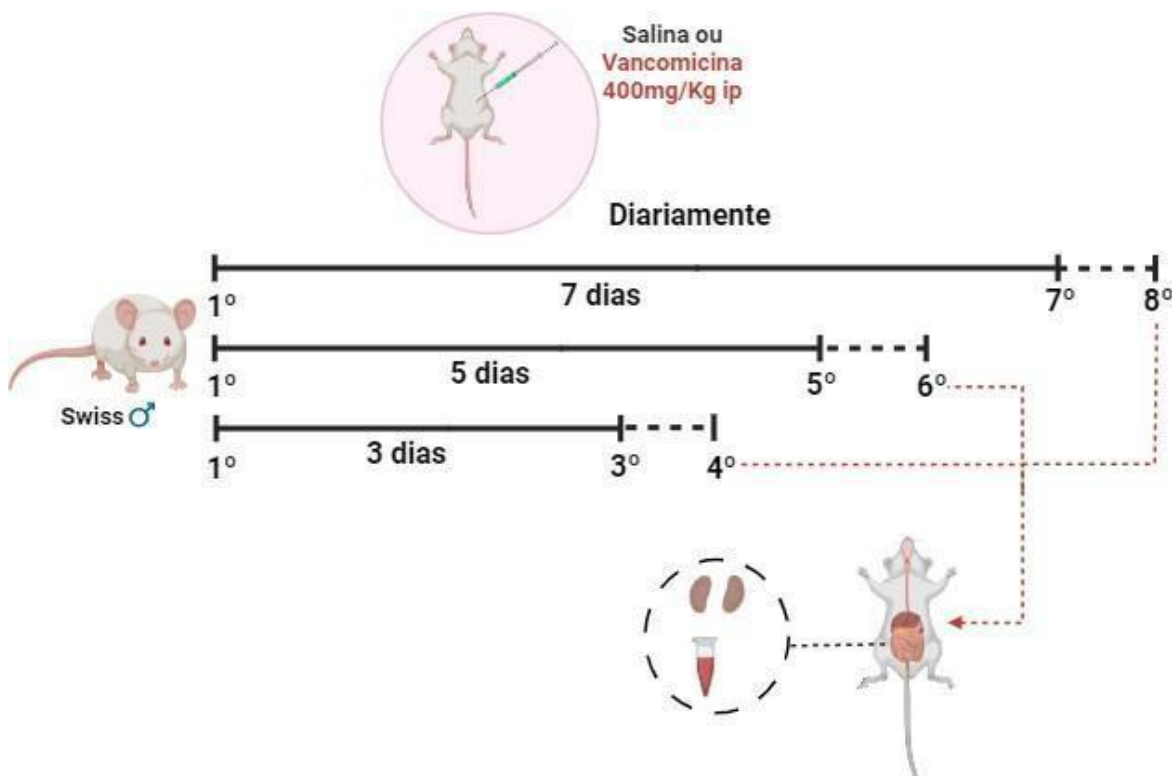
4.4 Grupos experimentais

Inicialmente realizaram-se dois blocos experimentais: primeiramente **grupo de caracterização do tempo de indução da LRA por VCM** (item 4.3) que determinou o estágio mais crítico da fisiopatogenia induzida pela VCM a ser utilizado na pesquisa. O segundo grupo experimental foi o **grupo experimental de tratamento** onde foram avaliados os efeitos nefroprotetores dos compostos [8]-gingerol e MSM perante a LRA induzida por VCM, contendo as seguintes subdivisões:

4.4.1 Padronização do tempo de indução da lesão renal aguda por vancomicina

- **Grupo Controle (CT)** – Os animais (n=4) receberam solução salina 0,9% por via intraperitoneal i.p., durante 3, 5 e 7 dias em **3 grupos** distintos.
- **Grupo Lesão (VCM)** – Os animais (n=6) foram submetidos a indução de lesão renal por VCM 400mg/Kg.dia, por via intraperitoneal (i.p), durante 3, 5 e 7 dias em **4 grupos** distintos.

Figura 09 – Desenho experimental dos grupos caracterização do tempo de indução de LRA por VCM



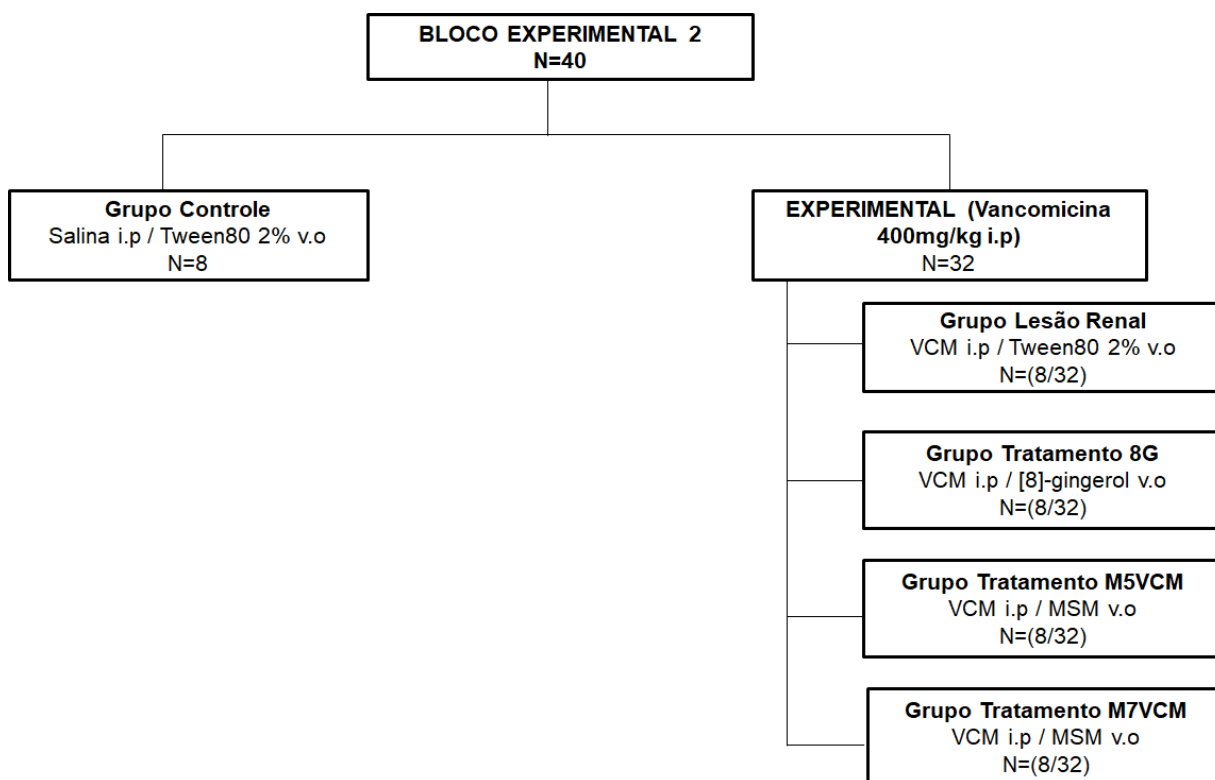
Fonte: Elaborado pelo Autor

Percorrido período experimental de indução da lesão renal, os animais foram anestesiados com ketamina 90mg/kg e xilazina 7,5 mg/kg i.p. para realização de coleta de sangue e dos rins. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em seringa de 1mL agulhada e heparinizadas. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4.500 rpm, 4°C por 5 minutos e o plasma foi imediatamente armazenado a -80 °C para posteriormente serem conduzidas aos ensaios bioquímicos (ureia e creatinina sérica). Os rins foram coletados, pesados em uma balança de precisão analítica e o rim direito foi armazenado em cassetes histológicos em formol 10% tamponado que serão posteriormente processados para análise histopatológica. O rim esquerdo foi armazenado a -80 °C para serem utilizados na determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e atividade da mieloperoxidase (MPO) e para os ensaios de expressão gênica de RNA por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.4.2 Grupo experimental tratamento

Os animais camundongos Swiss machos foram divididos em **5 grupos** (n= 8 animais) e distribuídos de forma aleatória conforme a distribuição representada no fluxograma da **Figura 10**. Todos os animais foram transferidos e mantidos individualmente em gaiolas metabólicas por período de adaptação de 3 horas diárias por 6 dias e no sétimo dia do protocolo permaneceram nas gaiolas metabólicas por 24 horas.

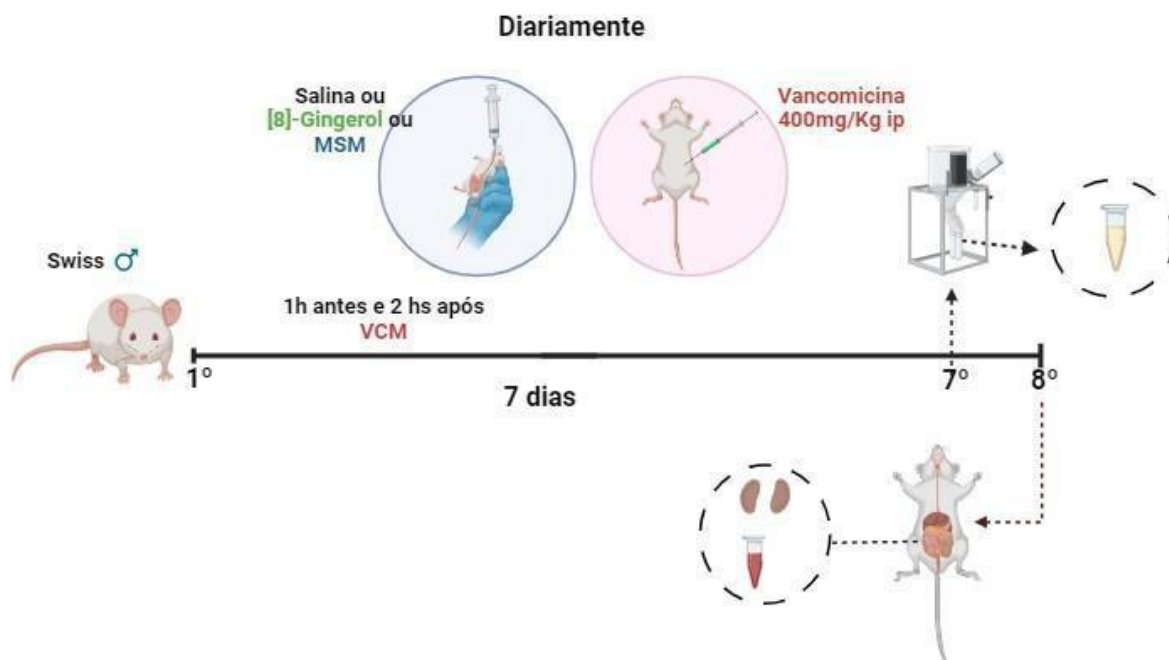
Figura 10 - Fluxograma de distribuição dos animais no bloco experimental tratamento como os compostos [8]-gingerol e Metilsulfonilmetano.



Fonte: Elaborado pelo Autor

- **Grupo Controle (CT)** – Os animais (n=8) receberam solução salina 0,9%/dia i.p. por um período de 7 dias e administração de Tween-80 2% por via oral (v.o.) duas vezes ao dia, uma hora antes e duas horas após a administração de solução salina 0,9% (i.p.) pelo mesmo período de tempo.
- **Grupo Lesão (VCM)** – Os animais (n=8) foram submetidos a indução de lesão renal por vancomicina (VCM) 400mg/Kg/dia i.p. por um período de 7 dias e receberam administração de Tween-80 2% v.o., uma hora antes e duas horas após a administração de VCM pelo mesmo período de tempo.
- **Grupo tratamento (8G+VCM)** – Os animais (n=8) foram submetidos a indução de lesão renal por VCM 400mg/Kg/dia i.p. por um período de 7 dias e receberam administração de [8]-gingerol 20mg/kg v.o. duas vezes ao dia, uma hora antes e duas horas após a administração de VCM pelo mesmo período de tempo.
- **Grupo tratamento (M5+VCM)** – Os animais (n=8) foram submetidos a indução de lesão renal por VCM 400mg/Kg/dia i.p. por um período de 7 dias e receberam administração de MSM 500mg/kg v.o. duas vezes ao dia, uma hora antes e duas horas após a administração de VCM pelo mesmo período de tempo.
- **Grupo tratamento (M7+VCM)** – Os animais (n=8) foram submetidos a indução de lesão renal por VCM 400mg/Kg/dia i.p. por um período de 7 dias e receberam administração de MSM 750mg/kg v.o. duas vezes ao dia, uma hora antes e duas horas após a administração de VCM pelo mesmo período de tempo.

Figura 11 – Desenho experimental dos grupos tratamento como os compostos [8]-gingerol e Metilsulfonilmetano (MSM) na lesão renal por VCM



Fonte: Elaborado pelo Autor

Percorrido período experimental de indução da lesão renal, e realizado a coleta das amostras de urina em 24 horas, os animais foram anestesiados com ketamina 90mg/kg e xilazina 7,5 mg/kg i.p. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em seringa de 1mL agulhada e heparinizadas. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4.500 rpm, 4°C por 5 minutos e o plasma foi imediatamente armazenado a -80 °C para posteriormente serem conduzidas aos ensaios bioquímicos. Os rins foram coletados, pesados em uma balança de precisão analítica e o rim direito foi armazenado em cassetes histológicos em formol 10% tamponado que serão posteriormente processados para análise histopatológica. O rim esquerdo foi armazenado a -80 °C para serem utilizados na determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e atividade da mieloperoxidase (MPO) e para os ensaios de expressão gênica de RNA por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.5 Análise da Função Renal

4.5.1 Marcadores bioquímicos de Função Renal.

A mensuração da creatinina plasmática e urinária foi realizada por meio do método de Jaffé modificado, utilizando o kit comercial Creatinina K® do fornecedor Labtest®. A função renal dos animais foi avaliada pela estimativa da Taxa Filtração Glomerular (TFG) pelo *clearance* de creatinina (Clcr), calculado por meio da seguinte forma (Yamabe et al., 2007):

$$\text{Clcr} = (\text{crU} \times \text{Vu} / \text{crP}) \times (1/1440)$$

Onde:

crU = concentração urinária creatinina (mg/dL); **Vu** = volume urinário (mL);

crP = concentração plasmática de creatinina (mg/dL). Os valores do **Clcr** serão expressos em **mL/min/g**

Para as dosagens de ureia plasmática e proteína urinária foram utilizados os kits Ureia CE e SensiProt. Todos esses kits serão fornecidos comercialmente pelo fabricante Labtest®. Os protocolos de diagnóstico seguiram as recomendações do fabricante e os resultados foram expressos em mg/dL e mg/24h.

4.6 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO foi avaliada como um marcador bioquímico da infiltração neutrofílica. Enzima essa presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e outras células da origem mielóide. Amostras de rim foram homogeneizadas com brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% (HTAB; pH 6,0) em tampão de fosfato de potássio para preparar um homogenato a 10%. O homogeneizado foi centrifugado a 5000 rpm por 7 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da MPO foi aferida utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1% como substrato para essa enzima. Durante o ensaio, à medida que o H₂O₂ é degradado, ocorrerá a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom (Bradley et al., 1982). Os resultados serão expressos em unidades de MPO por miligramas (UMPO/mg) de tecido.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante

4.7.1 Avaliação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

O princípio do teste consiste na utilização do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)), usado para analisar a atividade da glutathiona reduzida (GSH) em amostra de tecidos. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-mercaptopbenzoico (TNB), de cor amarela, que pode ser detectado por espectrofotometria (Sedlak; Lindsay, 1968).

Para avaliação das alterações no conteúdo tecidual de glutathiona reduzida foi feito um homogenato a 10% em solução gelada de EDTA 0,02 M. Foi utilizado 40 µL de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato), que foi adicionado 160 µL de água destilada e 40 µL de TCA (ácido tricloroacético) 50%. O material foi centrifugado a 3000g por 15 min e retirado 200 µL do sobrenadante, ao qual adicionou 400 µL de tampão TRIS 0,4M (pH=8,9) e 10 µL de DTNB 0,01M. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg). Todo o ensaio foi avaliado na absorbância de 412nm e os resultados expressos em µg/mg de tecido.

4.8 Avaliação dos marcadores inflamatórios, antioxidante e de lesão renal por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

4.8.1 Extração do RNA Total

Foi realizado um homogenato com trizol (Sigma Aldrich® EUA), onde cada tecido foi exposto em contato com uma esfera de metal estéril e macerado no equipamento Tissue lyzer LT (Qiagen®, EUA) e em seguida centrifugado a 4°C a 12000G por 15 min. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 uL de Clorofórmio (Sigma Aldrich® EUA), homogeneizou-se no vortex por 15 seg e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 12000G por 15 min. Em seguida separou cuidadosamente o sobrenadante transparente (contém o RNA) em um novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 500 uL de isopropanol ao sobrenadante, vortexou-se e centrifugou-se a 4°C a 12.000G por 20 min. Após a centrifugação observa-se um precipitado de RNA. Este

precipitado foi lavado com 1mL de álcool etílico a 75%, vortexou-se por 15 seg e centrifugado a 7.500G a 4°C por 5 min. Este processo foi repetido 3 vezes. Após a finalização do processo de extração, 1µL de RNA total de cada amostra foi quantificada no Nanodrop (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA) e no Fluorímetro Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA) com a finalidade de verificar qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

4.8.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA será realizada com o GoScript cDNA Synthesis Kit (Promega®, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo da reação conterá 2 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do GoScript Reaction Buffer (solução constituída de oligonucleotídeos tampão salino e oligo dT), um volume da amostra de RNA uniformizado para 500ng/µL e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para completar 20µL. O protocolo padrão do termociclador Veriti Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, EUA) a 25°C por 5 min., 42°C por 60 min., e 70°C por 15 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até sua amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

4.8.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

De acordo com os resultados obtidos a partir dos experimentos in vivo delinearemos o estudo molecular da expressão dos RNAs relacionados com biomarcadores de lesão renal (KIM-1, NGAL), processo inflamatório (IL-1β, TNFα, CXCL-1 e NFκB) e atividade antioxidante (SOD, HO-1 e Nfr2). Na **Tabela 03** mostra a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de DNA (*primers*) dos genes investigados, obtida na plataforma eletrônica *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), e as condições de anelamento para cada gene investigado.

Tabela 03 - Sequência de iniciadores de PCR para os genes avaliados.

Genes	Sequência de iniciadores		Finalidade
KIM-1	S- AS-	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT TCAGCTCGGGAATGCACAA	Biomarcador precoce de Lesão renal
NGAL	S- AS-	ATTGTCACCTCCATCCTGGT ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC	
IL-1 β	S- AS-	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG GATCCACACTCTCCAGCTGCA	Marcador de processo inflamatório
TNF α	S- AS-	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	
CXCL-1	S- AS-	GCTGGGATTACCTCAAGAA TGGGGACACCTTTTAGCATC	
NF κ Bp65	S- AS-	AGGCTTCTGGGCCTTATGTG TGCTTCTCTCGCCAGGAATAC	
SOD-1	S- AS-	GGACAATACACAAGGCTGTACC CAGTCACATTGCCAGGTCTC	Marcador de atividade antioxidante
HO-1	S- AS-	GCCACCAAGGAGGTACACAT GCTTGTTGCGCTCTATCTCC	
NrF-2	S- AS-	ATCTCCTAGTTCTCCGCTGCT CTCCAAGTCCATCATGCTGAGG	
SIRT-1	S- AS-	ACTGGAGCTGGGGTTTCT CTTGAGGGTCTGGGAGGT	Marcador de atividade antioxidante e anti-inflamatório
STAT-3	S- AS-	CACCTTGGATTGAGAGTCAAGAC AGGAATCGGCTATATATTGCTGGT	Via de sinalização
GADPH	S- AS-	TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	Gene de referência

Fonte: Elaborado pelo Autor

Nota: KIM-1: molécula de injúria renal-1; NGAL: IL-1 β ; TNF α CxCL-1: ligante de quimiocina 1; NF- κ Bp65: fator nuclear κ B; SOD-1: Superóxido dismutase-1; HO-1: heme oxigenase-1; NrF-2: fator nuclear eritróide-2; SIRT-1: sirtuína-1; STAT-3: ; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. S – iniciador senso (5'-3') e AS – iniciador anti-senso (3'-5').

Para a reação foram utilizados 7,5 μ L de GoTaq qPCR Master Mix (Promega®, Wisconsin, EUA), 1,0 μ L de cada iniciador (0,8 nM) e 1,0 μ L de cDNA das amostras, completando com água livre de nuclease até um volume final de 15 μ L. Inicialmente a enzima foi ativada por um período de 2 min. a 95°C. Transcorridos todos os ciclos previstos, cada marcador teve uma etapa de desnaturação por 15 seg a 95°C seguido por um passo de anelamento e extensão por 1 min a 60°C. Todas as amplificações foram avaliadas quanto à curva de fusão, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a não formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico. Para tanto a

temperatura foi acrescida em 0,5°C a cada 5 seg iniciando em 60°C até 95°C Os dados foram obtidos com o software do sistema Quant Studio5 (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, EUA) e foram baseados nos valores do ciclo de limiar, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft®, EUA) e os níveis relativo de RNAm serão calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$, qual como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

4.9 Expressão proteica de NFκB, IL-1β, JNK por *Western Blotting*

A avaliação da expressão protéica de NFκB, IL-1β e JNK no tecido renal foi realizado pela técnica de *Western Blotting*. As amostras de tecido renal dos animais (aproximadamente 30mg) juntamente com 200 µl de tampão RIPA (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton 1%) foram macerados com auxílio do Tissue lyzer LT (Qiagen®, EUA) e centrifugado a 1500G por 10min. Os sobrenadantes foram separados em tubos devidamente identificados. A quantidade total de proteínas de cada amostra foi mensurada utilizando-se o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, EUA) com uma curva de BSA de 7 pontos (1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL). Os volumes foram ajustados para que as quantidades de proteínas fossem equivalentes em cada amostra para, então, separar as proteínas por eletroforese num gel SDS-PAGE.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas, por eletroforese, para uma membrana de nitrocelulose durante 2h a 100V. Seguida a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de BSA (do inglês, Bovine Serum Albumin) a 5% em tampão TBS-T (Tris-NaCl com 1% de Tween 20) por 1 h sob agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas 4 vezes, cada lavagem com 5 minutos de duração, utilizando o tampão TBS-T. Os anticorpos primários NFκB, IL-1β e JNK (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) ou (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foram diluídos em solução BSA 5% na proporção de 1:200, e deixados em contato com a membrana sobre refrigeração e agitação branda durante todo o período noturno (over night).

Seguidas 16-18h, as membranas foram novamente lavadas (4-5 vezes

por 5 min cada) e foram incubadas com anticorpos secundários, diluídos em BSA a 5% na proporção 1:1000, durante 1,5 horas sob agitação. Após esse período uma nova lavagem (4-5 vezes por 5 min cada) foi realizada e as marcações foram reveladas utilizando o Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) no transluminador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA). As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ versão 1.5a (National Institutes of Health, EUA) e exportadas para uma planilha no Microsoft Excel® versão 15/Office 2013 (Redmond, Washington, USA). A intensidade das bandas das proteínas alvos foram divididos pela intensidade das bandas de GADPH para normalização.

4.10 Análise histopatológica

Os tecidos renais (rim direito) dos animais foram seccionados transversalmente e uma quantidade foi armazenada em cassetes histológicos e em formol 10% tamponado. Posteriormente as amostras foram processadas para realização do exame histológico em processador automático de tecidos (histotécnico). Logo após foram desidratadas em álcool em concentrações crescentes de 70 a 100%. Após o processamento, utilizando o banho histológico, os blocos de parafina foram cortados em 5 µm de espessura, utilizando um micrótomo de impacto. O material foi colocado em lâminas histológicas para coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas segundo o trabalho de Kuhad e colaboradores (2006), com algumas adaptações.

Foram feitas análises dos escores onde foram avaliados os seguintes critérios: perda de borda em escova, edema intersticial, dilatação tubular, necrose epitelial, elencos hialinos e infiltração de células inflamatórias. Para cada critério foi dado um escore para a gravidade do dano: nenhum dano (0), leve (1), moderado (2), grave (3) e severo (4). As lâminas foram analisadas em microscopia óptica convencional e a avaliadas por histopatologista habilitado. A análise histopatológica foi realizada pelo Profº. Dr. Mario Rogério Lima Mota, sendo posteriormente registradas através de fotomicrografias.

4.11 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e identificação de metabólitos plasmáticos

4.11.1 Espectros de RMN e identificação dos metabólitos

As amostras (plasmas) foram preparadas em tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{D}_2\text{O} + \text{TSP NaN}_3$) ($\text{pH} = 7,4$) na proporção 1:1 em tubos de RMN de 5 mm para análise. Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados em um espectrômetro Bruker DRX 500 NMR (11,7 T; 500,13 MHz; Bruker BioSpin Ltd, Fällanden, Suíça) equipado com uma sonda de observação de banda larga BBO de 5 mm ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) a 300 K. Os dados foram analisados em triplicata com a sequência de pulso de espectroscopia de realce de *Overhauser Nuclear Unidimensional* (NOESY) com pré-saturação (noesypr1d) e o sinal do solvente aquoso foi suprimido por irradiação durante o tempo de saturação. Para aquisição dos espectros foram utilizadas largura de pulso calibrada em 90° (10,02 μs), 16 varreduras, 100k pontos no domínio do tempo com uma janela espectral de 20,0 ppm, tempo de aquisição de 5,0 s, tempo de recuperação de 22,0 s e valor de ganho do receptor predefinido de 8. Os espectros foram processados pela aplicação de multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz e transformação de Fourier de 64k pontos. A correção de fase foi realizada manualmente e a correção de linha de base foi aplicada em toda a faixa espectral. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm (Alves Filho et al., 2018). Os experimentos de RMN bidimensionais foram realizados utilizando sequências de pulso padrão da biblioteca do espectrômetro. Os experimentos ^1H - ^1H gCOSY foram obtidos utilizando largura espectral de 9.615,4 Hz em ambas as dimensões; matriz de dados 1442×200 ; 16 scans por incremento t1 e tempo de recuperação de 1,0 s. Os espectros dos experimentos ^1H - ^{13}C gHSQC foram adquiridos com um tempo de evolução de 3,425 ms (tempo de transferência) para uma constante de acoplamento $^1J(\text{C},\text{H})$ de 146 Hz; matriz de dados 1442×200 ; 48 scans por incremento t1; larguras espectrais de 9.615,4 Hz em f2 e 30.154,5 Hz em f1 e tempo de recuperação de 1,0 s. Os experimentos ^1H - ^{13}C gHMBC foram registrados com um tempo de evolução de 62,5 ms para constante de acoplamento $^{\text{LR}}J(\text{C},\text{H})$ de 8 Hz; matriz de dados 1442×200 ; 96 scans por incremento t1; larguras espectrais de 9.615,4 Hz em f2 e 36.182,7 Hz em f1 e tempo de recuperação de 1,0s.

4.11.1.1 Análise Quimiométrica

Os dados da RMN de ^1H foi composto pelo plasma sanguíneo de amostras de camundongos controle (sem efeito da vancomicina) após 3, 5 e 7 dias, e camundongos sob efeito da vancomicina durante 3, 5 e 7 dias de lesão, todos os espectros adquiridos em triplicata experimental, totalizando 90 espectros. Portanto, para destacar entre os marcadores compostos relacionados ao efeito da vancomicina na composição do plasma sanguíneo de camundongos, foi desenvolvida uma análise quimiométrica supervisionada por *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) considerando o estágio de tratamento com vancomicina como variável categórica (3, 5 e 7 dias). Para avaliação quimiométrica, foi construída uma matriz numérica através da conversão dos espectros da RMN de ^1H em arquivos *American Standard Code for Information Interchange* (ASCII) e importada pelo programa Origin™ 9.4. Em seguida, foram extraídas quatro submatrizes da matriz original: 3, 5 e 7 dias de experimento com e sem o uso da vancomicina; e contendo apenas amostras sob uso da vancomicina durante 3, 5 e 7 dias. Essas matrizes foram exportadas individualmente para modelagem de classificação multivariada por PLS-DA usando o software PLS Toolbox (versão 8.6.2 - Eigenvector Research Inc., Manson, WA USA). Foram aplicados nas variáveis as seguintes correções: algoritmos para correção de linha de base, alinhamento de variáveis usando COW (*Correlation Optimized Warping*) com segmento de 50 pontos de dados e slack de 5 pontos de dados, além da normalização de sinal para área (Alves Filhos et al., 2018). Os dados das amostras foram centralizados na média e o algoritmo SIMPLS (Simplified PLS) foi aplicado para decompor as matrizes em scores, loadings, erros, influência das amostras na modelagem e figuras de mérito. O “método de persianas venezianas” (10 divisões e espessura cega igual a 1) foi aplicado na modelagem de validação cruzada (CV) com nível de confiança de 95%. O número de Variáveis Latentes (LV) foi selecionado de acordo com os erros de modelagem obtidos por RMSEC (Erro Quadrático Médio de Calibração) e RMSECV (Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada), valores de viés e viés CV, bem como a seletividade de modelagem (Verdadeiro Positivo), especificidade (Verdadeiro Negativo), Taxa de Falsos Positivos e Taxa de Falsos Negativos obtidos pela análise da Matriz de Confusão (Wise et al., 2007; Kjeldahl; Bro, 2010; Bevilacqua et al., 2017).

4.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPadPrism®, versão 5.0. Os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Foi realizado o teste de múltiplas comparações por meio de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de *Bonferroni* (dados paramétricos) ou aplicação do teste *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de Dunn (dados não paramétricos). E os dados de qPCR serão analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. Os resultados serão expressos como média $\pm$ erro padrão médio (E.P.M) ou valor mediano, máximo e mínimo. Os resultados serão considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do tempo de indução de lesão renal aguda por vancomicina

Primeiramente realizou-se um protocolo experimental para definir o tempo de indução que demonstrasse o estágio mais crítico da fisiopatologia de lesão renal aguda (LRA) induzida pela vancomicina (VCM) na dose 400mg/kg/dia a ser utilizado na pesquisa, principalmente nas cepas de animais provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC. Para isso foram analisados 3 (três) tempos de indução (3, 5 e 7 dias), que correspondem ao número de administrações diárias que os animais foram submetidos. Os resultados a seguir apresentam os dados encontrados que justificam a escolha do tempo de indução utilizado no grupo experimental tratamento com [8]-gingerol (8G) e metilsulfonilmetano (MSM).

5.1.1 Vancomicina aumenta o Peso renal na indução da LRA em camundongos Swiss

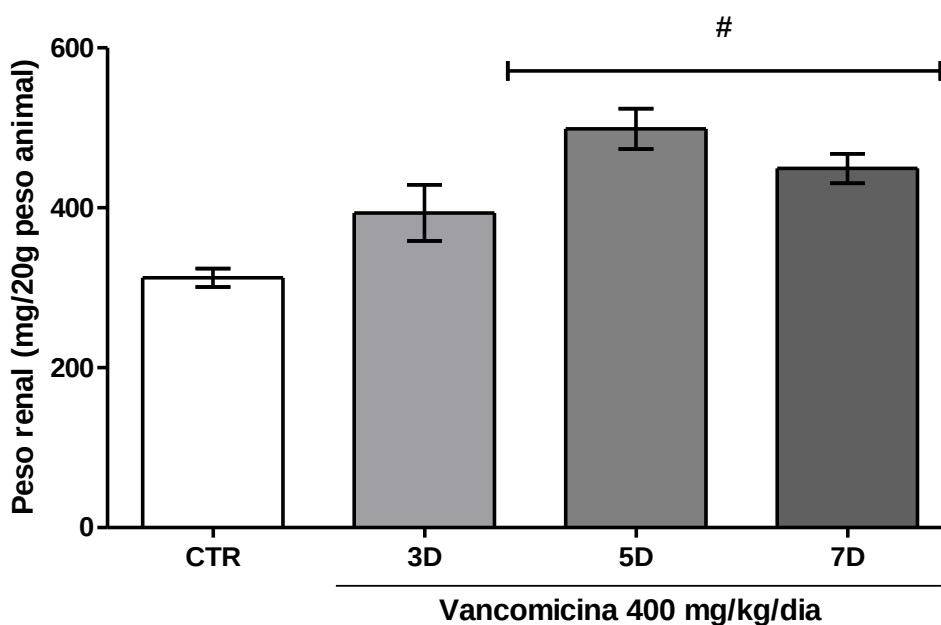
A administração intraperitoneal de VCM aumentou significativamente o peso renal dos animais que receberam indução por 5 dias ($498,7 \pm 25,24$ mg/20g de peso animal) e 7 dias ($449,1 \pm 18,32$ mg/20g de peso animal) quando comparados ao grupo CTR ($312,4 \pm 11,46$ mg/20g de peso animal) representando assim um aumento de 59,63% e 43,75% respectivamente. Contudo, no tempo de 3 dias ($393,7 \pm 25,24$ mg/20g de peso animal) não foi observado esse aumento significativo, conforme demonstrado na **Figura 12**.

5.1.2 Vancomicina altera os parâmetros bioquímicos plasmáticos renais na indução da LRA em camundongos Swiss

Ao analisar os parâmetros bioquímicos renais (creatinina e ureia plasmática), observou-se que a administração de VCM foi capaz de aumentar suas concentrações nos períodos avaliados. Na **Figura 13A** observa-se que VCM aumentou as concentrações de creatinina nos tempos de indução de 5 dias ($0,46 \pm$

0,04 mg/dL) e 7 dias ($0,54 \pm 0,09$ mg/dL) significativamente em relação ao grupo CTR ($0,22 \pm 0,01$ mg/dL), o que não se observou no grupo de 3 dias ($0,40 \pm 0,03$ mg/dL). Já a ureia plasmática, conforme demonstrado na **Figura 13B**, apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) nos três tempos de indução: 3 dias ($81,71 \pm 16,72$ mg/dL), 5 dias ($110,7 \pm 10,07$ mg/dL) e 7 dias ($110,4 \pm 8,87$ mg/dL) em relação ao CTR ($40,44 \pm 2,62$ mg/dL).

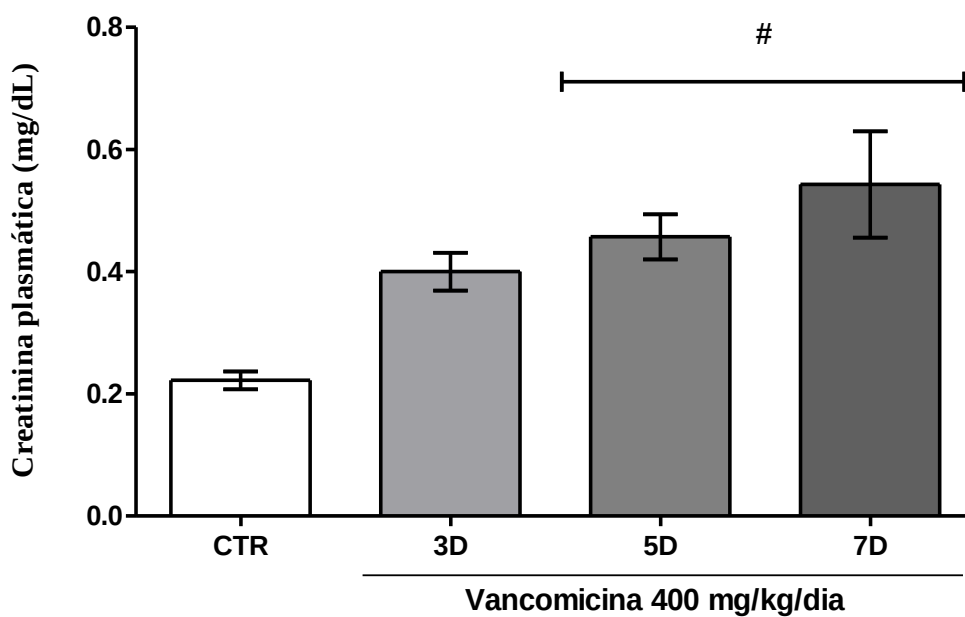
Figura 12 - Administração de Vancomicina aumenta o peso renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss



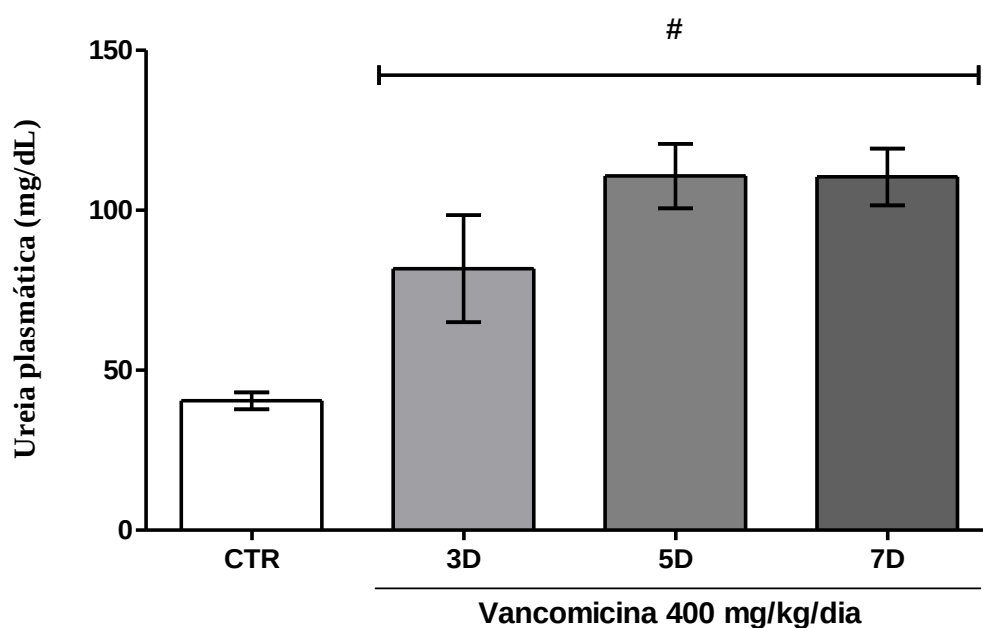
Os valores representam o peso renal na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. # $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni's.

Figura 13 - Administração de Vancomicina aumenta os níveis plasmáticos de Creatinina e Ureia na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss

A.



B.

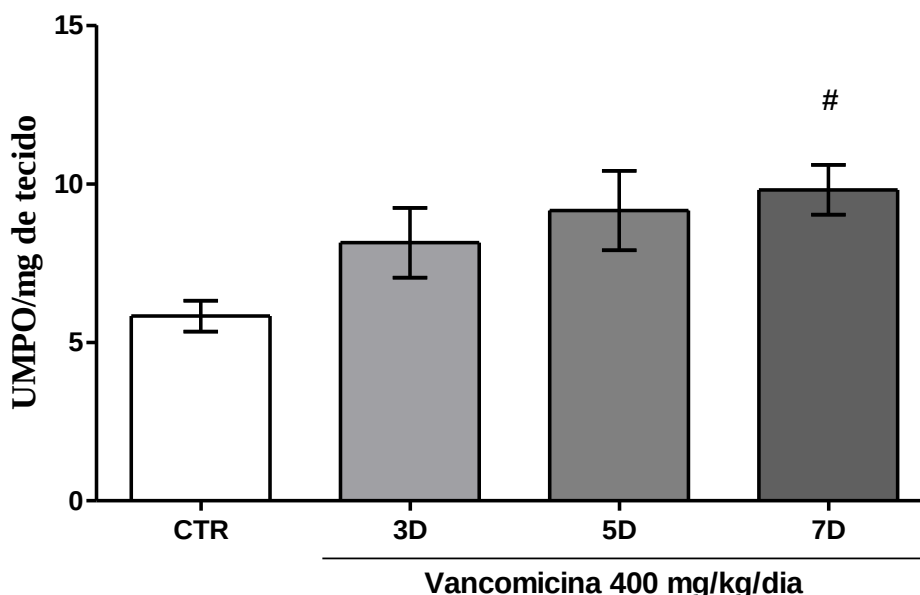


Os valores representam o aumento dos níveis plasmático de creatinina (A) e ureia (B) na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. #P < 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

5.1.3 Vancomicina altera os níveis de Mieloperoxidase (MPO) e Glutathiona reduzida (GSH) renais na indução da LRA em camundongos Swiss

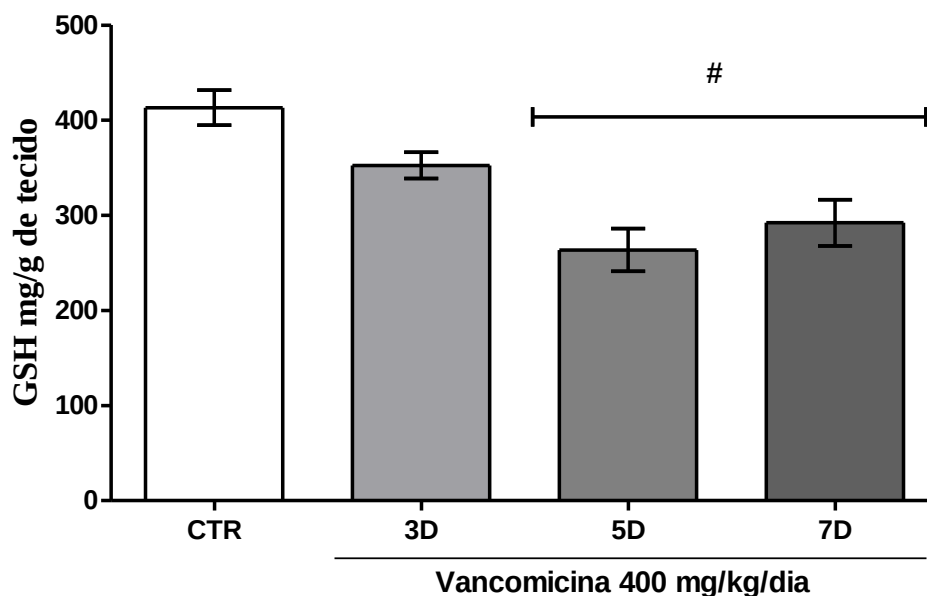
A **Figura 14** apresenta os efeitos da VCM na atividade de MPO no percurso do tempo de indução da LRA. Pode-se perceber que os tempos de 3 dias ($8,14 \pm 1,10$ UMPO/mg de tecido) e 5 dias ($9,16 \pm 1,25$ UMPO/mg de tecido) não alteraram significativamente a atividade de MPO, mas somente o tempo de indução de 7 dias ($9,81 \pm 0,79$ UMPO/mg de tecido) foi capaz de alterar os níveis de MPO em comparação ao grupo CTR ($5,83 \pm 0,49$ UMPO/mg de tecido). Ao analisar a atividade de GSH, verificou-se que os tempos de 5 dias ($263,6 \pm 22,54$ mg/g de tecido) e 7 dias ($292,2 \pm 24,34$ mg/g de tecido) foram capazes de reduzir de forma significativa a atividade de GSH em relação ao CTR ($413,2 \pm 18,48$ mg/g de tecido) (**Figura 15**).

Figura 14 - Administração de Vancomicina aumenta a atividade de MPO no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss



Os valores representam a atividade de MPO na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

Figura 15 - Administração de Vancomicina atenua a atividade de GSH no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss



Os valores representam a atividade de GSH na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

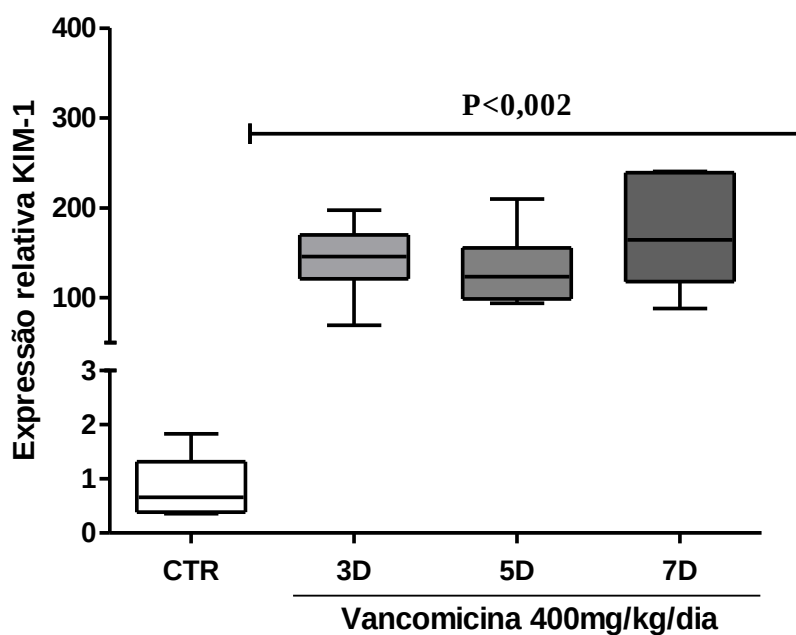
5.1.4 Vancomicina modula a expressão gênica de marcadores precoces de lesão renal, inflamatório e antioxidante na indução da LRA em camundongos Swiss

Ao realizar a expressão gênica da molécula de injúria renal (KIM-1), um marcador precoce de LRA, verificou-se que a administração de VCM foi capaz de aumentar sua expressão nos três períodos de indução de LRA de forma significativa, conforme apresentado na **Figura 16A**: 3 dias [145,8 (69,3-197,4)], 5 dias [123,4 (93,93-209,9)] e 7 dias [164,5 (8816-240,4)] em relação ao CTR [0,66 (0,36-1,83)].

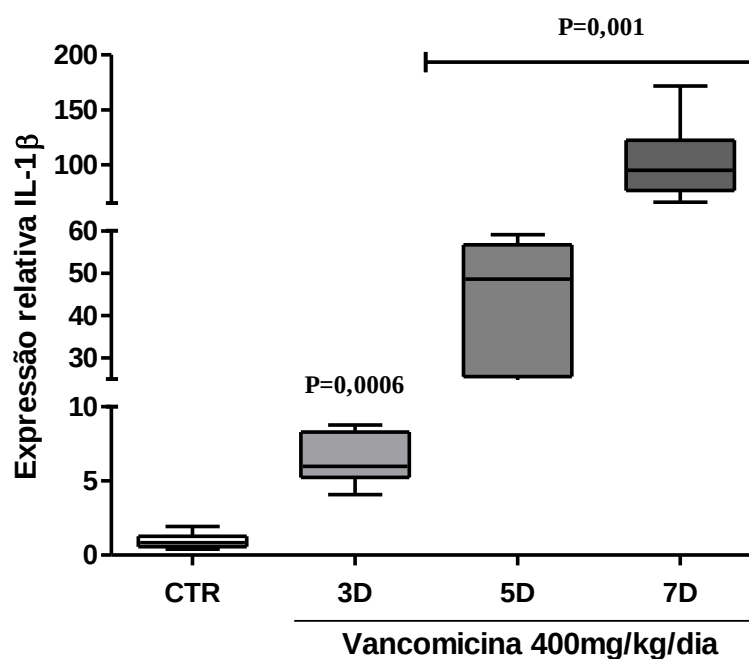
A **Figura 16B** demonstra que VCM aumentou significativamente a expressão de Interleucina-1 β (IL-1 β) nos tempos de indução de LRA de 3 dia [5,98 (4,07-8,77)], 5 dias [48,64 (24,57-59,11)] e 7 dias [95,02 (66,08-171,6)] quando comparados ao grupo CTR [0,83 (0,40-1,95)].

Figura 16 - Administração de Vancomicina aumenta a expressão gênica da KIM-1 e IL-1 β no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos *Swiss*

A



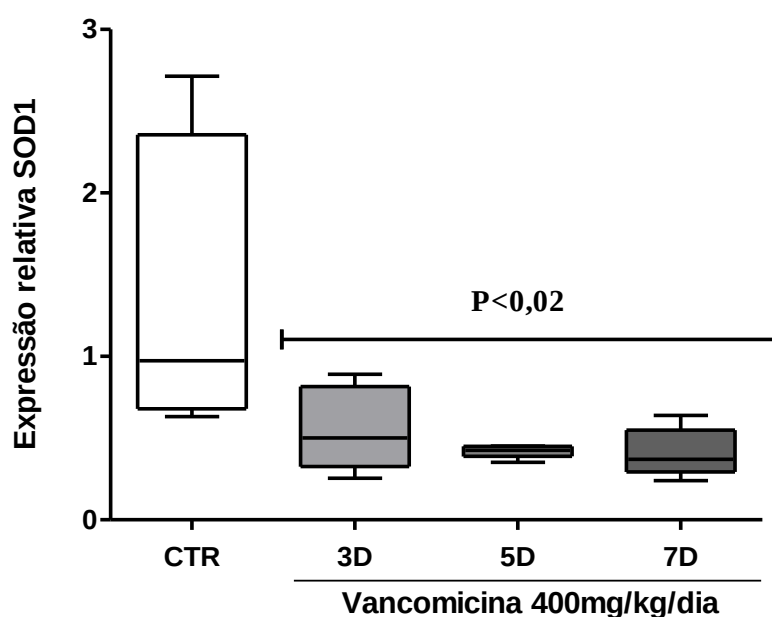
B



Os valores representam a expressão gênica de KIM-1 (A) e IL-1 β (B) na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

A **Figura 17** mostra que a expressão gênica de superóxido dismutase (SOD-1) foi diminuída pela indução de VCM nos três períodos de tempos analisados: 3 dias [0,50 (0,25-0,89)], 5 dias [0,43 (0,35-0,45)] e 7 dias [0,37 (0,24-0,64)] versus ao grupo CTR [0,97 (0,63-2,71)].

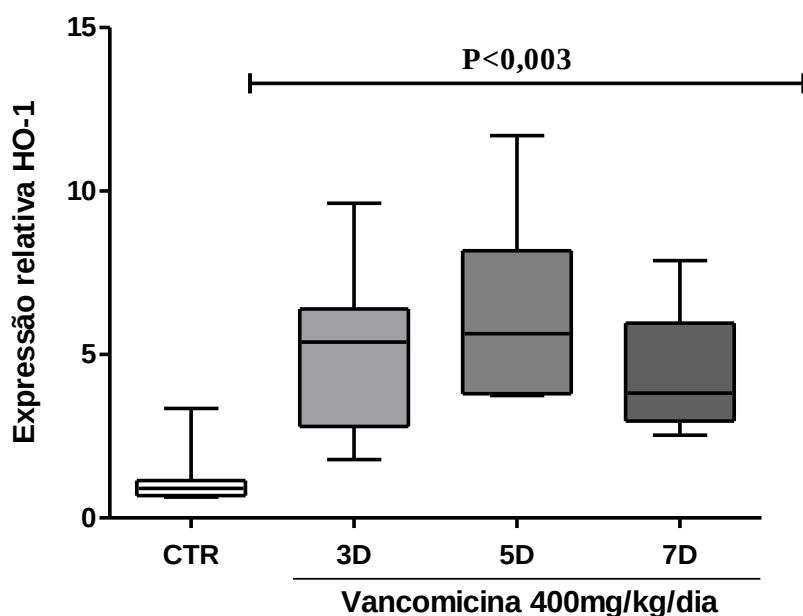
Figura 17 - Administração de Vancomicina atenua a expressão gênica de SOD-1 no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss.



Os valores representam a expressão gênica de SOD-1 na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Ao avaliar a expressão gênica da hemoxigenase-1 (HO-1), foi observado que a administração de VCM foi capaz de aumentar de forma significativa a sua expressão nos períodos de indução: 3 dias [5,38 (1,79-9,63)], 5 dias [5,64 (3,74-11,7)] e 7 dias [3,82 (2,54-7,87)] quando comparados ao CTR [0,87 (0,64-1,17)] conforme mostrado na **Figura 18**.

Figura 18 - Administração de Vancomicina aumentou a expressão gênica de HO-1 no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss

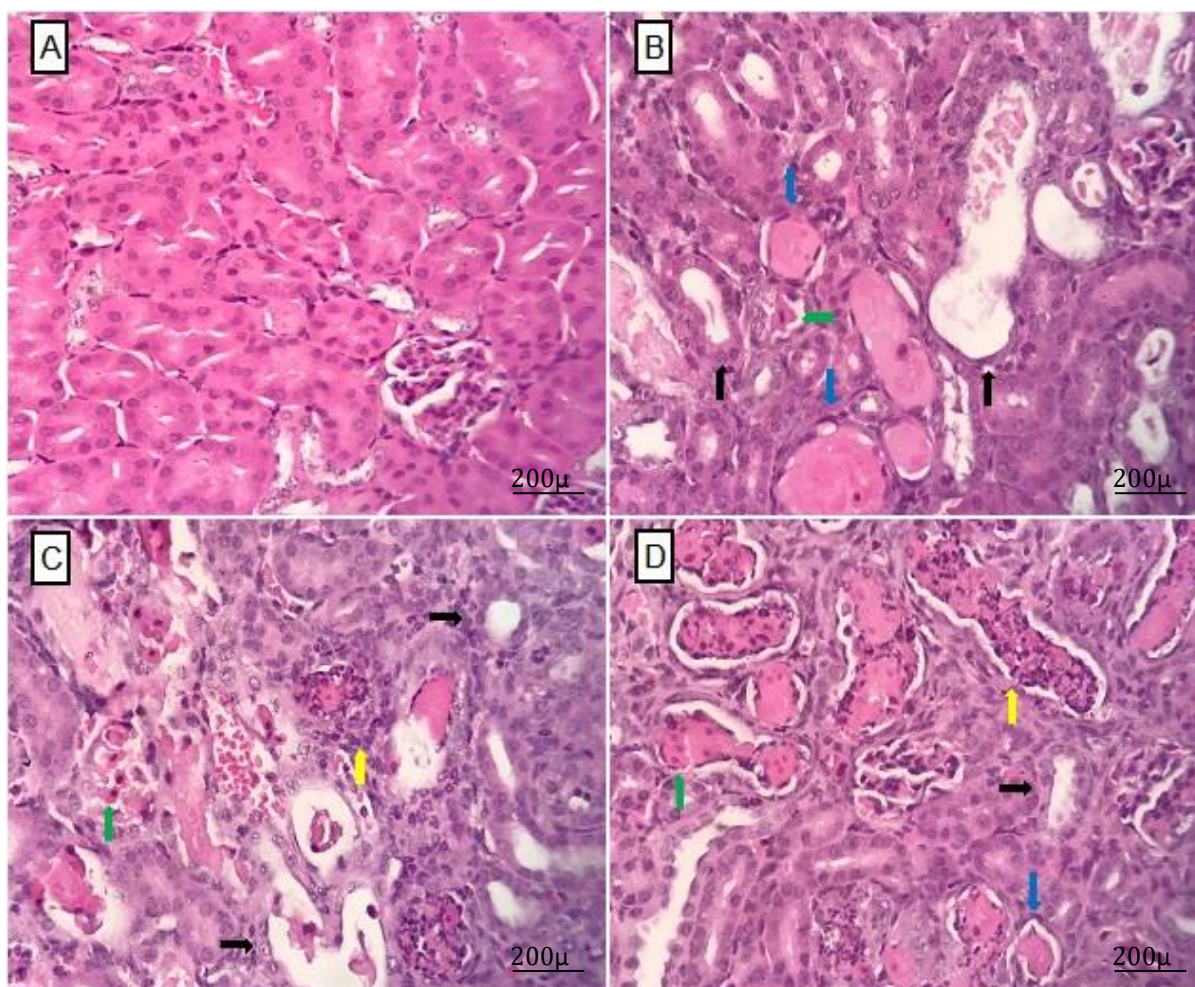


Os valores representam a expressão gênica de HO-1 na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

5.1.5 Vancomicina altera as estruturas histológicas na indução da LRA em camundongos Swiss

A avaliação histopatológica foi realizada com base nos seguintes escores: ausente (0), leve (1), moderado (2), grave (3) e severo (4) como demonstrado na **Tabela 04**. Foi possível observar que o grupo controle (**Figura 19A**) não apresentou alterações estruturais. O tempo de indução de 3 dias apresentou alterações de moderadas/grave, mas de forma não significativa em comparação ao grupo controle (**Figura 19B**). Já os períodos de 5 e 7 dias apresentam alterações histológicas semelhantes de grave a severo (**Figura 19C e D**).

Figura 19 - Administração de Vancomicina altera as análises histopatológicas no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss



As figuras expressam a morfologia dos tecidos representativos dos seguintes grupos: **A (Salina)**, **B (VCM 3 dias)**, **C (VCM 5 dias)** e **D (VCM 7 dias)**. Dilatação tubular (Seta preta); Necrose de células epiteliais (seta verde), elencos hialinos (seta azul), infiltrado inflamatório (seta amarela)

Tabela 04 - Administração de Vancomicina altera as estruturas histológicas no tecido renal na caracterização do tempo de indução da LRA em camundongos Swiss

Grupo	Perda de borda	Edema intersticial	Dilatação tubular	Necrose epitelial	Infiltrado inflamatório	Cilindros Hialinos
Controle	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)
VCM 3D	2 (2-3)	2 (1-2)	3 (2-3)	2 (1-3)	2 (0-2)	3 (2-3)
VCM 5D	4 (4-4)#	3 (2-3) #	4 (4-4) #	4 (4-4) #	3 (3-3) #	4 (4-4) #
VCM 7D	4 (4-4) #	3 (3-3) #	4 (4-4) #	4 (4-4) #	3 (2-3) #	4 (3-4) #

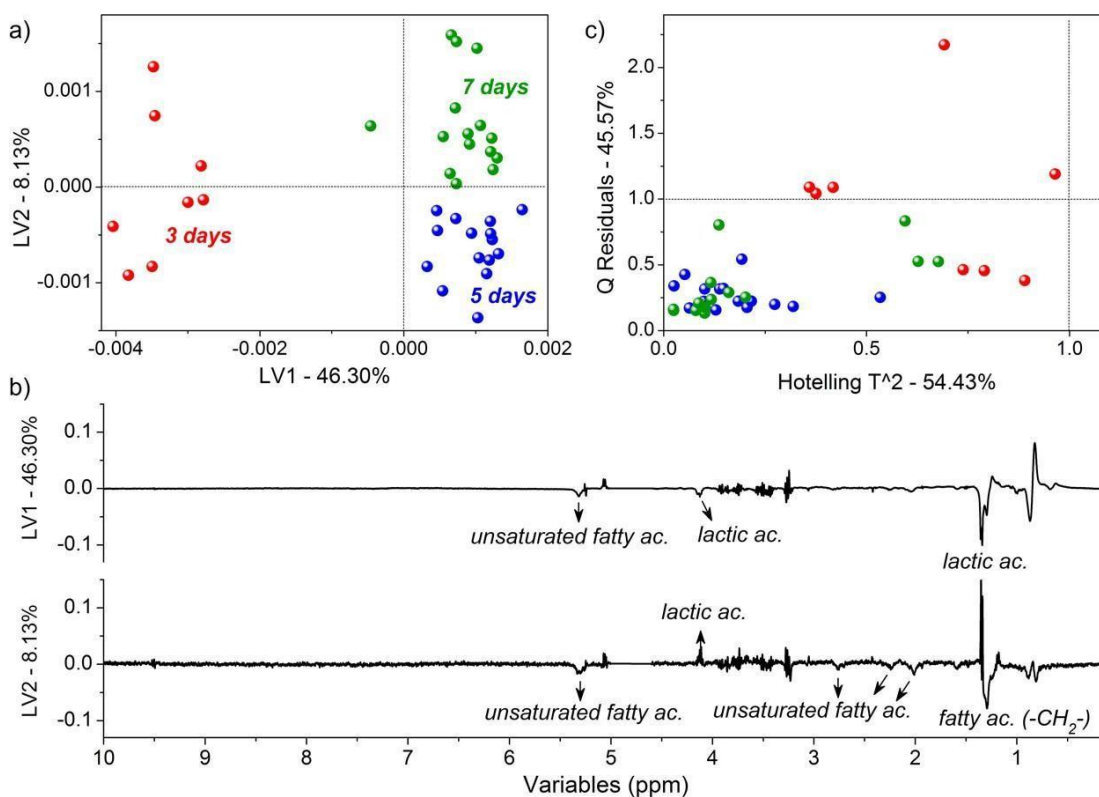
Os valores representam os scores microscópicos das alterações morfológicas na indução da LRA por VCM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

5.1.6 Variabilidades dos compostos orgânicos (metabólicos) plasmáticos por RMN em diferentes tempos indução de vancomicina

A análise ^1H RMN acoplada ao método quimiométrico supervisionado por PLS-DA foi realizada para avaliar a variabilidade dos compostos orgânicos no plasma sanguíneo de camundongos sob diferentes tempos de tratamentos: controle (sem vancomicina após 3, 5 e 7 dias); e sob influência da vancomicina durante 3, 5 e 7 dias de tratamento. Inicialmente foi avaliada a variabilidade natural dos compostos orgânicos no plasma sanguíneo de 3 a 7 dias, ou seja, sem o efeito da vancomicina (grupos controle). A **Figura 20** ilustra os respectivos resultados da classificação multivariada de acordo com a evolução do período.

Os resultados da classificação apresentados na **Figura 20ab** revelaram claramente a diminuição do ácido láctico e dos ácidos graxos insaturados (cargas negativas de LV1) em camundongos controle com a progressão do período, de 3 a 7 dias de experimento. Além disso, o sistema de pontuação mostrou maior diferença desses compostos acima mencionados de 3 a 5 dias de experimento do que de 5 a 7 dias (ambos com pontuações LV1 positivas). Informações relevantes sobre o eixo LV2 foram as maiores quantidades de ácido láctico e menores quantidades de ácidos graxos saturados e insaturados em camundongos controle durante 7 dias de experimento (pontuações positivas de PC2) em comparação com aqueles camundongos durante 5 dias em pontuações negativas de PC2. A **Figura 20c** ilustra que apesar das amostras de plasma apresentarem altos erros de classificação (resíduos Q), elas não influenciaram negativamente a análise devido à influência relativa baixa da modelagem (Hotelling T2).

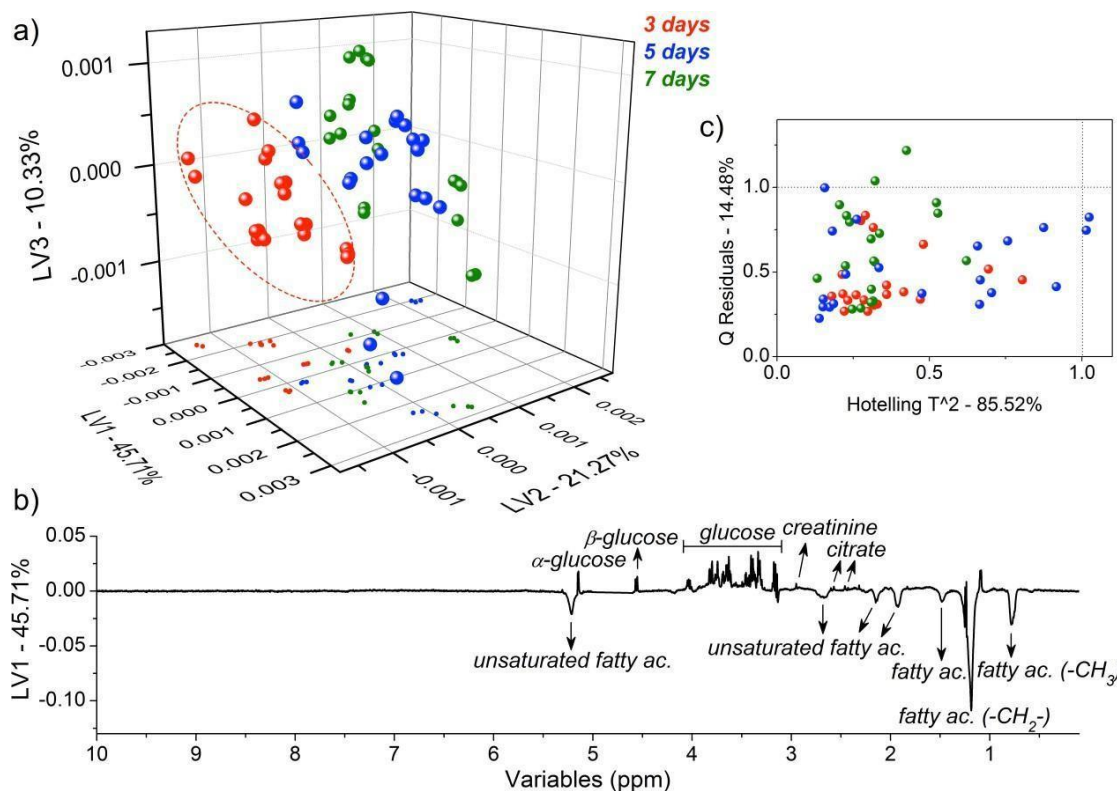
Figura 20 - Resultados PLS-DA de plasma sanguíneo de camundongos controle



NOTA: a) sistema de coordenadas de pontuação 2D (LV1 × LV2), amostras após 3 dias de tratamento em vermelho, 5 dias em azul, e 7 dias em verde; b) cargas relevantes para classificação das amostras; c) Resíduos Hotelling T² × Q.

Após a compreensão da variabilidade dos compostos de acordo com a avaliação do período natural (sem o efeito da vancomicina), foram desenvolvidas modelagens de classificação considerando apenas camundongos que foram submetidos à indução de LRA por VCM (3, 5 e 7 dias) que foram utilizadas como variáveis categóricas (classes de amostras) plotados na **Figura 21**.

Figura 21 - Resultados PLS-DA de plasma sanguíneo de camundongos na indução de LRA por VCM



NOTA: a) sistema de coordenadas de escores 3D (LV1 $\times$ LV2 $\times$ LV3), amostras após 3 dias de tratamento em vermelho, 5 dias em azul e 7 dias em verde; b) cargas relevantes para classificação das amostras; c) Resíduos Hotelling T2 $\times$ Q.

A **Figura 21** mostrou efeito semelhante na indução de VCM nos períodos de tempo de 5 e 7 dias pela tendência de agrupamento em escores positivos de LV1, que ocorreu por maiores quantidades de glicose, creatinina e citrato. O plasma sanguíneo de camundongos no período de 3 dias agrupou-se em pontuações negativas de LV1 e LV2 por maiores quantidades de ácidos graxos insaturados e saturados. O eixo LV3 foi importante para enfatizar a separação das amostras com base na duração do tempo de indução com VCM.

5.2 O tratamento com [8]-Gingerol e Metilsulfanilmetano na lesão renal aguda por Vancomicina.

A partir dos resultados apresentados anteriormente na caracterização do tempo de indução da LRA por VCM, optamos por utilizar o tempo de 7 dias para indução da LRA para dar seguimento aos grupos experimentais de tratamento com [8]-Gingerol (8G) na dose 40mg/kg/dia e MSM nas doses 1g/kg/dia e 1,5g/Kg/dia em grupos de animais distintos. Os dados a seguir representam os resultados obtidos.

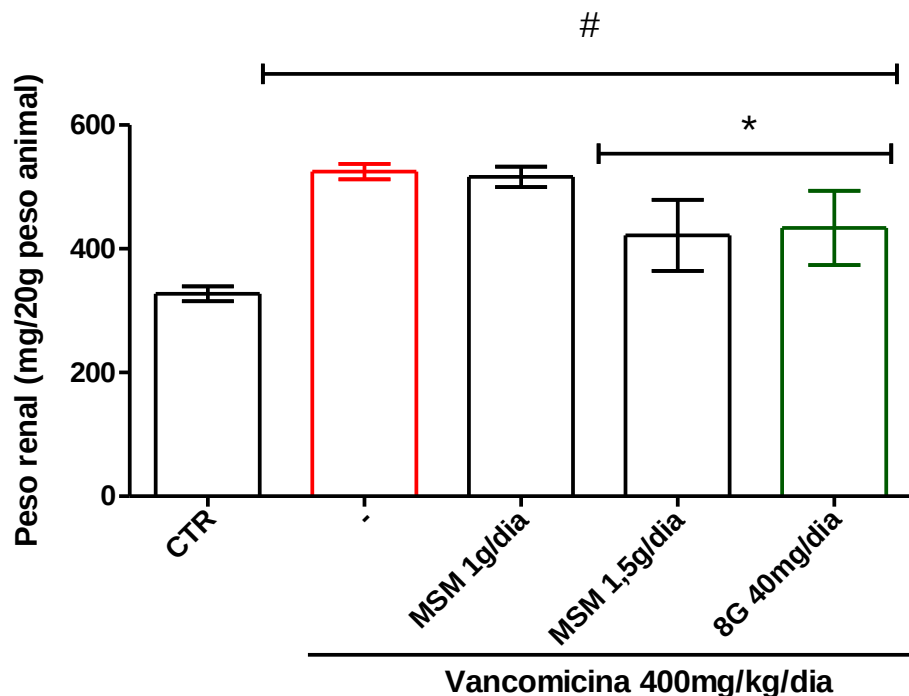
5.2.1 Os tratamentos com 8G e MSM atenuam o Peso renal na indução da LRA por VCM.

Na **Figura 22** representa os efeitos dos compostos 8G e MSM no peso renal desencadeado pela VCM. Podemos observar uma diferença significativa entre o grupo CTR ($327,3 \pm 11,81$ mg/20g de peso animal) e o grupo VCM ($542,6 \pm 12,52$ mg/20g de peso animal) e que os tratamentos com 8G ($433,6 \pm 22,71$ mg/20g de peso animal) e MSM na dose 1,5g/dia ($421,9 \pm 22,76$ mg/20g de peso animal) reduziram o dano quando comparados ao grupo lesão e que a dose 1g/dia de MSM ($516,3 \pm 16,59$ mg/20g de peso animal) não apresentou redução significativa.

5.2.1 Os tratamentos com 8G e MSM melhoram os parâmetros bioquímicos de função renal na indução da LRA por VCM.

A administração de VCM aumentou significativamente os níveis de creatinina ($0,526 \pm 0,018$ mg/dL) em comparação ao seu grupo CTR ($0,313 \pm 0,024$ mg/dL), em contrapartida, os tratamentos com 8G ($0,326 \pm 0,018$ mg/dL), MSM 1g/dia ($0,038 \pm 0,030$ mg/dL) e MSM 1,5g/dia ($0,291 \pm 0,024$ mg/dL) atenuaram de forma significativa os níveis plasmáticos de creatinina (**Figura 23A**).

Figura 22 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam o Peso Renal na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*

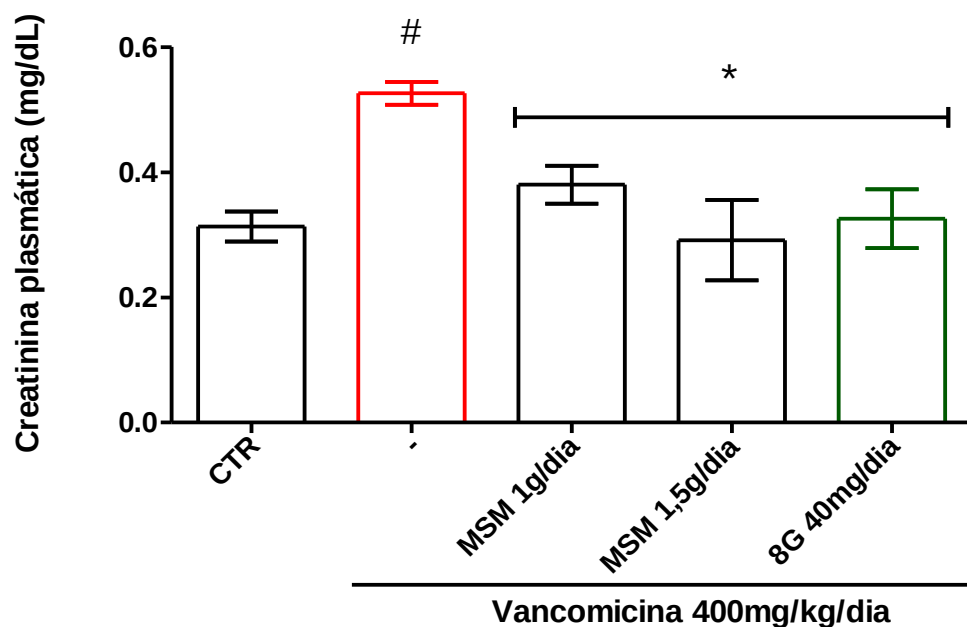


Os valores representam o peso renal na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. # $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

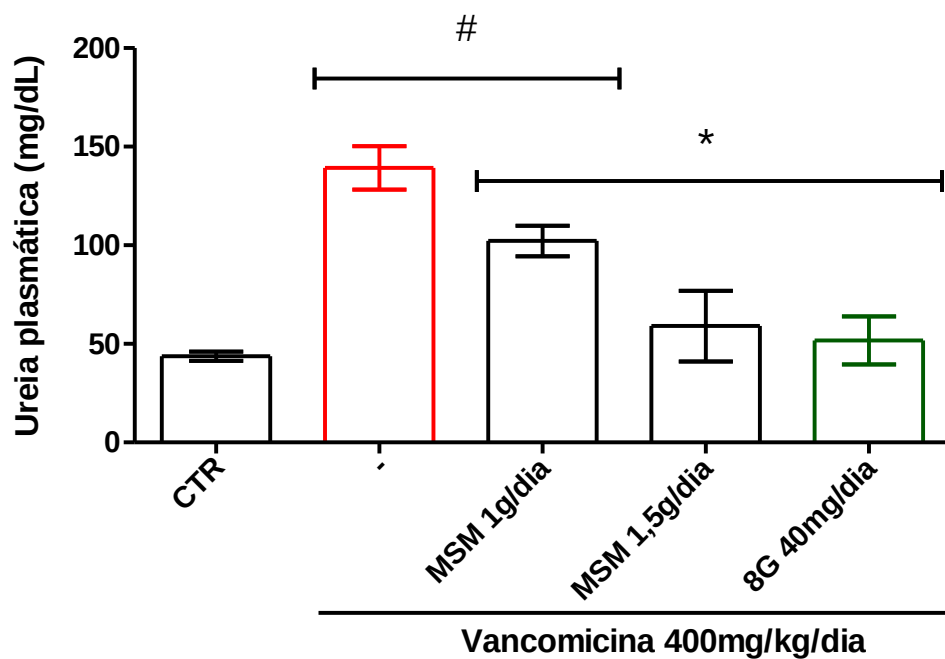
Ao avaliar os níveis plasmáticos de ureia, observa-se que a VCM ($139,3 \pm 11,03$ mg/dL) foi capaz de aumentar significativamente a sua concentração em relação ao grupo CTR ($43,8 \pm 2,33$ mg/dL) e que ambos os tratamentos avaliados foram capazes de reduzir as concentrações de ureia: 8G ($51,71 \pm 4,59$ mg/dL), MSM 1g/dia ($102,2 \pm 7,77$ mg/dL) e MSM 1,5g/dia ($59,00 \pm 6,33$ mg/dL), conforme apresentado na **Figura 23B**.

Figura 23 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam os níveis de creatinina e ureia plasmática na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*.

A



B

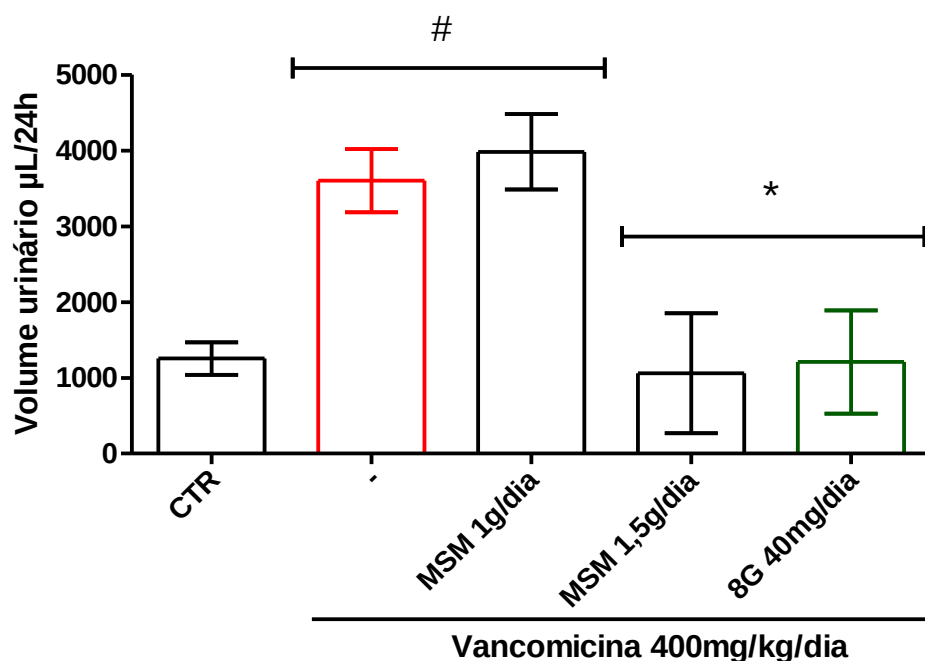


Os valores representam os níveis plasmáticos de creatinina (A) e ureia (B) na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. [#]P < 0,05 em relação ao grupo CTR. *P < 0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

5.2.3 Os tratamentos com 8G e MSM melhoram o volume de urina excretada, Clearance de creatinina e proteína urinária na indução da LRA por VCM.

A **Figura 24** apresenta os dados do volume de urina excretada em 24 horas. Podemos observar que administração de VCM ($3603 \pm 417,4 \mu\text{L}/24\text{h}$) e o grupo tratamento MSM 1g/dia ($3983 \pm 496,9 \mu\text{L}/24\text{h}$) foram capazes de aumentar esse fluxo em comparação ao grupo CTR ($1254 \pm 213,0 \mu\text{L}/24\text{h}$). Já os tratamentos com 8G ($1209 \pm 240,3 \mu\text{L}/24\text{h}$) e MSM na dose 1,5g/dia ($1060 \pm 232,6 \mu\text{L}/24\text{h}$) reduziram esse volume em comparação ao grupo VCM.

Figura 24 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano alteram dos parâmetros de volume urinário de 24 horas na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

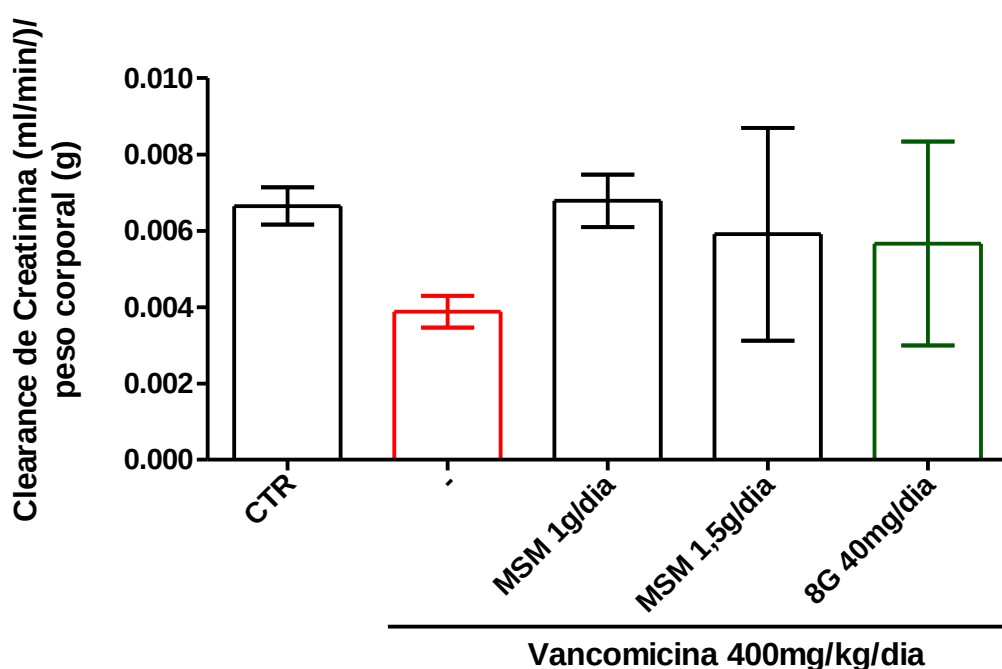


Os valores representam o volume urinário excretado em 24 horas na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. # $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

Para o *Clearance de Creatinina* foram observados os seguintes resultados apresentados na **Figura 25** a seguir. Podemos observar que esse parâmetro não foi modificado estatisticamente pela administração de VCM e pelos tratamentos com 8G e MSM, mas percebe-se uma redução de aproximadamente de 41,65% na média do grupo VCM ($0,00388 \pm 0,00041 \text{ mL}/\text{min por g peso animal}$) em relação ao grupo

CTR ($0,00665 \pm 0,00049$ mL/min por g peso animal) e tratamentos apresentaram uma melhora do *Clearance de Creatinina* de aproximadamente 46%, 74,90% e 52,32% respectivamente para os grupos 8G ($0,005665 \pm 0,00011$ mL/min por g peso animal, MSM 1g/dia ($0,006786 \pm 0,00069$ mL/min por g peso animal e MSM 1,5g/dia ($0,00591 \pm 0,00011$ mL/min por g peso animal em relação ao grupo VCM.

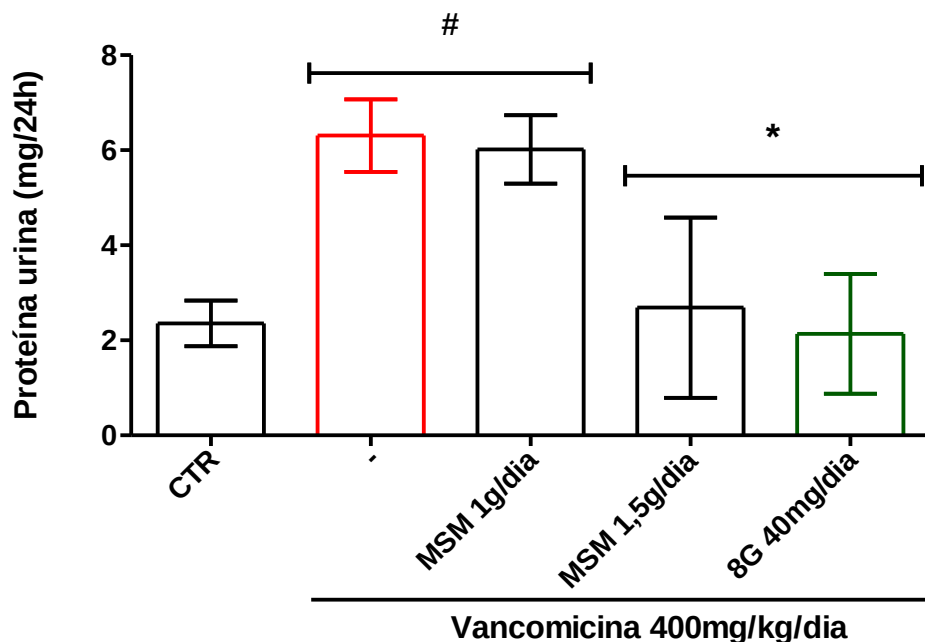
Figura 25 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano melhoram os valores de *Clearance de Creatinina* na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss



Os valores representam o *Clearance de Creatinina* na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

Pode-se observar na **Figura 26** que VCM ($6,307 \pm 0,7629$ mg/dL/24h) apresentou uma perda significativa da proteína urinária em relação ao grupo CTR ($2,357 \pm 0,4817$ mg/dL/24h). O tratamento com 8G ($2,136 \pm 0,4454$ mg/dL/24h) e MSM na dose 1,5g/dia ($2,687 \pm 0,7170$ mg/dL/24h) foram capazes de reduzir significativamente essa perda de proteína na urina em relação ao grupo VCM, o que não foi observado com o MSM na dose 1g/dia ($6,017 \pm 0,7196$ mg/dL/24h).

Figura 26 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam a excreção de proteína urinária na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*

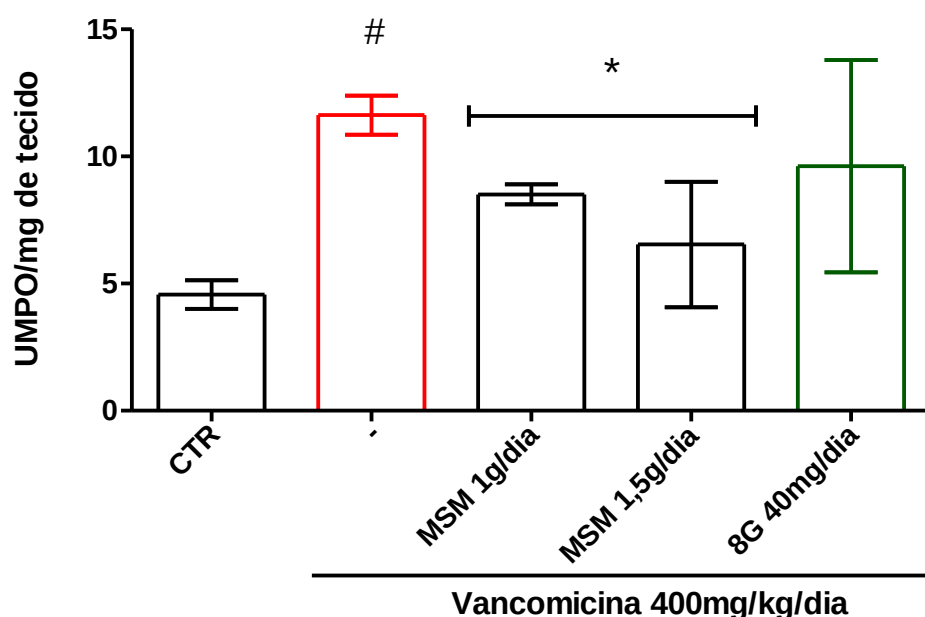


Os valores representam a excreção de proteína urinária na LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. *P< 0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

5.2.4 Os tratamentos com 8G e MSM reduzem a atividade de MPO na indução da LRA por VCM.

Na **Figura 27** observa-se que a VCM ($11,63 \pm 0,7698$ UMPO/mg de tecido) aumentou significativamente a atividade de MPO em comparação ao grupo CTR ($4,570 \pm 0,5606$ UMPO/mg de tecido). Os tratamentos com MSM nas doses 1g/dia ($8,513 \pm 0,3937$ UMPO/mg de tecido) e 1,5g/dia ($6,540 \pm 1,008$ UMPO/mg de tecido) reduziram a atividade de MPO em relação ao grupo VCM. O tratamento 8G ($9,619 \pm 1,577$ UMPO/mg de tecido) não apresentou diferença significativa, mas uma redução de 17,30% na média de atividade de MPO em relação ao grupo VCM.

Figura 27 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano reduzem a atividade de MPO na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*



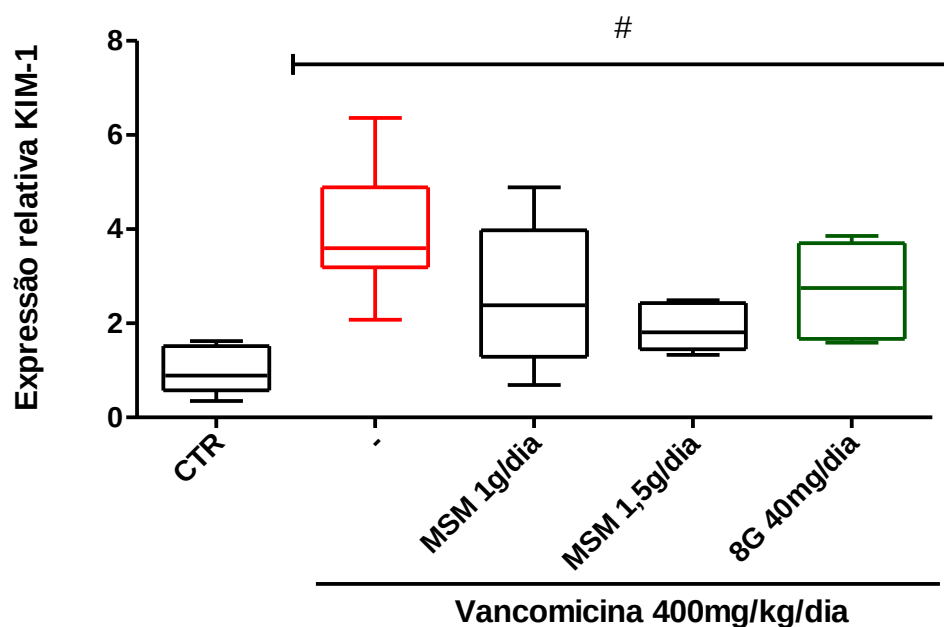
Os valores representam a atividade de MPO na LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas médias $\pm$ EPM. # $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni.

5.2.5 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica de biomarcadores precoce na indução da LRA por VCM.

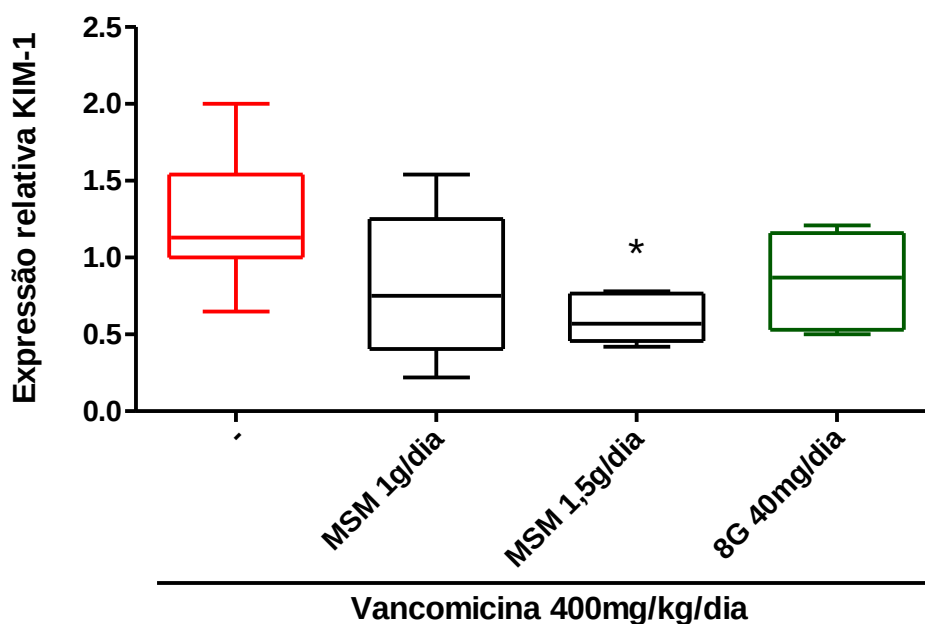
Ao investigar os efeitos dos tratamentos com 8G e MSM a níveis de expressão molecular, observa-se na **Figura 28A** que a VCM [3,6 (2,08-6,36)], assim como os tratamentos com 8G [2,75 (1,59-3,86)] e MSM nas doses 1g/dia [2,49 (1,18-4,89)] e 1,5g/dia [1,81 (1,33-2,49)] aumentaram estatisticamente a expressão gênica de KIM-1 em comparação ao grupo CTR [0,89 (0,35-1,62)]. Quando se comparou com grupo VCM [1,13 (0,65-2,00)], percebe-se que somente o tratamento MSM 1,5g/dia [0,57 (0,42-0,78)] foi capaz de reduzir significativamente a expressão de KIM-1, conforme observado na **Figura 28B**.

Figura 28 - [8]-Gingerol e Metilfenilmetano modulam a expressão gênica de KIM-1 na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*.

A



B

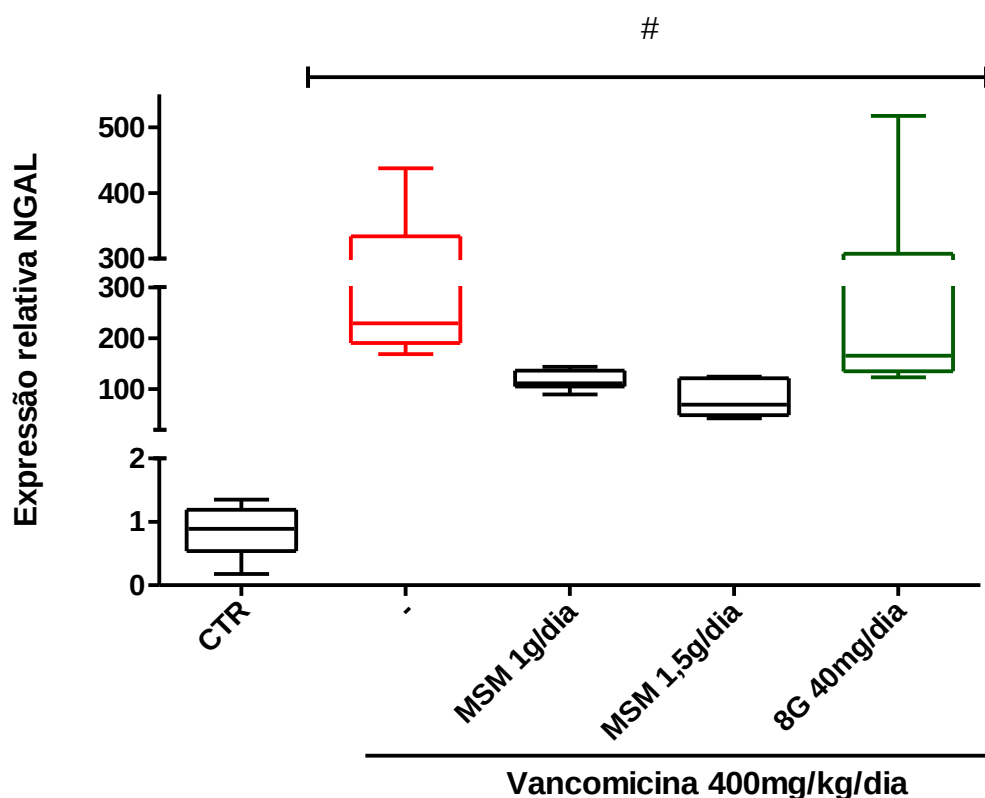


Os valores representam a expressão gênica de KIM-1 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de KIM-1 em relação ao grupo CTR. **B)** Expressão gênica de KIM-1 em relação ao grupo VCM. # $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Ao avaliar a expressão gênica de NGAL, foi observado que a indução da LRA por VCM [229,2 (168,9-437,5)] e os tratamentos como os compostos 8G [157,5 (123,1-307,5)] (123,1-307,5)] e MSM nas doses 1g/dia [111,1 (89,77-143,6)] e 1,5g/dia [69,86 (42,52-124,4)] aumentaram significativamente a expressão gênica de NGAL em relação ao grupo CTR [0,89 (0,18-1,35)] (**Figura 29A**). Mas quando se compara a expressão gênica dos grupos tratamentos com o grupo VCM, observa-se que os compostos 8G [0,70 (0,17-0,96)] e MSM nas doses 1g/dia [0,55 (0,45-0,71)] e 1,5g/dia [0,35 (0,21-0,62)] atenuam a expressão gênica de NGAL em comparação ao grupo VCM [1,14 (0,84- 2,17)], conforme apresentado na **Figura 29B**.

Figura 29 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de NGAL na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

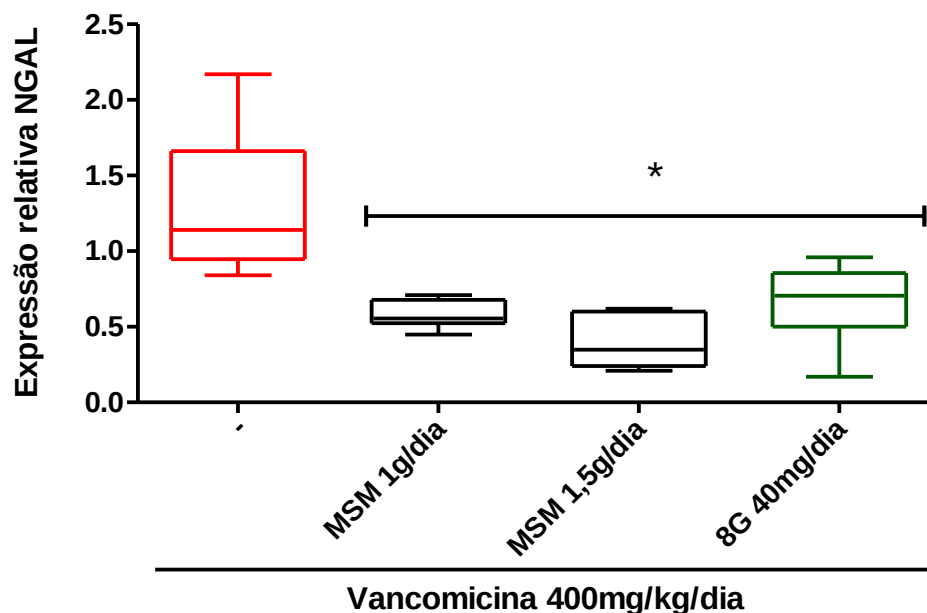
A



Os valores representam a expressão gênica de NGAL na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de NGAL em relação ao grupo CTR. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 29 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de NGAL na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss (*Continuação*)

B



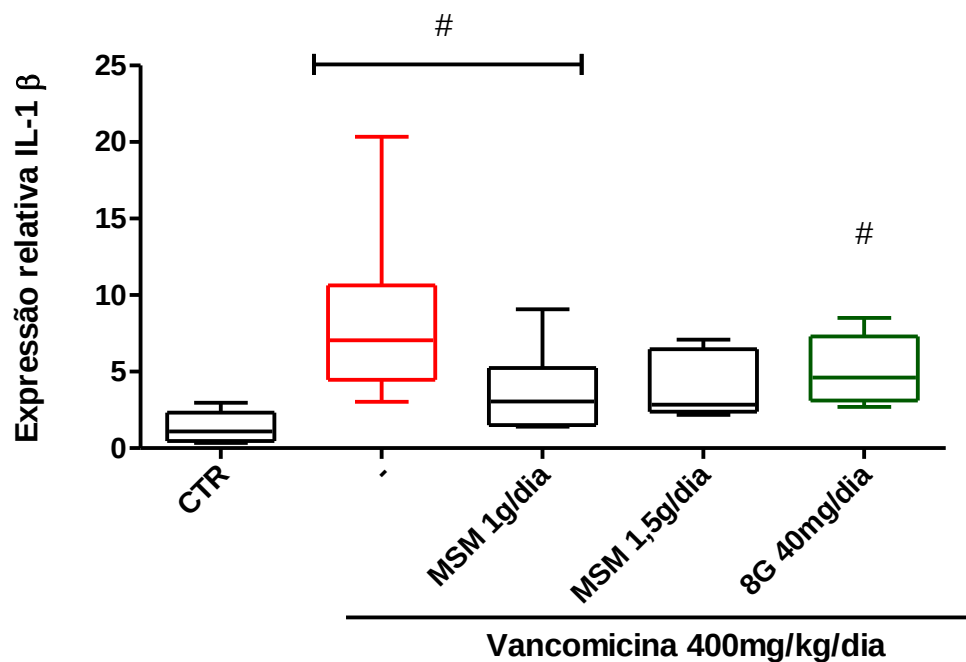
Os valores representam a expressão gênica de NGAL na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **B)** Expressão gênica de NGAL em relação ao grupo VCM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

5.2.6 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica de marcadores inflamatórios na indução da LRA por VCM

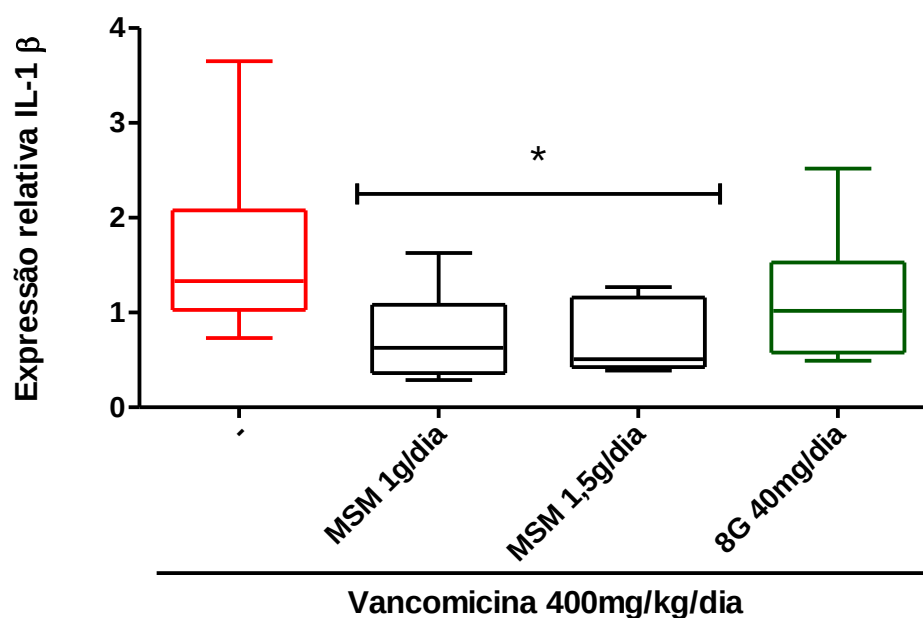
Na **Figura 30A** observa-se um aumento significativo na expressão gênica de IL-1 β nos grupos VCM [7,045 (3,03-20,35)], 8G [4,61 (2,70-8,50)] e MSM 1g/dia [3,05 (1,40-9,08)] em relação ao grupo CTR [1,09 (0,35-2,97)], mas o grupo MSM 1,5g/dia [2,84 (2,18-7,09)] não apresentou diferença com o grupo CTR. Porém na **Figura 30B**, ao comparar os tratamentos com 8G [1,02 (0,49-2,52)], MSM 1g/dia [0,63 (0,29-1,63)] e MSM 1,5g/dia [0,51 (0,39-1,27)], foram observados que somente os tratamentos com MSM apresentaram redução significativa na expressão gênica de IL-1 β em relação ao grupo VCM [1,33 (0,73-3,65)], tal resultado não foi encontrado com o tratamento com 8G.

Figura 30 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de IL-1 β na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss.

A



B

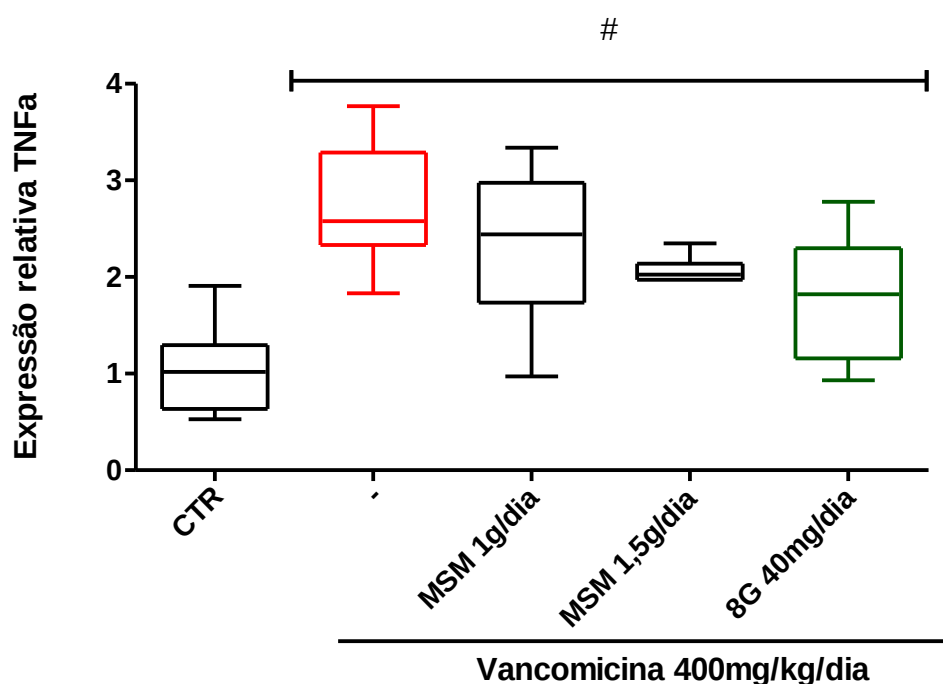


Os valores representam a expressão gênica de IL-1 β na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de IL-1 β em relação ao grupo CTR. **B)** Expressão gênica de IL-1 β em relação ao grupo VCM. #P<0,05 em relação ao grupo CTR. *P<0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Ao avaliar a expressão gênica de $\text{TNF}\alpha$, podemos observar na **Figura 31A** que todos os grupos avaliados aumentaram a sua expressão gênica: VCM [2,58 (1,83- 3,77)], 8G [1,82 (0,93-2,78)], MSM 1g/dia [2,44 (0,97-3,34)] e MSM 1,5g/dia [2,02 (1,97-2,35)] em relação ao grupo CTR [1,02 (0,53-1,91)]. Porém ao comparar os grupos tratamentos 8G [0,77 (0,40-1,18)], MSM 1g/dia [1,04 (0,41-1,42)] e MSM 1,5g/dia [0,86 (0,84-1,18)] com o grupo VCM [1,09 (0,78-1,60)], observou-se que somente os tratamentos com 8G e MSM na dose 1,5g/dia foram capazes de atenuarem a expressão de $\text{TNF}\alpha$, conforme observado na **Figura 31B**.

Figura 31 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de $\text{TNF}\alpha$ na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

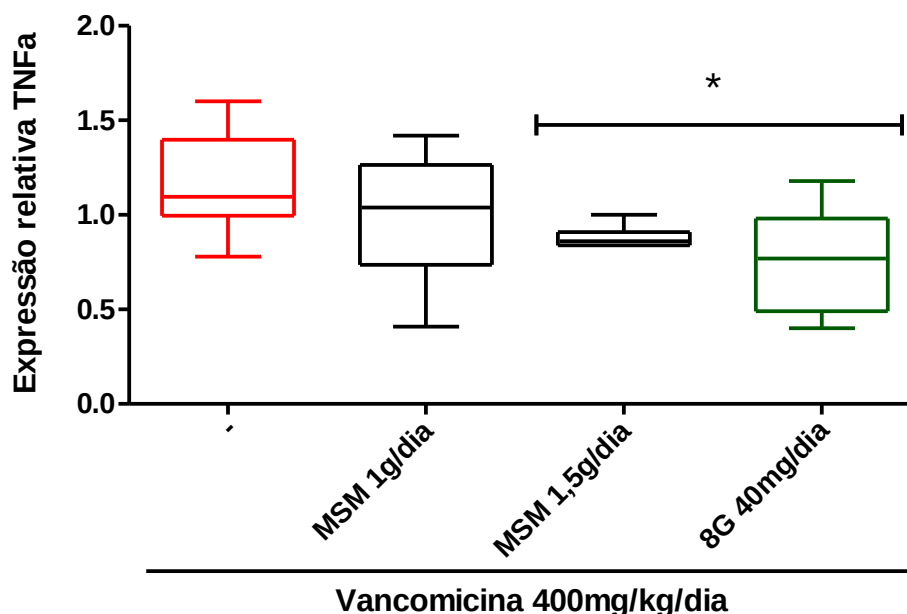
A



Os valores representam a expressão gênica de $\text{TNF}\alpha$ na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de $\text{TNF}\alpha$ em relação ao grupo CTR. # $P < 0,05$ em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 31 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de TNF α na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss (*Continuação*)

B

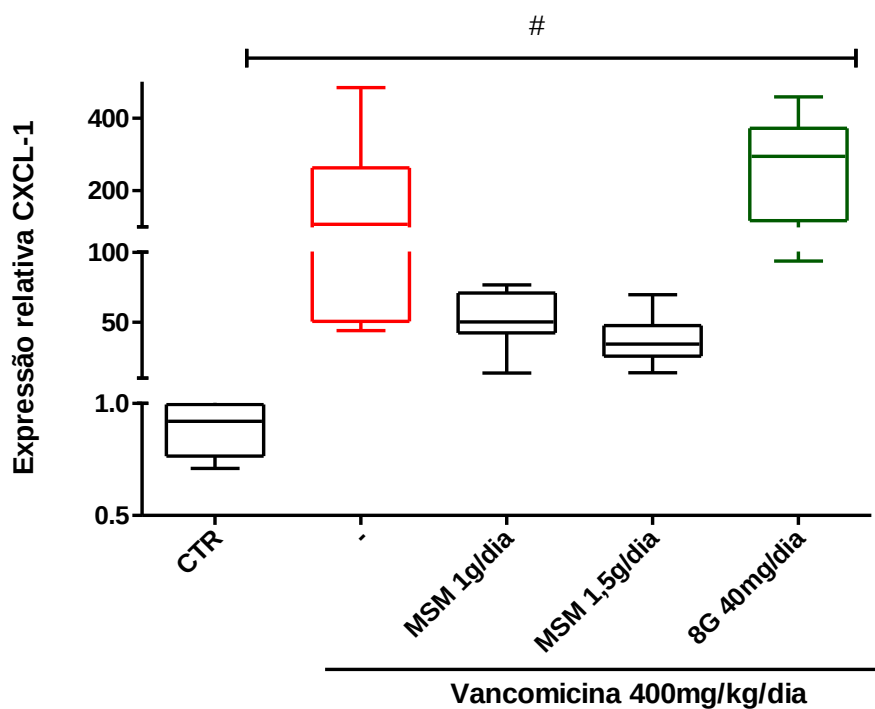


Os valores representam a expressão gênica de TNF α na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **B)** Expressão gênica de TNF α em relação ao grupo VCM. *P<0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

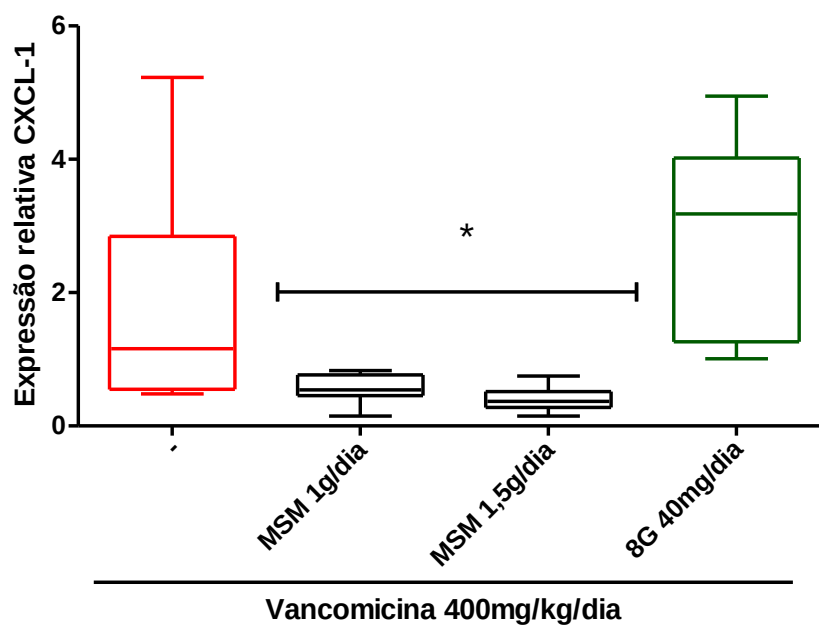
A **Figura 32A** demonstra um aumento significativo na expressão gênica de CXCL-1 nos grupos VCM [107,4 (43,99-484,1)], 8G [294,4 (93,59-458,7)], MSM 1g/dia [50,28 (13,64-76,71)] e MSM 1,5g/dia [34,4 (13,85-69,61)] em comparação ao grupo CTR [0,92 (0,71-1,05)]. Quando se realizou a comparação com grupo VCM [1,16 (0,48-5,23)], os tratamentos com MSM nas doses 1g/dia [0,54 (0,15-0,83)] e 1,5g/dia [0,37 (0,15-0,75)] reduziram significativamente a expressão desse gene, mas o contrário foi observado no grupo 8G [3,18 (1,01-4,95)], conforme demonstrado na **Figura 32B**.

Figura 32 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de CXCL-1 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

A



B

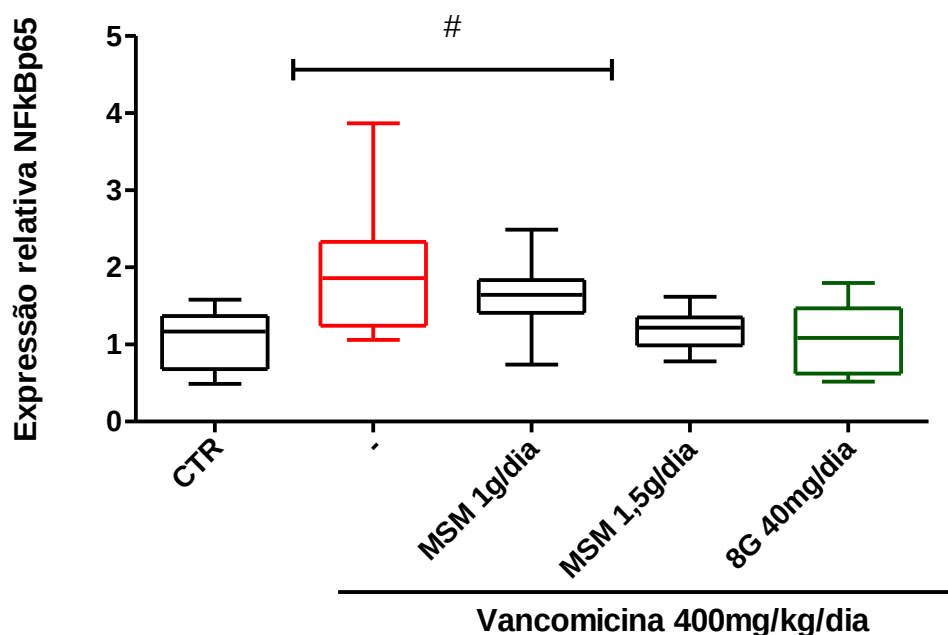


Os valores representam a expressão gênica de CXCL-1 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de CXCL-1 em relação ao grupo CTR. **B)** Expressão gênica de CXCL-1 em relação ao grupo VCM. #P < 0,05 em relação ao grupo CTR. *P < 0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Pode-se verificar na **Figura 33A** que somente os grupos VCM [1,86 (1,06-3,87)] e MSM na dose 1g/dia [1,64 (0,74-2,49)] apresentaram aumento significativo na expressão gênica de NFkBp65 quando comparados ao grupo CTR [1,17 (0,49-1,58)], mas não foi observado o aumento dessa expressão nos grupos tratamentos com 8G [1,018 (0,52-1,80)] e MSM na dose 1,5g/dia [1,22 (0,78-1,62)]. Ao avaliar os grupos tratamentos em relação ao grupo lesão VCM (**Figura 33B**), observa-se que os tratamentos com 8G [0,60 (0,28-1,00)] e MSM na dose 1,5g/dia [0,67 (0,43-0,89)] atenuaram de forma significativa a expressão gênica de NFkBp65 em comparação ao grupo VCM [1,02 (0,59-2,14)], porém o mesmo não foi observado no grupo MSM na dose 1g/dia [0,90 (0,41-1,38)].

Figura 33 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de NFkBp65 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

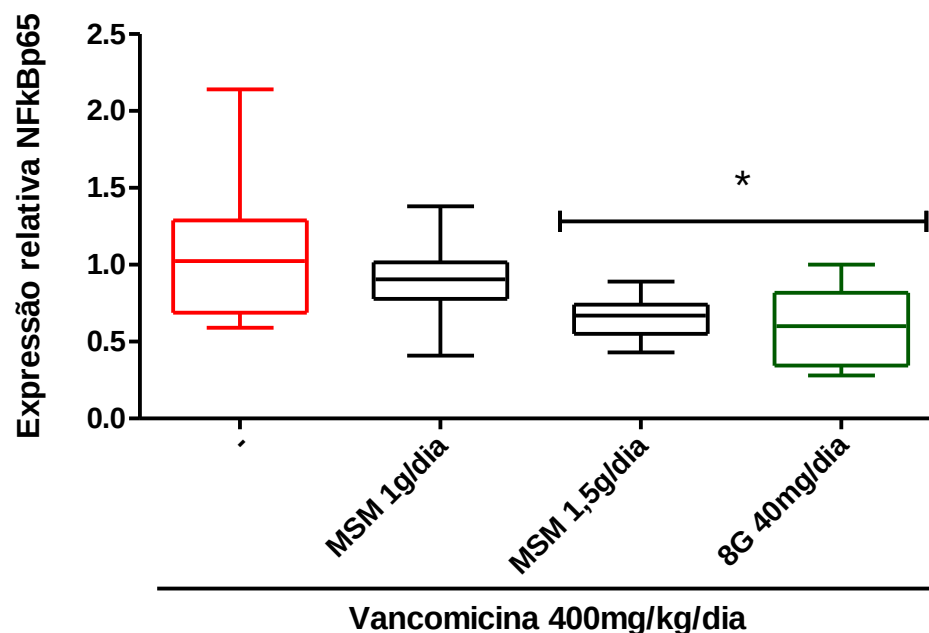
A



Os valores representam a expressão gênica de NFkBp65 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de NFkBp65 em relação ao grupo CTR. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 33 - [8]-Gingerol e Metilfenilmetano modulam a expressão gênica de NFκBp65 na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss* (*Continuação*)

B



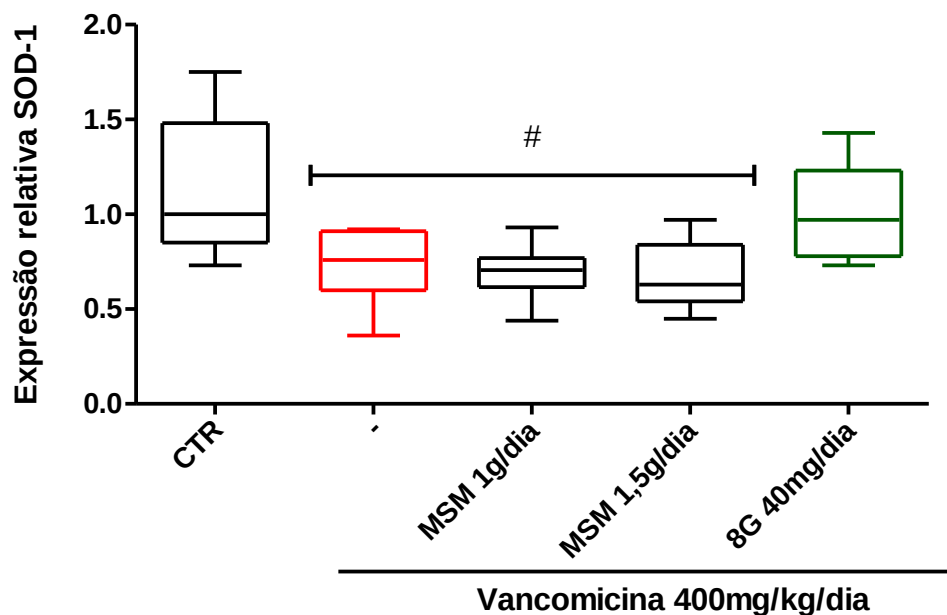
Os valores representam a expressão gênica de NFκBp65 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **B)** Expressão gênica de NFκBp65 em relação ao grupo VCM. *P<0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

5.2.7 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica de marcadores antioxidantes na indução da LRA por VCM

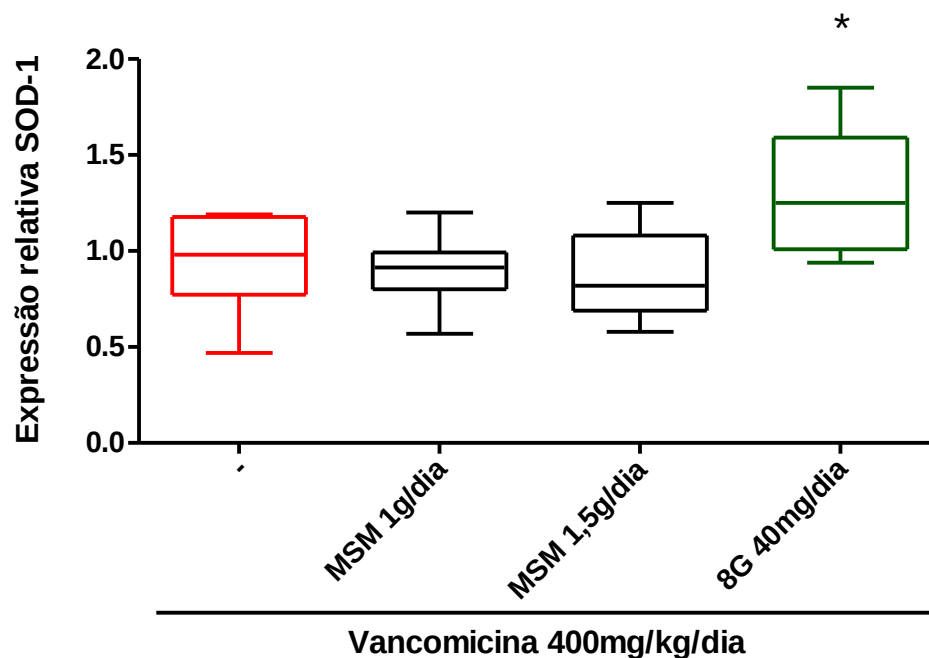
Na **Figura 34A** observa-se que a VCM [0,76 (0,36-0,92)] foi capaz de reduzir de forma significativa a expressão gênica de SOD-1 quando comparado com grupo CTR [1,00 (0,73-1,75)] e que os tratamentos com MSM na dose 1g/dia [0,70 (0,44- 0,93)] e 1,5g/dia [0,63 (0,45-0,97)] não foram capazes de reverter tal redução. O contrário foi observado no grupo 8G [0,97 (0,73-1,43)], pois não se diferenciou do grupo CTR. Ao se comparar os tratamentos com grupo VCM, somente o tratamento com 8G [1,25 (0,94-1,85)] foi capaz de aumentar a expressão de SOD-1, porém os tratamentos com MSM nas doses 1g/dia [0,91 (0,57-1,20)] e 1,5g/dia [0,82 (0,58-1,25)] não modularam a sua expressão, isso quando comparados com grupo VCM [0,98 (0,47-1,19)], como apresentado na **Figura 34B**.

Figura 34 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de SOD-1 na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*.

A



B

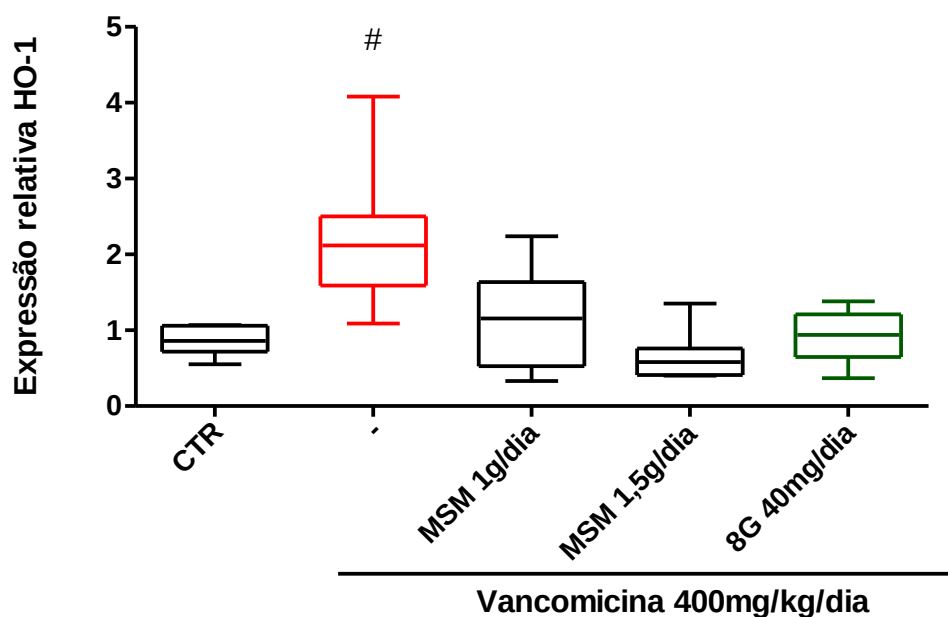


Os valores representam a expressão gênica de SOD-1 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de SOD-1 em relação ao grupo CTR. **B)** Expressão gênica de SOD-1 em relação ao grupo VCM. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. *P<0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Quanto à expressão gênica de HO-1, observa-se na **Figura 35A** um aumento significativo na expressão do gene no grupo VCM [2,12 (1,09-4,08)] em relação ao grupo CTR [0,86 (0,55-1,07)], porém o mesmo não foi observado nos grupos tratamentos com 8G [0,94 (0,37-1,38)], MSM nas doses 1g/dia [1,15 (0,33-2,24)] e 1,5g/dia [0,58 (0,40-1,35)]. Ao comparar com o grupo VCM [1,07 (0,55-2,06)], percebe-se uma diminuição na expressão nos grupos 8G [0,48 (0,19-0,70)] e MSM na dose 1,5g/dia [0,29 (0,20-0,68)], mas não foi observada essa diminuição no grupo MSM na dose 1g/dia [0,58 (0,15-1,43)] (**Figura 35B**).

Figura 35 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de HO-1 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

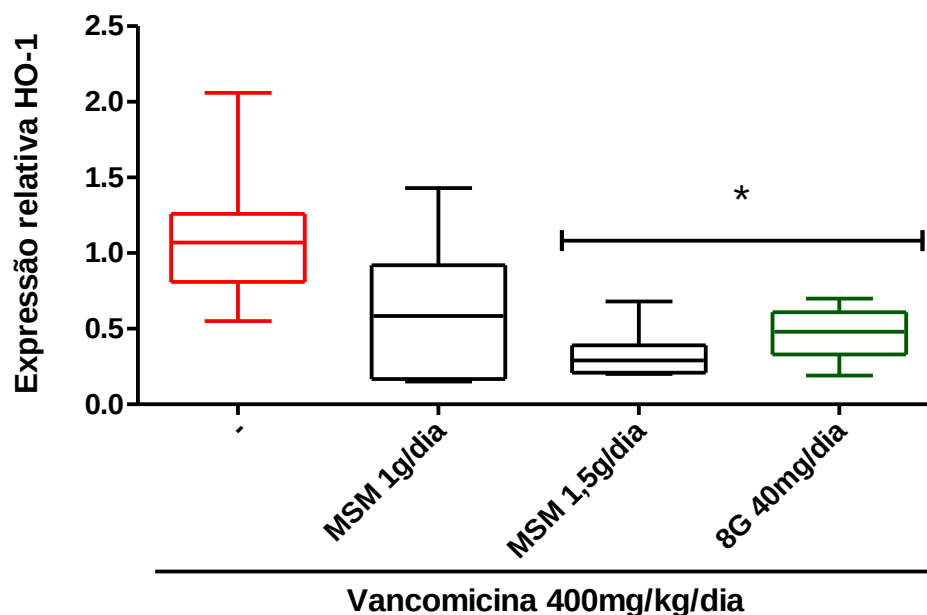
A



Os valores representam a expressão gênica de HO-1 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de HO-1 em relação ao grupo CTR. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 35 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de HO-1 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss (*Continuação*)

B

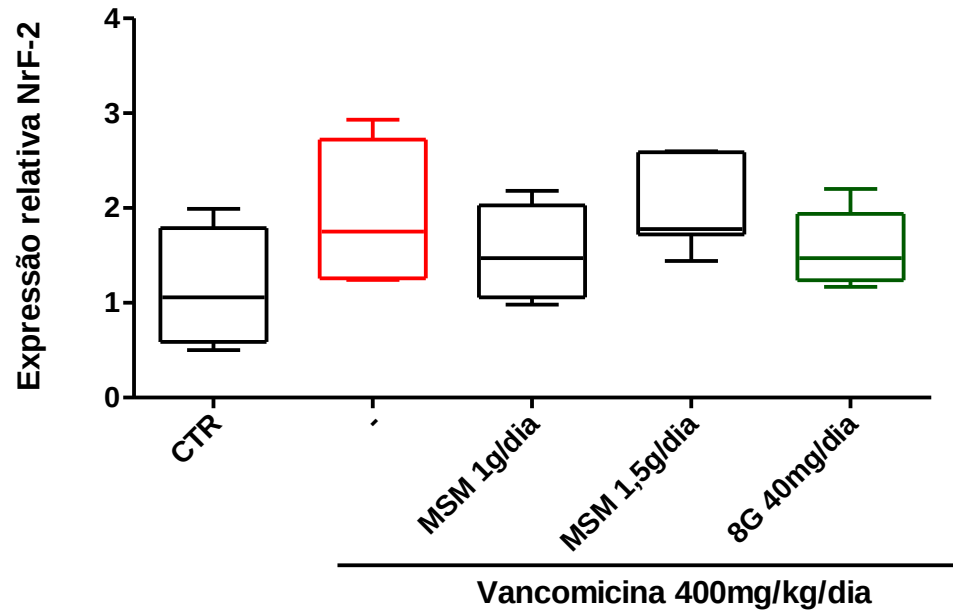


Os valores representam a expressão gênica de HO-1 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **B)** Expressão gênica de HO-1 em relação ao grupo VCM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

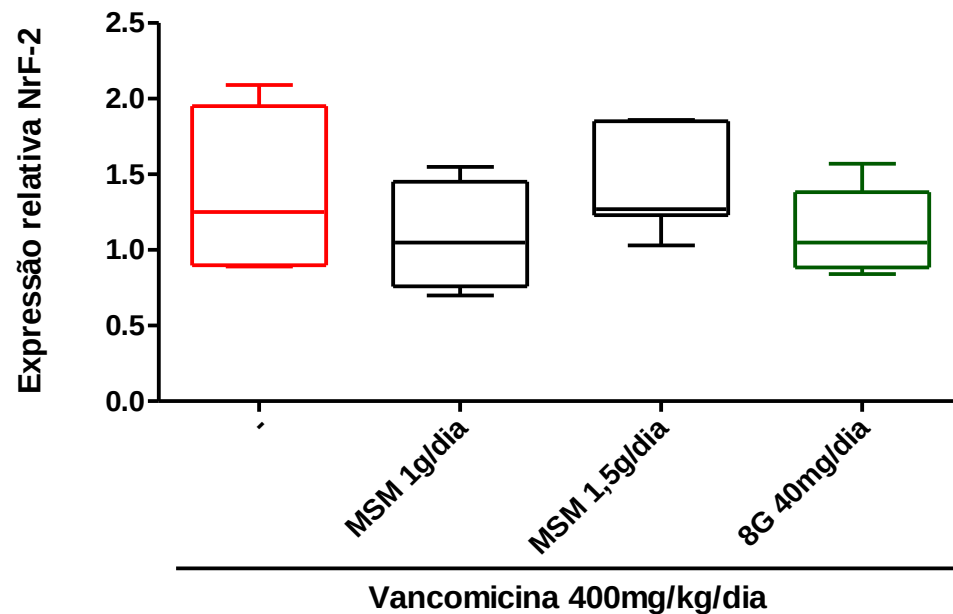
Na **Figura 36A** representa a análise da expressão gênica de NrF-2, pode-se observar que estatisticamente não ocorreu diferença entre os grupos VCM [1,75 (1,24- 2,93)], 8G [1,47 (1,17-2,20)], MSM 1g/dia [1,42 (0,98-2,18)] e MSM 1,5g/dia [1,78 (1,44-2,60)] em relação ao grupo CTR [1,06 (0,50-1,99)] e o mesmo foi observado quando se compara os grupos tratamentos: 8G [1,05 (0,84-1,57)], MSM 1g/dia [1,05 (0,70-1,55)] e MSM 1,5g/dia [1,27 (1,03-1,86)] com o grupo VCM [1,25 (0,89-2,09)] (**Figura 36B**).

Figura 36 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de NrF-2 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

A



B



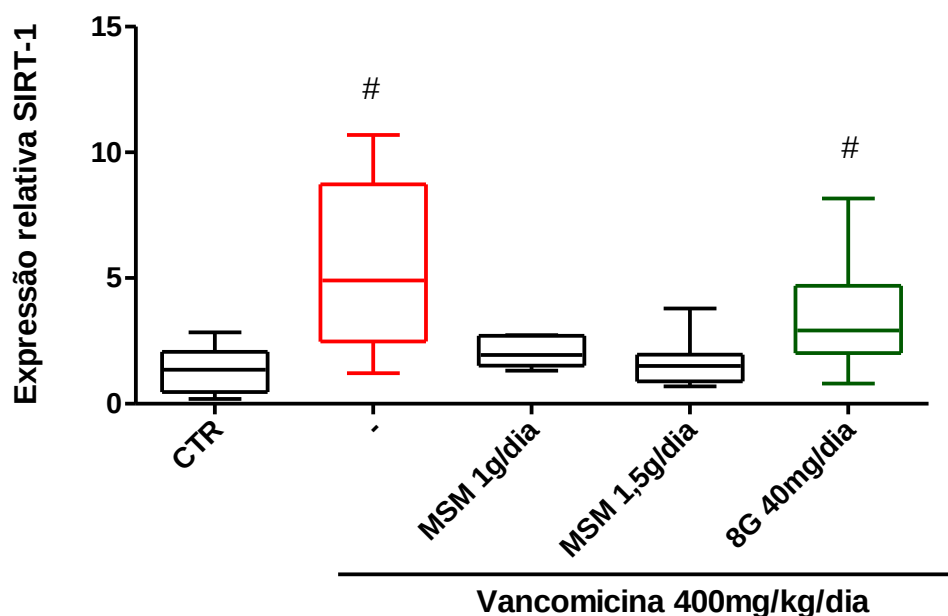
Os valores representam a expressão gênica de NrF-2 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de NrF-2 em relação ao grupo CTR. **B)** Expressão gênica de NrF-2 em relação ao grupo VCM.

5.2.8 Os tratamentos com 8G e MSM modulam a expressão gênica dos marcadores SIRT-1 e STAT-3 na indução da LRA por VCM

Conforme apresentado na **Figura 37A**, observa-se um aumento significativo na expressão de SIRT-1 no grupo VCM [4,90 (1,22-10,69)] e no grupo tratamento com 8- G [2,92 (0,80-8,17)], mas não se observou esse aumento nos grupos tratamento com MSM nas doses 1g/dia [1,94 (1,32-2,73)] e 1,5g/dia [1,51 (0,69-3,79)], quando comparados ao grupo CTR [1,35 (0,19-2,85)]. Como demonstrado na **Figura 37B**, a expressão de SIRT-1 foi atenuada de forma significativa nos grupos tratamento com MSM nas doses 1g/dia [0,79 (0,54-1,11)] e 1,5g/dia [0,62 (0,28-1,54)] em comparação com grupo VCM [1,99 (0,50-4,35)], porém não verificou essa atenuação no grupo 8G [1,19 (0,33-3,32)]

Figura 37 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano modulam a expressão gênica de SIRT-1 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

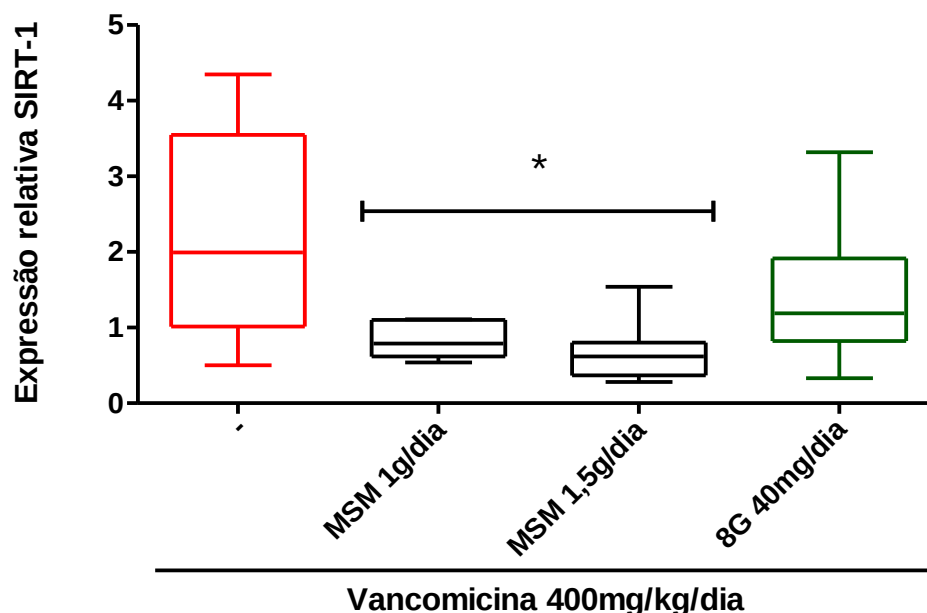
A



Os valores representam a expressão gênica de SIRT-1 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de SIRT-1 em relação ao grupo CTR. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 37 - [8]-Gingerol e Metilfenilmetano modulam a expressão gênica de SIRT-1 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss (*Continuação*)

B

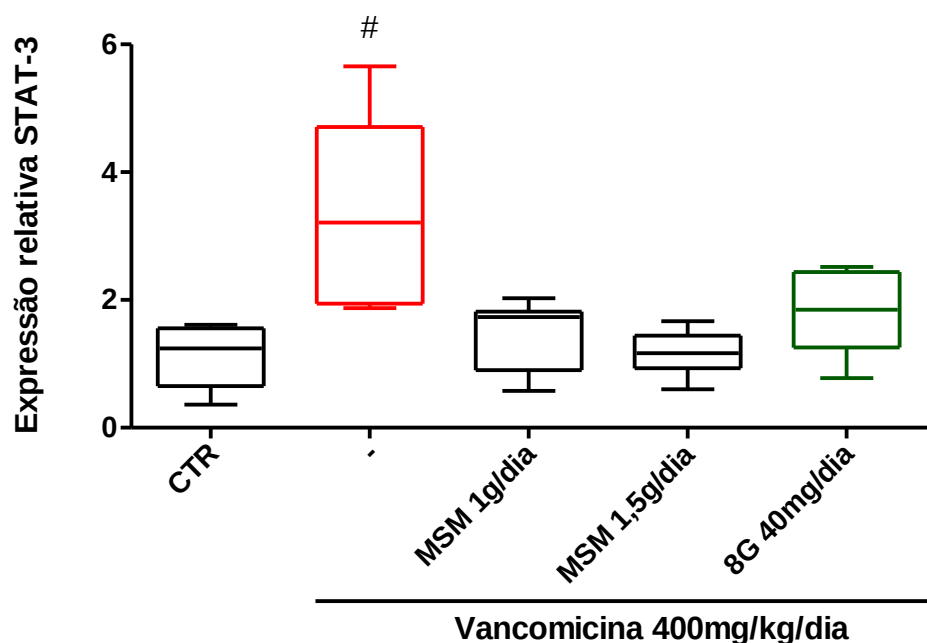


Os valores representam a expressão gênica de SIRT-1 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **B)** Expressão gênica de SIRT-1 em relação ao grupo VCM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

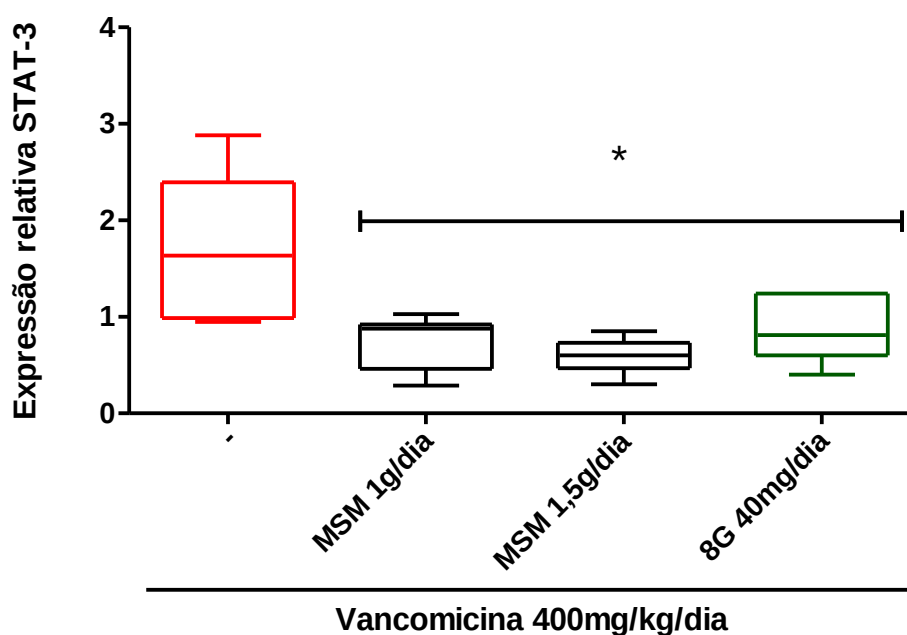
Ao analisar a expressão gênica de STAT-3, percebe-se um aumento significativo no grupo VCM [3,21 (1,87-5,66)] em relação ao grupo CTR [1,24 (0,36-1,61)], porém esse aumento não foi observado nos grupos tratamentos com 8G [1,84 (0,78-2,52)] e MSM nas doses 1g/dia [1,73 (0,58-2,03)] e 1,5g/dia [1,17 (0,60-1,67)], conforme apresentado na **Figura 38A**. Ao realizar a comparação com grupo VCM [1,63 (0,95-2,88)], percebe-se que ambos os tratamentos: 8G [0,81 (0,40-1,24)], MSM 1g/dia [0,88 (0,29-1,03)] e MSM 1,5g/dia [0,60 (0,30-0,85)] foram capazes de impedir a ativação de STAT-3 observado no grupo VCM (**Figura 38B**).

Figura 38 - [8]-Gingerol e Metilfenilmetano modulam a expressão gênica de STAT-3 na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss.

A



B



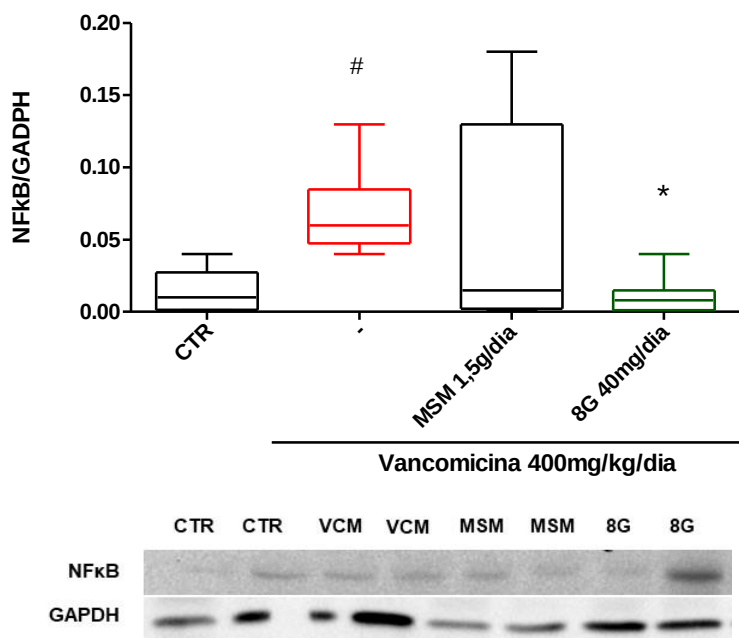
Os valores representam a expressão gênica de STAT-3 na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). **A)** Expressão gênica de STAT-3 em relação ao grupo CTR. #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. **B)** Expressão gênica de STAT-3 em relação ao grupo VCM. *P<0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

5.2.9 Os tratamentos com 8G e MSM alteram a expressão proteica de IL-1 β , NF κ B e Janus Quinase (JNK) na indução da LRA por VCM

Ao avaliarmos a expressão proteica, identificamos que os níveis de NF κ B, IL-1 β e JNK se alteram significativamente entre os grupos, conforme demonstrados nas **Figuras 39A, 39B e 39C**. Podemos observar que o grupo VCM aumentou os níveis de NF κ B [0,06 (0,04-0,13)] e JNK [0,57 (0,30-0,98)] em comparação aos seus respectivos grupos controles [0,01 (0,001-0,04)] e [0,098 (0,01-0,13)]. Não foi observado uma alteração significativa no aumento do nível de IL-1 β entre o grupo VCM e CTR. O composto 8G foi único capaz de atenuar significativamente o aumento dos níveis de NF κ B [0,008 (0,001-0,04)], IL-1 β [0,007 (0,004-0,028)] e JNK [0,024 (0,14-0,70)] em comparação aos seus respectivos grupos VCM [0,06 (0,04-0,13)], [0,05 (0,035-0,18)] e [0,57 (0,30-0,98)].

Figura 39 - [8]-Gingerol e Metilfenilmetano atenuam os níveis de expressão proteica de NF κ B, IL-1 β e JNK na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss

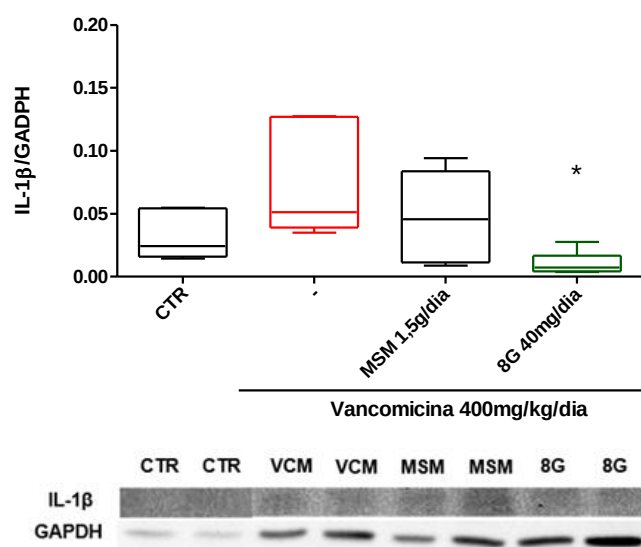
A



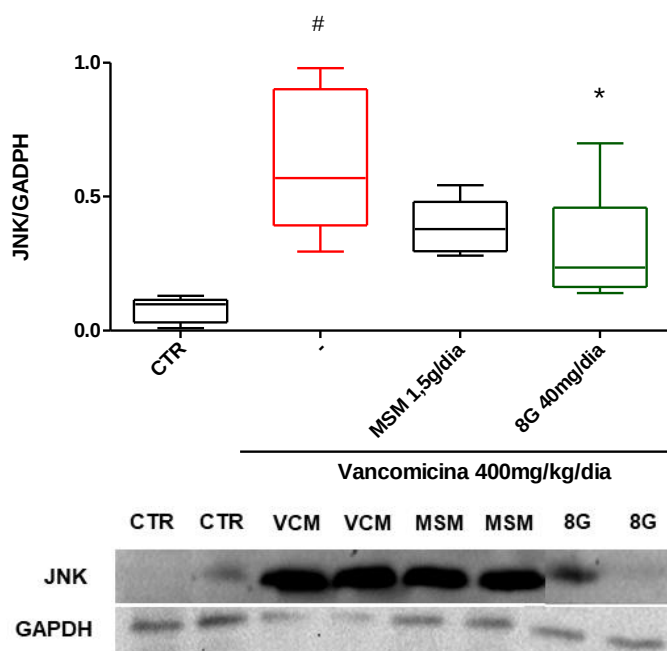
Os valores representam a expressão proteica de NF κ B (A), IL-1 β (B) e JNK (C) na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). #P< 0,05 em relação ao grupo CTR. *P< 0,05 em relação ao grupo VCM A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 40 - [8]-Gingerol e Metilfenilmetano atenuam os níveis de expressão proteica de NFkB, IL-1 β e JNK na indução da LRA por VCM em camundongos Swiss (Continuação)

B



C



Os valores representam a expressão proteica de NFkB (A), IL-1 β (B) e JNK (C) na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min – máx). #P < 0,05 em relação ao grupo CTR. *P < 0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

5.2.10 Os tratamentos com 8G e MSM alteram as estruturas histológicas na indução da LRA por VCM

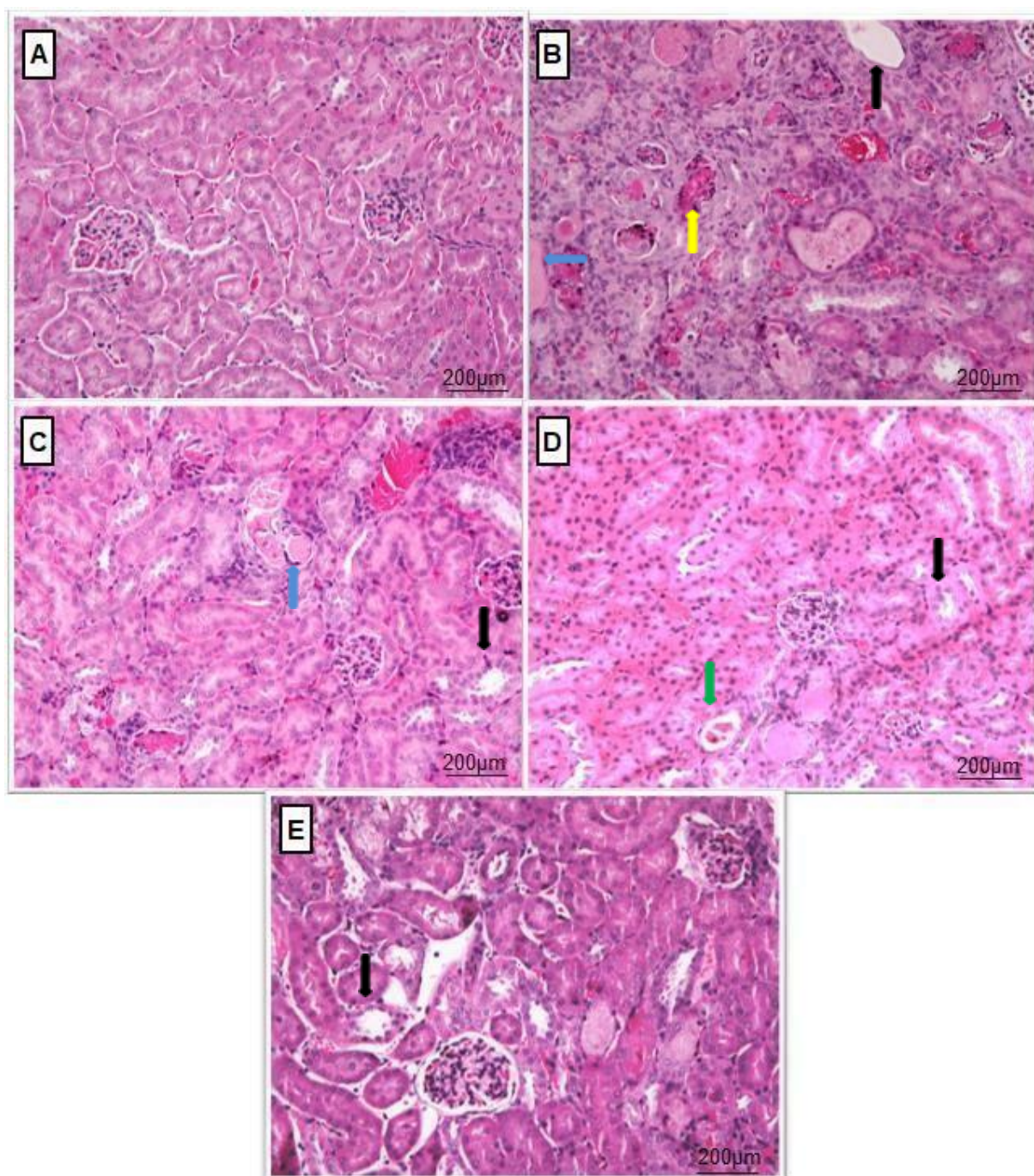
A avaliação histopatológica foi realizada com base nos seguintes escores: ausente (0), leve (1), moderado (2), grave (3) e severo (4) como demonstrado na **Tabela 05**. Foi possível observar que o grupo controle (**Figura 40A**) não apresentou alterações estruturais. O grupo VCM (**Figura 40B**) apresentou alterações de leve/grave se diferenciando estatisticamente para perda de borda, dilatação tubular, necrose tubular, infiltrado inflamatório e cilindros hialinos em comparação ao grupo controle. Os grupos tratamentos com 8G e MSM (**Figura 40C, D e E**) apresentaram leve alterações nos parâmetros analisados, se diferenciando significativamente na perda de borda em relação ao grupo VCM.

Tabela 05 - [8]-Gingerol e Metilfenilmetano atenuam as alterações histopatológicas no tecido renal na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*

Grupo	Perda de borda	Edema intersticial	Dilatação tubular	Necrose epitelial	Infiltrado inflamatório	Cilindros Hialinos
Controle	1 (1-1)	1 (1-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
VCM	3 (3-3) [#]	1 (1-2)	3 (2-3) [#]	1,5 (1-2) [#]	1 (1-2) [#]	1 (1-2) [#]
8G	1 (1-1) [*]	1 (1-1)	1,5 (1-3) [#]	1 (0-2) [#]	1 (0-1) [#]	1 (0-1) [#]
MSM 1g/dia	1 (1-1) [*]	1 (1-1)	1 (1-2)	1 (1-1) [#]	1 (1-1) [#]	1 (1-1) [#]
MSM 1,5g/dia	1 (1-1) [*]	1 (1-2)	1 (1-3)	1 (1-1) [#]	1 (1-1) [#]	1 (1-1) [#]

Os valores representam os escores microscópicos das alterações morfológicas na indução da LRA por VCM e dos tratamentos com 8G e MSM. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). [#]P < 0,05 em relação ao grupo CTR. ^{*}P < 0,05 em relação ao grupo VCM. A análise foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

Figura 40 - [8]-Gingerol e Metilsulfonilmetano atenuam as alterações histopatológicas no tecido renal na indução da LRA por VCM em camundongos *Swiss*



As figuras expressam a morfologia dos tecidos representativos dos seguintes grupos: **A (Controle)**, **B (VCM)**, **C (MSM 1g/dia + VCM)** e **D (MSM 1,5g/dia + VCM)** e **E (8G + VCM)**. Dilatação tubular (Seta preta); Necrose de células epiteliais (seta verde), elencos hialinos (seta azul), infiltrado inflamatório (seta amarela)

Tabela 06 - Resumo dos resultados encontrados na pesquisa

GRUPO	RESULTADO ENCONTRADO	
LRA (VCM)	↑	PR, CRE, URE, VO, PU, MPO, KIM-1, NGAL, IL-1 β , TNF α , CXCL-1, NF κ Bp65, HO-1, SIRT-1, STAT-3, JNK
	↓	GSH, SOD-1
[8]-gingerol	↓	PR, CRE, URE, VO, PU, NGAL, TNF α , NF κ Bp65, STAT-3, IL-1 β , JNK
	↑	SOD-1, SIRT-1
MSM 1g/dia	↓	CRE, URE, MPO, NGAL, IL-1 β , CXCL-1, SIRT-1, STAT-3
MSM 1,5g/dia	↓	PR, CRE, URE, VO, PU, MPO, KIM-1, NGAL, IL-1 β , TNF α , CXCL-1, NF κ Bp65, HO-1, SIRT-1, STAT-3

Fonte: Elaborado pelo Autor. PR: peso renal; CRE: creatinina; URE: ureia; VO: volume urinário; PU: proteína urinária

6 DISCUSSÃO

A vancomicina (VCM) é um dos antibióticos mais utilizados em ambiente hospitalar, sendo responsável por aproximadamente 35% dos pacientes hospitalizados por infecções. Dentre os vários efeitos colaterais da VCM, destaca-se a nefrotoxicidade, que pode ocorrer em 5% a 43% dos pacientes que utilizam este antibiótico (KAN et al., 2022). O presente estudo teve como objetivo, estabelecer um modelo animal de lesão renal aguda (LRA) induzida por VCM em camundongos Swiss machos e avaliar o potencial nefroprotetor do [8]-gingerol e do metilsulfonilmetano (MSM).

O composto [8]-gingerol e o MSM foram escolhidos como possíveis atenuantes da LRA induzida por VCM em virtude de suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias já descritas na literatura. O [8]-gingerol e os demais gingeróis já foram objeto de estudo por nosso grupo de pesquisa, demonstrando seu papel protetor na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e na LRA induzida por gentamicina, sepse e cisplatina (Rodrigues et al., 2014; Rodrigues et al., 2018; Santos, 2019; Silva, 2021; Ferreira et al., 2023).

Como já descrito, foi realizado um experimento inicial para estabelecer o tempo ideal de indução da LRA por VCM. Foram analisados os períodos de 3, 5 e 7 dias e realizados alguns parâmetros de análises, a fim de determinar a LRA, foram estes: peso renal, creatinina e uréia plasmáticas, MPO, GSH, marcadores moleculares de LRA, inflamação e atividade antioxidante, além de alterações morfológicas no tecido renal e variabilidade de compostos orgânicos plasmáticos.

Foi observado que houve um aumento significativo no peso renal nos períodos de 5 e 7 dias. Esse achado corrobora com dados descritos em outros estudos na literatura ao demonstrar o aumento do peso renal em camundongos que receberam administração de VCM (Takigawa et al., 2017; Takigawa et al., 2019; Yin et al., 2023). A creatinina e ureia plasmática são utilizadas como biomarcadores clínicos da avaliação da lesão renal e, no presente estudo, ambos os parâmetros bioquímicos foram alterados pela VCM, resultado esse semelhante já observado em experimentação animal e na clínica (Velez et al., 2018; Takigawa et al., 2019; He et al., 2021; Kellum et al., 2021; Altowayan et al., 2023; Deng et al., 2023).

Para avaliar o estresse oxidativo utilizamos a identificação do conteúdo de GSH como biomarcador, já que em sua forma reduzida, pode eliminar EROs

(Couto et al., 2016; Hegazy et al., 2016). Já o MPO foi utilizado como um biomarcador indireto da inflamação tecidual, por ser uma enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos (Aratani, 2018). Tem sido observado em outros estudos que a LRA causada por VCM reduz os níveis de GSH no tecido renal de ratos, assim como aumenta os níveis de MPO tecidual desses animais (Elaidy, 2013; Kandemir et al., 2018; Raza; Naureen, 2020), conforme encontrado em nosso estudo, em que esses dois parâmetros teciduais foram alterados pela VCM.

Na presente pesquisa foram avaliados marcadores moleculares precoces de LRA, inflamatório e antioxidante. O KIM-1 (molécula de injúria renal-1) é descrito como um biomarcador precoce e específico de LRA induzida por VCM, sendo um preditor de danos histopatológicos (Pais et al., 2020; Kim et al., 2021). Foi observado que a IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória, teve seus níveis elevados em tecido renal de animais tratados com VCM (Kandemir et al., 2018). A SOD1 e a HO-1 são marcadores de estresse oxidativo, que têm seus parâmetros alterados após o tratamento com VCM, os níveis de SOD1 são reduzidos e o de HO-1 aumentados (Dieterich et al., 2009; Pais et al., 2020; He et al., 2021). Em nossa pesquisa, todos esses parâmetros foram alterados nos animais após a administração da VCM.

No geral, nossos resultados sugerem que, ao reduzir a atividade antioxidante (redução de SOD1), a VCM pode aumentar a produção de ERO. A disfunção do estresse oxidativo pode ser responsável, pelo menos em parte, para o desenvolvimento da necrose tubular observada.

Os achados histopatológicos em nosso estudo estão de acordo com o que a literatura relata em relação ao dano tecidual ocasionado pela VCM, apresentando degeneração de células epiteliais tubulares, como necrose e perda da borda em escova, alterações tubulares como a vacuolização, dilatação e a formação de cilindros, e infiltrado inflamatório (Pais et al., 2019; He et al., 2021; Deng et al., 2023). O resultado de variabilidade de compostos orgânicos (metabólicos) encontrados no presente estudo corroboram o resultado encontrado na avaliação da creatinina plasmática.

Estudos recentes têm investigado o perfil metabólico relacionado à LRA, no intuito de uma identificação mais precoce e específica da lesão renal. Conforme destacado por Lao e colaboradores (2022), o perfil plasmático permite identificação precoce de alterações metabólicas, em especial alterações lipídicas, apresentando vantagens sobre a utilização da urina para análises de metabólitos

(Lao et al., 2022).

Os resultados do presente estudo demonstram alterações metabólicas plasmáticas significativas em camundongos tratados com VCM, em especial a partir do quinto dia, a análise revelou elevações de glicose, citrato e creatinina. Esses achados são consistentes com os descritos por Cao e colaboradores (2022), que analisaram os metabólitos em urina de ratos, observando aumento no número de biomarcadores com o tempo (15, 22 e 37 nos dias 2, 4 e 7). As vias alteradas incluem o ciclo da ureia, o metabolismo de arginina/prolina e o ciclo do ácido cítrico, confirmando também um padrão de toxicidade dependente do tempo de exposição (Cao et al., 2022). Alguns estudos obtiveram resultados semelhantes, onde foram observadas alterações no metabolismo de aminoácidos, do ácido cítrico, além de processos relacionados à inflamação e ao estresse oxidativo. Demonstraram ainda, que a VCM acumula-se nos túbulos e promove a liberação de lisofosfolípeos, sugerindo dano à membrana plasmática (Du et al., 2020; Cui et al., 2022). Esses resultados corroboram com o presente estudo, onde podemos observar que a nefrotoxicidade induzida pela VCM está envolvida ao estresse metabólico, disfunção renal e comprometimento energético.

Todos os parâmetros anteriormente mencionados, foram alterados pela administração de VCM durante 7 dias na dose de 400 mg/kg/dia, enquanto apenas alguns foram alterados nos períodos de 3 e 5 dias. Dessa forma, o período 7 dias de indução foi escolhido para dar prosseguimento com os tratamentos com [8]-gingerol e MSM. A dose de [8]-gingerol administrada foi a de 40 mg/kg/dia, na qual foi dividida em duas doses de 20 mg/kg, enquanto que para o MSM foram testadas duas doses, 1 g/kg/dia e 1,5 g/kg/dia, nas quais eram divididas em duas doses de 500 mg/kg e 750 mg/kg, respectivamente.

Nosso grupo de pesquisa possui um histórico em estudos com gengibre e seus derivados. Já foi demonstrado que uma fração enriquecida com gingeróis apresentou ação nefroprotetora frente à nefrotoxicidade induzida pela gentamicina em animais (Rodrigues et al., 2014). Em outro estudo foi observado que o [6]-gingerol e o [10]-gingerol suprimiram a LRA causada pela sepse em modelo de experimentação animal; (Rodrigues et al., 2018). Demonstramos que com o [8]-gingerol e [10]-gingerol apresentaram papel uroprotetor na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (Ferreira et al., 2023), e o composto [8]-gingerol apresentou ação nefroprotetora na LRA induzida por cisplatina (Santos, 2019).

O MSM por sua vez, é amplamente utilizado em suplementação dietética devido a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, principalmente em casos de artrose e artrite reumatóide (Ahn et al., 2015; Karabay et al., 2016; Kim et al., 2023; Akpinar et al., 2024; Choi et al., 2024). No estudo mencionado anteriormente, Rodrigues e colaboradores (2018) propuseram que a LRA induzida por sepse foi suprimida devido à modulação do metilsulfonilmetano e da dimetilglicina pela administração de [6]-gingerol e [10]-gingerol. A partir desses achados hipotetizamos que estes compostos, tanto o [8]-gingerol como o MSM, poderiam ser eficazes em atenuar a LRA induzida por VCM.

Partindo desse achado que demonstrou o envolvimento do MSM produzido de forma endógena, despertou a necessidade por parte do nosso grupo de pesquisa a investigar seus efeitos no percurso na nefrotoxicidade desencadeada por fármacos. Recentemente foi investigado e demonstrado que o MSM se mostrou um composto de uso seguro, com toxicidade baixa e IC₅₀ de 42,25 mg/mL para as células renais humanas e apresentando ação nefroprotetora frente à lesão renal por VCM (Rodrigues, 2022).

Inicialmente foi avaliado nos grupos experimentais com tratamentos o peso renal, onde foi possível observar que houve uma hipertrofia nos rins dos animais do grupo lesionado, corroborando com os achados histopatológicos mencionados anteriormente, como a dilatação e a vacuolização tubulares. Esse evento pode ocorrer como uma forma de compensação, para que os rins possam tentar recuperar sua capacidade de filtração (Zhang et al., 2022). No presente estudo, tanto a dose de 1,5 g/dia do MSM quanto o [8]-gingerol causaram uma diminuição significativa no peso renal em comparação ao grupo lesionado. Já foi observado que o extrato alcoólico do gengibre foi capaz de atenuar o aumento de peso renal na nefropatia diabética induzida por estreptomicina (Tzeng et al., 2013).

A presente pesquisa também investigou os efeitos do MSM e do [8]-gingerol nas funções renais dos animais após a indução de LRA por VCM. Foi possível observar que ambas as doses de MSM e o [8]-gingerol foram capazes de diminuir significativamente os níveis de creatinina e uréia plasmática, corroborando assim com achados na literatura, que indicam que o MSM foi capaz de melhorar os parâmetros de função renal em um modelo de LRA induzida por glicerol em ratos, assim como o [8]-gingerol exerceu o mesmo papel na LRA induzida por cisplatina em camundongos (Al Laham, 2018; Santos, 2019).

Foi possível ainda observar que o volume urinário no grupo lesionado aumentou em relação ao grupo controle. Já os tratamentos com MSM na dose de 1,5 g/dia e [8]-gingerol, respectivamente, diminuíram esse volume em relação ao grupo lesionado. Da mesma forma, o *clearance* de creatinina foi avaliado e observamos que houve uma melhora no *clearance* de aproximadamente 74,90%, 53,32% e 46% respectivamente para os grupos MSM 1 g/kg/dia, MSM 1,5 g/kg/dia e [8]-gingerol 40mg/kg/dia.

Ainda se tratando da função renal, foi avaliado a proteinúria, que apresentou seu nível elevado na LRA induzida pela VCM, porém seus níveis foram reduzidos com os tratamentos com MSM na dose de 1,5 g/dia e [8]-gingerol. Resultados semelhantes foram encontrados somente em estudos com os compostos provenientes do gengibre (Rodrigues et al., 2018; Santos, 2019).

Podemos então sugerir que os tratamentos com os compostos do gengibre exibem efeitos renoprotetores, aumentando a TFG, seguido por reduções nos níveis de creatinina e ureia plasmática e atenuando a proteína urinária. Tais achados corroboram com os resultados encontrados em outros estudos (Tzeng et al., 2013; Rodrigues et al., 2018), melhorando assim a disfunção tubular induzida pelo tratamento com Vancomicina.

Se tratando de marcadores clássicos e específicos de avaliação da função renal, assim como biomarcadores precoces da LRA, como a expressão gênica de KIM-1 e NGAL, o presente trabalho apresentou resultados importantes, pois o tratamento com MSM foi capaz de reduzir parcialmente a expressão de KIM-1 e NGAL, resultado ainda inédito na literatura.

A NGAL é um marcador de lesão tubular distal que é regulado positivamente quando as células tubulares são estruturalmente danificadas e é um biomarcador precoce de vários insultos isquêmicos, sépticos ou nefrotóxicos ao rim (Lago et al., 2016; Moledina et al., 2017), e seu aumento foi encontrado após a administração de VCM. E ambos os tratamentos (MSM e 8G) reduziram sua expressão.

Diante disso tem sido demonstrado que o tratamento com extrato de gengibre diminui a concentração de NGAL urinário na nefrotoxicidade induzida por contraste iodado (Sherif et al., 2018) e o tratamento com [6]-gingerol atenuou a expressão gênica de KIM-1 na nefrotoxicidade por cisplatina (Silva, 2021), mas resultados semelhantes não tinham sido observados após administração com o [8]-

gingerol no mesmo modelo de lesão renal (Santos, 2019).

Vários marcadores inflamatórios foram avaliados no presente estudo, a fim de compreendermos o possível mecanismo de ação do MSM e do [8]-gingerol. Porém, para um melhor entendimento desses mecanismos, é preciso mencionar a correlação entre esses marcadores inflamatórios.

O NFkB é um fator de transcrição nuclear que está envolvido no processo inflamatório, estresse oxidativo e apoptose. A via do NFkB pode ser ativada por estresse oxidativo, ocasionando a produção de citocinas e quimiocinas, como o TNF α , CxCL-1 e IL1 β (Zhao et al., 2022). O TNF α causa dano renal através da indução de apoptose em células epiteliais, células tubulares e células mesangiais, isso pode ser inibido através do bloqueio dessa citocina (Lin et al., 2021).

Já a quimiocina CxCL-1 exerce uma função essencial no recrutamento de neutrófilos, faz parte da família CXC sendo produzida por células epiteliais do túbulo renal, exercendo função importante no processo inflamatório. Essa quimiocina pode ativar a infiltração de neutrófilos até o local lesionado (Huang et al., 2006; Ravindran et al., 2013; Burke et al., 2014). Desta forma, sua ativação pode elevar os níveis da enzima MPO. A IL-1 β é uma citocina secretada principalmente por infiltrado de leucócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos), podendo induzir a produção de EROs em células epiteliais tubulares (Lin et al., 2021).

Como já mencionado anteriormente a NGAL é um membro da superfamília da lipocalina, possuindo diversas funções, como indução da apoptose, supressão do crescimento bacteriano e modulação da resposta inflamatória. Essa molécula já se mostrou ser um bom biomarcador precoce para LRA causada por VCM e sendo ativada pela via do NFkB. Porém, ela também ativa a via do NFkB gerando uma retroalimentação, elevando ainda mais o processo inflamatório, sendo possivelmente o motivo pelo qual o NGAL se eleva em pacientes com LRA de qualquer origem (Bahmani et al., 2010; Hjortrup et al., 2013).

Na presente pesquisa a administração VCM elevou a expressão gênica de NFkB, TNF- α , CxCL-1, MPO, IL-1 β . Porém, foi possível observar que o tratamento com MSM na dose de 1,5 g/dia e o [8]-gingerol foram capazes de diminuir significativamente a expressão de NFkB em relação ao grupo controle e a expressão de TNF- α em relação ao grupo lesionado. Já em relação à expressão do CxCL-1, somente os tratamentos com MSM, nas duas doses avaliadas, foi capaz de diminuir a expressão dessa quimiocina. Da mesma forma, o MSM foi capaz de reduzir a

concentração de MPO no tecido renal e somente o MSM na dose de 1,5 g/dia foi capaz de atenuar a expressão de IL-1 β em relação ao grupo controle e nas duas doses avaliadas em relação ao grupo lesionado.

Ao realizamos a expressão proteica para NF κ B e IL-1 β , percebemos que somente o tratamento com o [8]-gingerol foi capaz de atenuar os níveis desses marcadores inflamatórios, corroborando assim com diversos achados já demonstrados aqui, no qual apresentam as propriedades anti-inflamatórias provenientes do gengibre e de seus componentes.

Esses resultados corroboram com achados encontrados na literatura, onde o [8]-gingerol por via oral diminuiu as concentrações de TNF- α em modelo de colite ulcerativa em ratos (Zhang et al., 2017) e em outro estudo com um modelo de lesão semelhante, onde foi demonstrado que o tratamento com [6]-gingerol diminuiu as expressões de NF κ B, TNF- α , IL1 β (Ajayi; Adedara; Farombi, 2018). E o MSM já foi relatado como uma molécula capaz de inibir a sinalização do NF κ B, atenuando a expressão de IL-1 β , TNF α e IL-6 em células RAW264.7 (cultura de macrófagos) (AHN et al., 2015).

Tem sido observado que gingeróis e shogaols presentes no rizoma do gengibre diminuem os marcadores hepáticos de inflamação ao inibir a atividade do NF κ B após o consumo de uma dieta rica em gordura (Li et al., 2012). E a inibição do TNF α leva à modulação da resposta inflamatória, resultando na regulação negativa da sinalização do NF κ B.

Estudos realizados por Amirshahrokhi e Khalili (2017) demonstraram que o tratamento com MSM apresentou efeito protetor na colite ulcerativa atenuando os níveis de IL-1 β , TNF α e MPO. Além disso, a capacidade do MSM de inibir as citocinas pró-inflamatórias foi demonstrada em modelos de obesidade em camundongos e em células de câncer de cólon (Karabay et al., 2016; Sousa-Lima et al., 2016).

Dessa forma, os resultados encontrados no presente estudo, em que o MSM diminui a expressão de CXCL-1, assim como a concentração de MPO está de acordo com os achados na literatura, visto que CXCL-1 é ativado por NF κ B e pode elevar os níveis de MPO no tecido renal, pois tem sido relatado que o efeito protetor do MSM está relacionado a uma redução na via de sinalização do NF κ B, onde o efeito inibitório do MSM na ativação do NF κ B resulta na regulação negativa na expressão para IL-1, TNF- α (Butawan et al., 2017) e, consequentemente, na

expressão de CXCL-1.

Nossos resultados demonstraram que a VCM diminuiu a expressão de SOD1 e aumentou a expressão de HO-1, porém não alterou a expressão de NrF2. Sabe-se que essas enzimas antioxidantes podem ser ativadas através da via do fator nuclear eritroide 2 (NrF2), protegendo a célula de substâncias endógenas, toxinas e radiação (Huang et al., 2015; Silva, 2021).

Apenas o composto [8]-gingerol foi capaz de elevar a expressão de SOD1 ao patamar do grupo controle. Porém, o MSM nas duas doses avaliadas e o [8]-gingerol mantiveram a expressão de HO-1 no patamar do grupo controle. Já foi relatado na literatura que os compostos de gingeróis elevam os níveis de HO-1 em modelo de lesão hepática por sepse em camundongos (Hong et al., 2020) no qual se diverge com o nosso resultado, assim como o extrato aquoso do gengibre eleva a atividade de SOD (Zammel et al., 2021), conforme encontrado no presente estudo.

O MSM é muito conhecido por sua atividade antioxidante, tendo a capacidade de aumentar a concentração de enzimas antioxidantes como a SOD (Amirshahrokhi; Bohlooli; Chinifroush, 2011; Bohlooli et al., 2013; Amirshahrokhi; Khalili, 2017), mas esse resultado não foi evidenciado em nosso estudo.

Contudo, quando analisamos os resultados da HO-1 nos grupos tratamentos, verificamos que nenhum apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Devemos enfatizar que nosso tratamento é realizado pré e pós a administração de VCM e que os níveis de HO-1 se elevam apenas em decorrência de uma resposta ao estresse oxidativo e lesão renal, como um mecanismo de defesa do rim. Ou seja, nos grupos tratados não foi necessário ativar esse mecanismo de defesa devido ao tratamento que já estava sendo realizado. Trabalho realizado por Silva (2021) apresentou resultados semelhantes com o [6]-gingerol no modelo de nefrotoxicidade por cisplatina.

Sirtuina-1 ou SIRT-1 é uma proteína desacetilase dependente de NAD⁺, altamente expressa no rim, sendo necessária para muitos processos biológicos como, reparo de DNA, apoptose, estresse oxidativo, inflamação, autofagia e homeostase mitocondrial. SIRT-1 modular uma variedade de proteínas como o NFκB, exercendo efeitos anti-inflamatórios através da inativação dessa via por desacetilação da subunidade p65 do NFκB, inibindo a atividade transcricional do NFκB, reduzindo a inflamação e proporcionando proteção ao rim (Kauppinen et al., 2013). E estudos têm demonstrado que SIRT-1, juntamente com HO-1, são

reguladas positivamente pelas ERO e atuam inibindo a expressão de NFkB na prevenção de lesões em múltiplos órgãos em ratos com choque hemorrágico (He et al., 2021).

Evidências sugerem que o SIRT-1 está envolvido em várias doenças renais, incluindo LRA, doença renal diabética, doença renal do envelhecimento, entre outras, fornecendo proteção contra estresses celulares associados à lesão renal (Gao et al., 2014; Zhong et al., 2018; Ye et al., 2021). Foi demonstrado que o SIRT-1 pode interagir com STAT-3 através do fator de transcrição FOXO. Isso ocorre pois SIRT-1 pode agir sobre FOXO, acetilando ou desacetilando esse fator de transcrição, dessa forma ele pode ativar ou desativar FOXO. Em contrapartida FOXO pode regular a expressão de SIRT-1 através de um feedback positivo ou negativo (Kobayashi et al., 2004; Xiong et al., 2011). Já o STAT-3 pode ativar ou não a expressão de FOXO, como foi demonstrado por Ho e colaboradores (2011) onde células deficientes em STAT-3 teriam uma regulação negativa de FOXO1 e FOXO3a (Oh et al., 2011). Dessa forma, partimos do princípio que a ativação ou desativação da expressão de STAT-3 pode ativar ou desativar a expressão de SIRT-1. Nosso estudo demonstrou que o MSM, diminuiu a expressão de STAT-3 e por consequência de SIRT-1.

STAT-3 é um membro de uma família de proteínas composta por sete membros. Essa família de proteínas faz parte da via de sinalização JAK/STAT expressa em células e participam de vários processos biológicos vitais, como proliferação celular, diferenciação, apoptose, regulação imunológica e inflamação (Weimbs; Talbot, 2013; Yu et al., 2023) e além de ter um papel fundamental na transcrição de muitas respostas inflamatórias envolvidas em lesões renais (Chuang e He 2010), assim como estudo demonstrado por Hassanein e colaboradores (2020), que apontou o papel da via JAK/STAT-3 na nefrotoxicidade induzida por gentamicina.

Alguns estudos evidenciaram que a via JAK2/STAT-3 é ativada com a inativação da via Nrf2/HO-1 promovendo o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Maumoud et al., 2019; Tong et al., 2021). Demonstramos também que o SIRT-1 e STAT-3 tiveram suas expressões elevadas com o tratamento com VCM. Porém, o MSM nas doses avaliadas não alterou as expressões de mRNA de SIRT-1 e STAT-3 desencadeado pela VCM. Como foi observado, a administração de VCM aumentou a expressão de SIRT-1 e pressupomos que esse aumento seja em virtude

de um mecanismo compensatório renal na busca de debelar o processo inflamatório/oxidativo que está sendo desencadeado pelo efeito lesivo da VCM e pelo próprio rim apresentar fisiologicamente uma alta expressão de SIRT-1, contudo esse efeito compensatório não foi necessário já que o MSM evitou que esse efeito fosse ativado.

O composto [8]-gingerol foi capaz de aumentar a expressão de SIRT-1 em relação ao grupo controle. Um achado interessante e diferente do MSM, já que a expressão de SIRT-1 permaneceu aumentada e mantida com o tratamento [8]-gingerol. Supomos então que além da ação compensatória do próprio órgão renal, o composto de [8]-gingerol poderia estar envolvido nesse processo, pois já foi demonstrado que o [6]-gingerol foi capaz de ativar SIRT-1 no modelo de fibrose pulmonar (Liu et al., 2022).

Já a expressão de STAT-3 foi atenuada pelos compostos [8]-gingerol e por ambas as doses de MSM. Já foi relatado que o MSM regula negativamente a via do STAT-3, suprimindo o crescimento de câncer (Lim et al., 2012) e [8]-gingerol inibiu atividade de sinalização de STAT-3 suprimindo a proliferação e migração celular no câncer de cólon retal (Hu et al., 2019). Outros achados foram observados no modelo de cistite hemorrágica por ifosfamida, no qual foi demonstrado que os compostos [8]-gingerol e [10]-gingerol aumentaram a expressão de STAT-3, pressupondo que a ação protetora observada na bexiga poderia estar ocorrendo pela ativação da via de sinalização JAK/STAT/FOXO mediada pela expressão da IL-10 (Ferreira et al., 2023). No presente estudo acreditamos que no grupo tratado com [8]-gingerol, STAT-3 teve sua expressão reduzida através da via MAPK/STAT/NFκB, estudos já demonstraram que o STAT-3 pode ser ativado diretamente pela via MAPK sem a necessidade da via JAK (Lim et al., 2001; Kopantzev et al., 2002). Já o aumento da expressão de SIRT-1, acreditamos ter ocorrido através da via AMPK/SIRT-1/FOXO, onde alguns estudos já demonstraram que o AMPK regula a expressão de SIRT-1, como no estudo de Elmorsy e colaboradores (2024) onde evidenciaram que a ativação dessa via reduz coliti crônica em ratos (Cantó et al., 2009; Elmorsy et al., 2024).

Evidências indicam que a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) desempenha um papel importante na inflamação, apoptose e ativação de caspases em danos renais induzidos pela VCM (Malik et al., 2015; Lu et al., 2017), por essa razão medimos a expressão proteica da quinase Jun N-Terminal

(JNK). Nossos resultados demonstraram que a VCM aumentou a expressão de JNK e que o tratamento com [8]-gingerol atenuou essa expressão, indicando que essa via de sinalização poderia estar relacionada à lesão renal induzida por VCM.

Tem sido demonstrado que o bloqueio da cascata JNK desempenha um papel importante na proteção renal perante a um processo de citotoxicidade oxidativa na nefrotoxicidade induzida por cisplatina (Lee et al., 2017), assim como, composto proveniente do gengibre exerce efeitos anti-inflamatórios e antiapoptóticos para atenuar a lesão hepática de isquemia/reperfusão regulando a via de sinalização P38/JNK (YU et al., 2024) e proteção contra a nefrotoxicidade induzida por quimioterápico, apresentando propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiapoptóticas, possivelmente por meio da inibição dessa mesma via (Han et al., 2022).

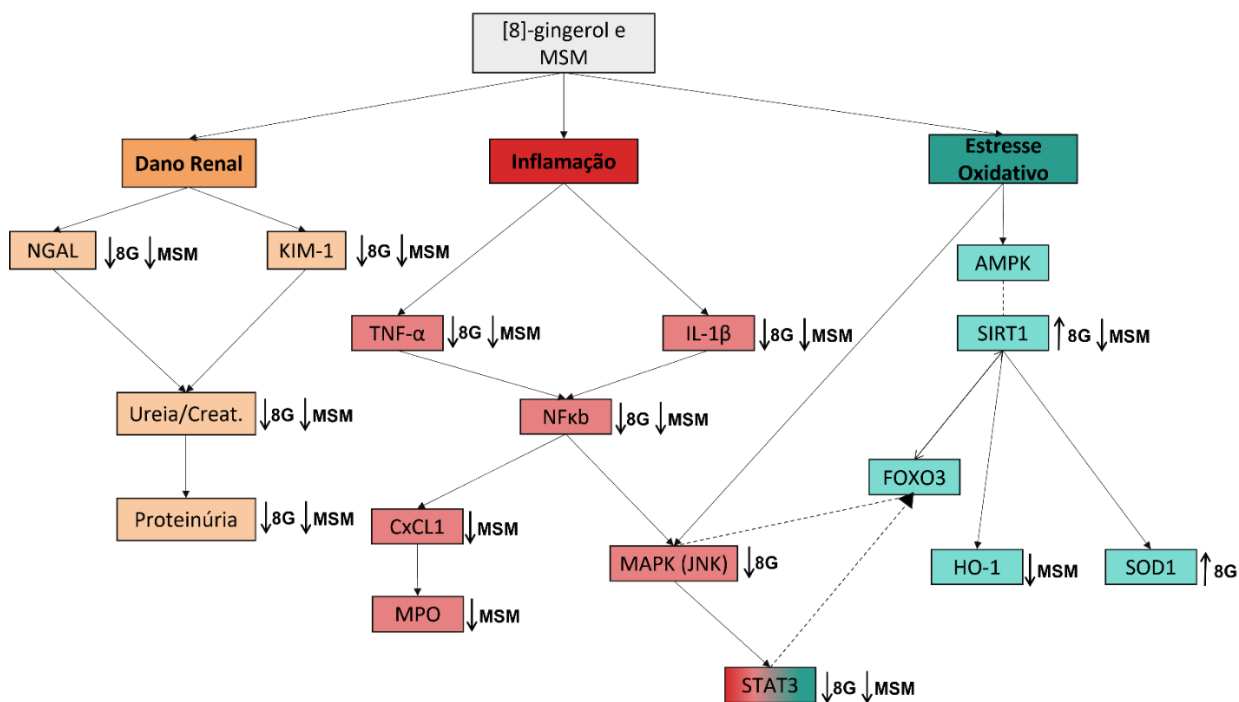
Nossos achados histopatológicos demonstram que somente no parâmetro de perda de borda foi observado que os tratamentos com [8]-gingerol e MSM atenuaram tal parâmetro. Resultados parciais semelhantes foram encontrados por Kuhad et al. (2006) e Nasri et al. (2013), ao demonstrarem que os compostos de gingeróis não reduziram completamente os escores de alterações histopatológicas. Alguns estudos apontam que a elevação da expressão gênica de KIM-1 e NGAL, pode estar relacionada a danos estruturais nas células tubulares e consequentemente à preservação da borda em escova (Wasilewska et al., 2011; Bank et al., 2017). Nosso estudo conseguiu diminuir a expressão desses genes, assim como a preservação da borda em escova, como mostrado nos resultados histopatológicos. A preservação dessa estrutura pode indicar que as células do túbulo proximal foram protegidas de maneira estrutural e funcional, mantendo a sua função de reabsorção de eletrólitos e água preservadas (Ho; Morgan, 2022).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o modelo de LRA por VCM foi reproduzido/caracterizado com sucesso, sendo estabelecido o tempo de indução de 7 dias que melhor desencadeou a fisiopatologia da lesão, alterando todos os parâmetros da função renal avaliados.

O composto [8]-gingerol e MSM foram capazes de proteger os danos desencadeados pela VCM, atenuando os parâmetros renais, inflamatórios e antioxidante. No presente estudo hipotetizamos que o [8]-gingerol agiu bloqueando vias inflamatórias como a do TNF- α e NF- κ B, assim como ativando vias antioxidantes tal qual AMPK e SOD-1. Acreditamos ainda, que o [8]-gingerol teria sua ação renoprotetora relacionada com a expressão de SIRT-1, visto que esse composto foi capaz de diminuir a expressão de STAT-3 e JNK, que regulam negativamente a sua expressão.

Figura 41 – Mapa integrativo das alterações moleculares observadas no modelo de nefrotoxicidade por vancomicina tratada com [8]-gingerol (8-G) e metilsulfonilmetano (MSM)



Fonte: Adaptado de KEGG (2025). Setas contínuas representam efeitos observados experimentalmente; linhas tracejadas representam conexões inferidas a partir da literatura. Cores indicam a categoria funcional: amarelo = marcadores de dano renal (NGAL, KIM-1, Ureia/Creatinina, Proteinúria); vermelho = mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, JNK, STAT3); verde = vias de proteção antioxidante/metabólica (AMPK, SIRT1, FOXO3, SOD1, HO-1). Observou-se que [8]-gingerol aumentou SIRT1 e SOD1 e reduziu STAT3, JNK, NF- κ B e IL-1 β , enquanto MSM reduziu estes mesmos marcadores e também SIRT1. As ligações AMPK→SIRT1 e MAPK→STAT3 são mostradas como hipóteses baseadas em literatura.

REFERÊNCIAS

- AHMED, R. S.; SETH, V.; PASHA, S. T.; BANERJEE, B. D. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 38, p. 443–450, 2000.
- AHMIDA, M.H. Protective role of curcumin in nephrotoxic oxidative damage induced by vancomycin in rats. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 64, n. 3, p. 149–153, 2012. AHN, H.; KIM, J.; LEE, M.-J.; KIM, Y. J.; CHO, Y.-W.; LEE, G.-S. Methylsulfonylmethane inhibits NLRP3 inflammasome activation. **Cytokine**, v. 71, p. 223–231, 2015.
- AJAYI, B. O.; ADEDARA, I. A.; FAROMBI, E. O. Protective mechanisms of 6-gingerol in dextran sulfate sodium-induced chronic ulcerative colitis in mice. **Hum Exp Toxicol.**, v. 37, n. 10, p. 1054–68, 2018.
- AJAYI, B. O.; ADEDARA, I. A.; FAROMBI, E. O. Pharmacological Activity of 6-Gingerol in Dextran Sulphate Sodium-induced Ulcerative Colitis in BALB/c Mice. **Phytother Res.**, v. 29, n. 4, p. 566-7, 2015.
- AKPINAR, K.; ŞİMŞEK, E. K.; ÖZEN, Ö. I.; HABERAL, B. The effect of MSM in the treatment of ankle arthrosis: Is MSM as effective as methylprednisolone or hyaluronic acid? **J Orthop Res.** v. 42, n. 7, p. 1527-1535, 2024.
- AL LAHAM, S. A. The curative effects of methylsulfonylmethane against glycerol-induced acute renal failure in rats. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 54, n. 01, 2018. ALHARBI, K. S.; NADEEM, M. S.; AFZAL, O.; ALZAREA, S. I., et al. Gingerol, a Natural Antioxidant, Attenuates Hyperglycemia and Downstream Complications. **Metabolites**, v. 12, 2022.
- ALTOWAYAN, W. M.; MOBARK, M. A.; ALHARBI, A.; ALDUHAMI, A. A.; RABBANI, S. I. The influence of vancomycin on renal functions, the predictors and associated factors for nephrotoxicity. **PLoS One.** v. 18, n. 4, e0284223, 2023.
- AMIRSHAHROKHI, K.; BOHLOOLI, S. Effect of Methylsulfonylmethane on ParaquatInduced Acute Lung and Liver Injury in Mice. **Inflammation**, v. 36, n. 5, p. 1111-21, 2013.
- AMIRSHAHROKHI, K.; BOHLOOLI, S.; CHINIFROUSH, M. M. The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, p. 197–202, 2011.
- AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A. Methylsulfonylmethane is effective against gastric mucosal injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 811, p. 240–248, 2017.
- BAG, B. Ginger Processing in India (*Zingiber Officinale*): A Review. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.**, v. 7, p. 1639–165, 2018.
- BAHMANI, P.; HALABIAN, R.; ROUHBAKHSH, M. ROUSHANDEH, A. M.; MASROORI, N.; EBRAHIMI, M.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; SHOKRGOZAR, M.

A.; ROUDKENAR, M. H. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin induces the expression of heme oxygenase-1 and superoxide dismutase 1, 2. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, n. 4, p. 395-403, 2010.

BALLESTER, P.; BEGOÑA CERDÁ, B.; ARCUSA, R.; MARHUENDA, J.; YAMEDJEU, K.; ZAFRILLA, P. Effect of Ginger on Inflammatory Diseases. **Molecules**, v. 27, 2022.

BAMGBOLA, O. Review of vancomycin-induced renal toxicity: an update. **Ther. Adv. Endocrinol. Metabs.**, v. 7, p. 136-147, 2016.

BANK, J. R.; VAN DER POL, P.; VREEKEN, D.; MONGE-CHAUBO, C.; BAJEMA, I. M.; SCHLAGWEIN, N.; VAN GIJLSWIJK, D. J.; VAN DER KOOIJ, S. W.; REINDERS, M. E. J.; DE FIJTER, J. W.; VAN KOOTEN, C. Kidney injury molecule-1 staining in renal allograft biopsies 10 days after transplantation is inversely correlated with functioning proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*, v. 32, n. 12, p. 2132-2141.

BARRETO, A. C. TOSCANO, B. A. F.; FORTES, R. C. Efeitos do gengibre (*Zingiber officinale*) em pacientes oncológicos tratados com quimioterapia. **Com. Ciências Saúde**, v. 22, n. 3, p. 257-270, 2011.

BERNARD, M.; FURLONG, S.J.; COOMBS, M.R.P.; HOSKIN, D.W. Differential Inhibition of T Lymphocyte Proliferation and Cytokine Synthesis by [6]-Gingerol, [8]-Gingerol, and [10]-Gingerol. **Phytother. Res.**, v. 29, p. 1707–1713, 2015.

BOHLOOLI, S.; MOHAMMADI, S.; AMIRSHAHROKHI, K., MIRZANEJAD-ASL, H.; YOSEFI, M.; MOHAMMADI-NEI, A.; CHINIFROUSH, M. M. Effect of Methylsulfonylmethane Pretreatment on Aceta-minophen Induced Hepatotoxicity in Rats. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 16, n. 8, p. 896–900, 2013.

BRADLEY, P.P. et al. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982

BRUNTON, L. L., ed. **Goodman & Gilman as Bases farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUFKIN, K. B.; KARIM, Z. A.; SILVA, J. Review of the limitations of current biomarkers in acute kidney injury clinical practices. **SAGE Open Medicine**, v. 12, p. 1–10, 2024.

BUTAWAN, M.; BENJAMIN, R.L.; BLOOMER, R. J. Methylsulfonylmethane: Applications and Safety of a Novel Dietary Supplement. **Nutrients**, v. 9, n. 3, 2017.

CAMPBELL, R. E.; CHEN, C. H.; EDELSTEIN, C. L. Overview of Antibiotic-Induced Nephrotoxicity. **Kidney International Reports**, v. 8, p. 2211–2225, 2023.

CANTÓ, C.; GERHART-HINES, Z.; FEIGE, J. N.; LAGOUGE, M.; NORIEGA, L.; MILNE, J. C.; ELLIOTT, P. J.; PUIGSERVER, P.; AUWERX J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*.

2009 Apr 23;458(7241):1056-60.

CAO, P.; KANG, Y.; LIU, J.; LIU, X.; JIN, Y.; ZHANG, Z. Urinary metabolomics study of vancomycin-associated nephrotoxicity based on ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Human & Experimental Toxicology**, v. 41, 2022.

CAPÓ, J. T.; FIGUEREDO, Y. N.; FERNÁNDEZ, S. A.; DOMÍNGUEZ, C. C. Actividad antiinflamatoria de compuestos liposolubles de Zingiber officinale Roscoe frente a diferentes agentes flogísticos. **Rev Cubana Plant Med.**, v. 12, n. 2, 2007.

CARRENO, J. J.; KENNEY, R.M.; LOMAESTRO, B. Vancomycin-associated renal dysfunction: where are we now?. **Pharmacotherapy**, v. 34, p. 1259-1268, 2014. CHANG-PANESSO, M. Acute kidney injury and aging. **Pediatr Nephrol.** v. 36, n. 10, p. 2997–3006, 2021.

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169–176, 2020.

CUI, C.; ZHU, L.; WANG, Q.; LIU, R.; XIE, D.; GUO, Y.; YU, D.; WANG, C.; CHEN, D.; JIANG, P. A GC-MS-based untargeted metabolomics approach for comprehensive metabolic profiling of vancomycin-induced toxicity in mice. **Heliyon.**, v. 8, n. 7, 2022.

DENG, Y. X.; LIU, K.; QIU, Q. X.; TANG, Z. Y.; QUE, R. M.; LI, D. K.; GU, X. R.; ZHOU, G. L.; WU, Y. F.; ZHOU, L. Y.; YIN, W. J.; ZUO, X. C. Identification and validation of hub genes in drug induced acute kidney injury basing on integrated transcriptomic analysis. **Front Immunol.** v. 14, n. 1126348, 2023.

DIALLO, O.O.; BARON, S.A.; ABAT, C.; COLSON, P.; CHAUDET, H.; ROLAIN, J.M. Antibiotic resistance surveillance systems: A review. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 23, p. 430–438, 2020.

DIETERICH, C.; PUEY, A.; LIN, S, et al. Gene expression analysis reveals new possible mechanisms of vancomycin-induced nephrotoxicity and identifies gene markers candidates. **Toxicol Sci.**, v. 1, p. 258–269, 2009.

DIMONDI, V.P.; RAFFERTY, K. Review of continuous-infusion vancomycin. **Ann. Pharmacother.**, v. 47, p. 219-227, 2013.

DU, H.; LI, Z.; YANG, Y.; LI, X.; WEI, Y.; LIN, Y.; ZHUANG, X. New insights into the vancomycin-induced nephrotoxicity using in vitro metabolomics combined with physiologically based pharmacokinetic modeling. **J Appl Toxicol.**, v. 40, n. 7, p. 897-907, 2020.

DUARTE, A. B. A., et al. Perfil epidemiológico da insuficiência renal no Brasil de 2012 a 2022. **Research, Society and Development.**, v. 12, n. 10, 2023.

ELAIDY, Z. M. Protective Effects of Aminophylline on Vancomycin-Induced Acute

Kidney Injury in Rats: Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Roles. **Suez Canal University Medical Journal**. v. 16, n. 2, p. 112 – 121, 2013.

EL-SHARAKY, A. S.; NEWAIRY, A. A.; KAMEL, M. A.; EWEDA, S. M. Protective effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1584–1590, 2009.

ELMORSY, E. A.; YOUSSEF, M. E.; ABDEL-HAMED, M. R.; AMER, M. M.; ELGHANDOUR, S. R.; ALKHAMISS, A. S.; MOHAMED, N. B.; KHODEIR, M. M.; ELSISI, H. A.; ALSAEED, T. S.; KAMAL, M. M.; ELLETHY, A. T.; ELESAWY, B. H.; SABER, S. Activation of AMPK/SIRT1/FOXO3a signaling by BMS-477118 (saxagliptin) mitigates chronic colitis in rats: uncovering new anti-inflammatory and antifibrotic roles. **Front Pharmacol.**, v. 15, n. 1456058, 2024.

ELYASI, S.; KHALILI, H.; DASHTI-KHAVIDAKI, S.; MOHAMMADPOUR, A. Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 68, p. 1243–1255, 2012.

ELYASI, S.; KHALILI, H.; HATAMKHANI, S.; DASHTI-KHAVIDAKI, S. Prevention of vancomycin induced nephrotoxicity: a review of preclinical data. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 69, p. 747–754, 2013.

EMEKA, P. M.; RASOOL, S. T.; MORSY, M. A.; ISLAM, M. I. H.; CHOCHAN, M. S. Protective effects of lutein against vancomycin-induced acute renal injury in mice via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and inhibition nuclear factor-kappaB/caspase 3. **Korean J Physiol Pharmacol.**, v. 25, n. 4, p. 321–331, 2021

FERREIRA, F. C. S.; CLEMENTINO, M.; RODRIGUES, F. A. P.; VERAS, H. N.; MARTINS, D. S.; QUEIROGA, M. L.; LIMA, M. A.; SILVA, D. O.; FREITAS, T. M.; RIBEIRO, S. A.; MOTA, M. R. L.; SILVA, J. A.; LIMA, A. A.; HAVT, A. [8] and [10]-Gingerol reduces urothelial damage in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis via JAK/STAT/FOXO signaling pathway via IL-10. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 396, p. 1773–1786, 2023.

FILIPPONE, E. J.; KRAFT, W. K.; FARBER, J. L. The nephrotoxicity of vancomycin. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 102, p. 459–469, 2017.

GAMEIRO, J.; FONSECA, J. A.; OUTERELO, C.; LOPES, J. A. Acute Kidney Injury: From Diagnosis to Prevention and Treatment Strategies. **J. Clin. Med.**, v. 9, n. 1704, 2020.

GAO, R.; CHEN, J.; HU, Y.; LI, Z.; WANG, S.; SHETTY, S.; FU, J. Sirt1 deletion leads to enhanced inflammation and aggravates endotoxin-induced acute kidney injury. **PLoS One**. v. 9, n. 6, e98909, 2014.

GRAMS, M. E.; WAIKAR, S. S.; MACMAHON, B.; WHELTON, S.; BALLEW, S. H.; CORESH, J. Performance and limitations of administrative data in the identification of AKI. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 9, n. 4, p. 682–689, 2014.

GUI, Y.; PALANZA, Z.; FU, H.; ZHOU, D. Acute kidney injury in diabetes

mellitus: epidemiology, diagnostic and therapeutic concepts. **FASEB J.**, v. 37, n. 4, 2023

HALAWANY, A.M.; SAYED, N.S.; ABDALLAH1, H.M.; DINE, R.S. Protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of β -amyloid, COX-2, alpha-, beta - secretases and A β 1a. **Sci Rep.**, v. 7, n. 1, 2017.

HAN, X.; YANG, Y.; QI, J.; ZHANG, M., et al. Protective effects and possible mechanism of 6-gingerol against arsenic trioxide-induced nephrotoxicity based on network pharmacological analysis and experimental validation. **Int Immunopharmacol.**, v. 110, 2022.

HANRAHAN, T.; KOTAPATI, C.; ROBERTS, M.; ROWLAND, J.; LIPMAN, J.; ROBERTS, J. et al. Factors associated with vancomycin nephrotoxicity in the critically ill. **Anaesth Intensive Care**, v. 43, p. 594–599, 2015.

HE, J.; XU, W.; ZHENG, X. et al. Vitamin C reduces vancomycin-related nephrotoxicity through the inhibition of oxidative stress, apoptosis, and inflammation in mice. **Ann Transl Med.**, v. 9, n. 16, 2021.

HE, J.; XU, W.; ZHENG, X.; ZHAO, B.; NI, T.; YU, P.; DENG, S.; PAN, X.; CHEN, E.; MAO, E.; BIAN, X. Vitamin C reduces vancomycin-related nephrotoxicity through the inhibition of oxidative stress, apoptosis, and inflammation in mice. **Ann Transl Med.** v. 9, n. 16, p. 1319, 2021.

HJORTTRUP P. B. et al.; Clinical review: Predictive value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury in intensive care patients. **Critical Care**, v. 17, n. 2, p. 211, 2013.

HO, K. M.; MORGAN, D. J. R. The Proximal Tubule as the Pathogenic and Therapeutic Target in Acute Kidney Injury. **Nephron**. v. 146, n. 5, p. 494-502, 2022.

HUANG H. C.; CHOU, Y. C.; WU, C. Y.; CHANG, T. M. [8]-Gingerol inhibits melanogenesis in murine melanoma cells through down-regulation of the MAPK and PKA signal pathways. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 438, n. 2, p. 375–81, 2013.

HU, S.-H.; YAO, X.-H.; HAO, Y.-H.; PAN, A.-H.; ZHOU, X.-W. 8-Gingerol regulates colorectal cancer cell proliferation and migration through the EGFR/STAT/ERK pathway. **International Journal of Oncology**, n. 56, p. 390-397, 2020.

HUANG, J.S.; CHUANG, L. Y.; GUH, J. Y.; HUANG, Y. J.; HSU, M. S. Antioxidants attenuate high glucose-induced hypertrophic growth in renal tubular epithelial cells. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 293, n. 4, p. 1072-82, 2007.

HUMANES, B.; JADO, J.; CAMAÑO, S.; LÓPEZ-PARRA, V.; TORRES, A.; ÁLVAREZ-SALA, L. et al. Protective effects of cilastatin against vancomycin-induced nephrotoxicity. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

IM, D.S.; SHIN, H.J.; YANG, K.J.; JUNG, S. Y.; SONG, H.Y.; HWANG, H.S.; GIL, H. Cilastatin attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity via P-glycoprotein. **Toxicology Letters**, v. 5, n. 277, p. 9-17, 2017.

JIN, Q.; LIU, T.; MA, F.; YANG, L.; MAO, H.; WANG, Y.; LI, P.; PENG, L.; ZHAN, Y. Therapeutic application of traditional Chinese medicine in kidney disease: Sirtuins as potential targets. **Biomed Pharmacother.** v. 167, e115499, 2023.

JOUNG Y. H.; LIM, E. J.; DARVIN, P.; CHUNG, S. C.; JANG, J. W.; DO PARK, K., et al. MSM enhances GH signaling via the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs. **PLoS One.**, v. 7, 2012.

JOUNG, Y. H.; DARVIN, P.; KANG, D. Y.; NIPIN, S. P.; BYUN, H. J.; LEE, C.-H.; LEE, H. K.; YANG, Y. M. Methylsulfonylmethane Inhibits RANKLInduced Osteoclastogenesis in BMMs by Suppressing NF- κ B and STAT3 Activities. **PLoS One**, v. 11, n. 7, 2016.

KAMEL, R.; EL MORSY, E. M Hepatoprotective effect of methylsulfonylmethane against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Arch. Pharm. Res.**, v. 36, p. 1140–1148, 2013.

KAMT, S. F.; LIU, J.; YAN1, L.-J. Renal-Protective Roles of Lipoic Acid in Kidney Disease. **Nutrients**, v. 15, n. 7, 2023.

KAN, W.-C.; CHEN, Y.-C.; WU, V.-C.; SHIAO, C.-C. Vancomycin-Associated Acute Kidney Injury: A Narrative Review from Pathophysiology to Clinical Application. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, 2022.

KANDEMIR, F. M.; YILDIRIM, S.; KUCUKLER, S.; CAGLAYAN, C.; MAHAMADU, A.; DORTBUDAK, M. B. Therapeutic efficacy of zingerone against vancomycin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis and aquaporin 1 permeability in rat kidney. **Biomed Pharmacother.** v. 105, p. 981-991, 2018.

KAUPPINEN, A.; SUURONEN, T.; OJALA, L., et al., Antagonistic crosstalk between NF- κ B and Sirt1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders, **Cell. Signal.**, v, 25, n. 10, p. 1939–1948, 2013.

KARABAY, A. Z.; KOC, A.; OZKAN, T.; HEKMATSHOAR, Y.; SUNGUROGLU, A.; AKTAN, F.; BUYUKBINGOL, Z. Methylsulfonylmethane Induces p53 Independent Apoptosis in HCT-116 Colon Cancer Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, 2016.

KELLUM, J. A.; ROMAGNANI, P.; ASHUNTANTANG, G.; RONCO, C.; ZARBOCK, A.; ANDERS, H. Acute Kidney Injury. **Nature Rev. Dis Primers.** v. 7, n. 52, 2021.

KHALAF, M. M.; HASSAN, S. M.; SAYED, A. M.; ABO-YOUSSEF, A. M. Ameliorate impacts of scopoletin against vancomycin-induced intoxication in rat model through modulation of Keap1-Nrf2/HO-1 and IkappaBalpha-P65 NF-kappaB/P38 MAPK signaling pathways: Molecular study, molecular docking evidence and network

pharmacology analysis, **Int. Immunopharmacol.**, v. 102, 2022.

KIM, J. Y.; YEE, J.; YOON, H. U.; HAN, J. M.; GWAK, H. S. Risk factors for vancomycin-associated acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 8, p. 3977–3989, 2022.

KIM, S.-M.; LEE, H.-S.; KIM, M.-J.; PARK, H.-D.; LEE, S.-Y. Diagnostic Value of Multiple Serum Biomarkers for Vancomycin-Induced Kidney Injury. **J. Clin. Med.**, v. 10, 2021

KIM, Y. H.; KIM, D. H.; LIM, H.; BAEK, D.-Y.; SHIN, H.-K.; KIM, J.-K. The Anti-inflammatory Effects of Methylsulfonylmethane on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Murine Macrophages. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 4, p. 651-656, 2009.

KING, D.W.; SMITH, M.A. Proliferative responses observed following vancomycin treatment in renal proximal tubule epithelial cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, p. 797-803, 2004.

KIYAMA, R. Nutritional implications of ginger: chemistry, biological activities and signaling pathways. **J Nutr Biochem.**, v. 86, 2020.

KOZA, Y. Acute kidney injury: current concepts and new insights. **J. Inj. Violence Res.**, v. 8, n. 1, p. 58-62, 2016.

KOBAYASHI, Y.; FURUKAWA-HIBI, Y.; CHEN, C.; HORIO, Y.; ISOBE, K.; IKEDA, K.; MOTOYAMA, N. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. **Int J Mol Med.**, v. 16, n. 2, p. 237-43, 2005.

KOPANTZEV, Y.; HELLER, M.; SWAMINATHAN, N.; RUDIKOFF, S. IL-6 mediated activation of STAT3 bypasses Janus kinases in terminally differentiated B lineage cells. **Oncogene.**, v. 21, n. 44, p. 6791-800, 2002.

KUHAD, A.; TIRKEY, N.; PILKHWAL, S.; CHOPRA, K. 6-Gingerol prevents cisplatin-induced acute renal failure in rats. **BioFactors**, v. 26, n. 3, p. 189-200, 2006.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO, K.V.B. A Review on Pharmacological and Phytochemical Properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). **Journal of Pharmacy Research**. v. 91, n. 4, 2011.

KUMAR, K. M. P.; ASISH, G. R.; SABU, M.; BALACHANDRAN, I. Significance of gingers (Zingiberaceae) in Indian System of Medicine - Ayurveda: An overview. **Anc Sci Life**, v. 32, n. 4, p. 253-261, 2013.

KUNMING, P.; XIAOTIAN, J.; QING, X.; CHENQI, X.; XIAOQIANG, D.; ZHOU, L. Q. Impact of pharmacist intervention in reducing vancomycin-associated acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 89, p. 526–535, 2023.

KWIATKOWSKA et al. The Mechanism of Drug Nephrotoxicity and the Methods for

Preventing Kidney Damage. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, 2021.

LAGO, M.W.; MORESCO, R. N.; BOCHI, G.V. Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) como um biomarcador de lesão renal: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz.**; v. 75, n. 1684, 2016.

LAOU, E.; MAVRIDIS, T.; PAPAGIANNAKIS, N.; PAIS, G., et al. Blood Biomarkers and Metabolomic Profiling for the Early Diagnosis of Vancomycin-Associated Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis of Experimental Studies. **J. Pers. Med.**, v.12, 2022.

LASHGARI, N.; ROUDSARI, N. M.; KHAYATAN, D.; SHAYAN, M.; MOMTAZ, S.; ROUFOGALIS, B. D.; ABDOLGHAFARI, A. H.; SAHEBKAR, A. Ginger and its constituents: Role in treatment of inflammatory bowel disease. **BioFactors**, v. 48, p. 7–21, 2022.

LEVEY, A.S.; ECKARDT, K.U.; DORMAN, N.M.; CHRISTIANSEN, S.L.; HOORN, E.J.; INGELFINGER, J.R.; INKER, L.A.; LEVIN, A.; MEHROTRA, R.; PALEVSKY, P.M.; et al. Nomenclature for kidney function and disease: Report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. **Kidney Int.**, v. 97, p. 1117–1129, 2020.

LEWINGTON, A. J., CERDÁ, J.; MEHTA, R. L. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. **Kidney Int.**, n. 84, p. 457–467, 2013.

LI, L. L.; CUI, Y.; GUO, X. H., et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of gingerols and shogaols from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) in rats by UPLC-Q-Exactive-HRMS. **Molecules**, v. 24, 2019.

LI, X.-H.; MCGRATH, K.C.-Y.; NAMMI, S.; HEATHER, A.K.; ROUFOGALIS, B.D. Attenuation of liver pro-inflammatory responses by *Zingiber officinale* via inhibition of NF-kappa B activation in high-fat diet-fed rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 110, p. 238–244, 2012.

LI, Y.; XU, B.; XU, M.; CHEN, D.; XIONG, Y.; LIAN, M., et al. 6-Gingerol protects intestinal barrier from ischemia/reperfusion-induced damage via inhibition of p38 MAPK to NF-κB signalling. **Pharmacol Res.**, v. 119, p. 137–148, 2017.

LIM, C. P.; CAO, X. Regulation of Stat3 activation by MEK kinase 1. **J Biol Chem.** v. 276, n. 24, p. 21004-11, 2001.

LIM, E. J.;1, HONG, D. Y.; PARK, J. H.; JOUNG, Y. H., et al. Methylsulfonylmethane Suppresses Breast Cancer Growth by Down-Regulating STAT3 and STAT5b Pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 4, 2012.

LIN, T.-Y.; HSU, Y.-H. IL-20 in Acute Kidney Injury: Role in Pathogenesis and Potential as a Therapeutic Target. **Int. J. Mol. Sci.** v. 21, p. 1009, 2020.

LIU, C.; BAYER, A.; COSGROVE, S. E., et al. Clinical practice guidelines by the

infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. **Clin Infect Dis.**, v. 52, n. 3, p. 285-292, 2011.

LIU, C.; YAN, S.; WANG, Y.; WANG, J.; FU, X.; SONG, H. et al. Drug-induced hospital-acquired acute kidney injury in China: a multicenter cross-sectional survey. **Kidney Dis. (Basel)**, v. 7, n. 2, p. 143–155, 2021.

LIU, L.; YU, N.; LENG, W.; LU, Y.; XIA, X.; YUAN, H. 6-Gingerol, a functional polyphenol of ginger, reduces pulmonary fibrosis by activating Sirtuin1. **Allergol Immunopathol.**, v. 50, n. 2, p. 104-114, 2022.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method. Methods.**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LU, X.; ZHANG, E.; YIN, S.; FAN, L.; HU, H. Methylseleninic Acid Prevents Patulin-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity via the Inhibition of Oxidative Stress and Inactivation of p53 and MAPKs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 65, n. 5299, 2017.

LUQUE, Y.; LOUIS, K.; JOUANNEAU, C. et al. Vancomycin associated cast nephropathy. **J Am Soc Nephrol.**, v. 28 p. 1723–1728, 2017.

MAGNUSON, B. A.; APPLETON, J.; RYAN, B.; MATULKA, R. A. Oral developmental toxicity study of methylsulfonylmethane in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 977–984, 2007.

MAGNUSON, B. A.; APPLETON, J.; AMES, G. B. Pharmacokinetics and Distribution of [35S]Methylsulfonylmethane following Oral Administration to Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 1033-1038, 2007.

MAHMOUD, A.M.; DESOUKY, E.M.; HOZAYEN, W.G.; BIN-JUMAH, M.; EL-NAHASS, E.-S.; SOLIMAN, H.A.; FARGHALI, A.A. Mesoporous Silica Nanoparticles Trigger Liver and Kidney Injury and Fibrosis Via Altering TLR4/NF- κ B, JAK2/STAT3 and Nrf2/HO-1 Signaling in Rats. **Biomolecules**. v. 9, n. 10, p. 528, 2019.

MAKRIS K, SPANOU L. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. **Clin Biochem Rev.**, v. 37, n. 2, p. 85–98, 2016.

MALIK, S.; SUCHAL, K.; GAMAD, N.; DINDA, A. K.; ARYA, D. S.; BHATIA, J. Telmisartan ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting MAPK mediated inflammation and apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 748, p.54–60, 2015.

MEHTA, R. L. et al. Recognition and management of acute kidney injury in the International Society of Nephrology 0by25 Global Snapshot: a multinational cross-sectional study. **Lancet**, v. 387, p. 2017–2025, 2016.

MIAO, Y.; NIU, D.; WANG, Z.; WANG, J.; WU, Z.; BAO, J.; JIN, X.; LI, R.; ISHFAQ, M.; LI, J. Methylsulfonylmethane ameliorates inflammation via NF- κ B and ERK/JNK-MAPK signaling pathway in chicken trachea and HD11 cells during *Mycoplasma gallisepticum* infection. **Poultry Science**, v. 101, 2022.

MILLER, L. E. Methylsulfonylmethane decreases inflammatory response to tumor necrosis factor- α in cardiac cells. **Am J Cardiovasc Dis.**, v. 3, p. 31-38, 2018.

MINEJIMA, E.; CHOI, J.; BERINGER, P.; LOU, M.; TSE, E.; WONG-BERINGER, A. Applying new diagnostic criteria for acute kidney injury to facilitate early identification of nephrotoxicity in vancomycin-treated patients. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 7, p. 3278–3283, 2011.

MITEVSKA, E.; WONG, B.; SUREWAARD, B.G.J.; JENNE, C.N. The prevalence, risk, and management of methicillin-resistant staphylococcus aureus infection in diverse populations across Canada: A systematic review. **Pathogens**, v. 10, n. 393, 2021.

MOLEDINA, D. G.; HALL, I. E.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; REESE, P. P., et al. Performance of Serum Creatinine and Kidney Injury Biomarkers for Diagnosing Histologic Acute Tubular Injury. **Am J Kidney Dis.**, v. 70, n. 6, p. 807–816, 2017.

MUKKAVILLI, R.; YANG, C.; TANWAR, R., et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations in the development of ginger extract as an anticancer agent. **Sci Rep.**, v. 8, 2018.

NUNES, T. F.; BRUNETTA, D. M.; LEAL, C. M.; PISI, P. C. B.; RORIZ-FILHO, J. S.; Insuficiência renal aguda. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, p. 272-282, 2010.

OCAK, S.; GORUR, S.; HAKVERDI, S.; CELIK, S.; ERDOGEN, S. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester, vitamin C, vitamin E and N-acetylcysteine on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 100, p. 328–333, 2007.

OH, D.-L. A long journey for acute kidney injury biomarkers. **Renal failure.**, v. 42, n. 1, p. 154–165, 2020.

OH, H. M.; YU, C. R.; GOLESTANEH, N.; AMADI-OBI, A.; LEE, Y. S.; ESEONU, A.; MAHDI, R. M.; EGWUAGU, C. E. STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. **J Biol Chem.** v. 286, n. 35, p. 30888-30897, 2011.

OKTEMA, F.; ARSLAN, F.K.; OZGUNER, F.; CANDIR, O.; YILMAZ, H.R.; CIRIS, M.; UZ, E. (2005) In vivo evidences suggesting the role of oxidative stress in pathogenesis of vancomycin-induced nephrotoxicity: Protection by erdosteine. **Toxicology**, v. 215, p. 227–233, 2005.

PAIS, G. M.; AVEDISSIAN, S. N.; O'DONNELL, J. N.; RHODES, N. J.; LODISE, T. P.; PROZIALECK, W. C.; LAMAR, P. C.; CLUFF, C.; GULATI, A.; FITZGERALD, J. C.; DOWNES, K. J.; ZUPPA, A. F.; SCHEETZ, M. H. Comparative Performance of Urinary Biomarkers for Vancomycin-Induced Kidney Injury According to Timeline of Injury. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 63, n. 7, e00079-19, 2019.

PAIS, G. M.; LIU J.; ZEPCAN, S. et al. Vancomycin-induced kidney injury: animal models of toxicodynamics, mechanisms of injury, human translation, and potential

strategies for prevention. **Pharmacotherapy**, v. 40, p. 438–454, 2020.

PERAZELLA, M. A. Drug-induced acute kidney injury: Diverse mechanisms of tubular injury. **Curr Opin Crit Care**, v. 25, p. 550–557, 2019.

PERAZELLA, M. A. Pharmacology behind common drug nephrotoxicities. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 13, p. 1897–1908, 2018.

PERAZELLA, M. A.; ROSNER, M. H. Drug-Induced Acute Kidney Injury. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 17, n. 8, p. 1220–1233, 2022.

PÉREZ, L. O. V., et al. Efecto in vitro de una solución de Zingiber officinale Rosc. (jengibre) sobre la respuesta de linfocitos humanos de donantes sanos y enfermos con inmunodeficiencia celular. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 216–222, 2010.

PETEJOVA, N.; MARTINEK, A.; ZADRAZIL, J.; KANOVA, M.; KLEMENTA, V.; SIGUTOVA, R.; KACIROVA, I.; HRABOVSKY, V.; SVAGERA, Z.; STEJSKAL, D. Acute Kidney Injury in Septic Patients Treated by Selected Nephrotoxic Antibiotic Agents—Pathophysiology and Biomarkers—A Review. **Int. Journal of Mol. Sciences**, v. 19, 2020.

QI, M. Z.; YAO, Y.; XIE, R. L., et al. Intravenous vitamin C attenuates hemorrhagic shock-related renal injury through the induction of SIRT1 in rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 501, p. 358–364, 2018.

QIAN, W.; CAI, X.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, H.; QIAN, Q., et al. Effect of gingerol on cisplatin-induced pica analogous to emesis via modulating expressions of dopamine 2 receptor, dopamine transporter and tyrosine hydroxylase in the vomiting model of rats. **Yonago Acta Med.**, v. 59, p. 100–110, 2016.

QU, S.; DAI, C.; LANG, F., et al. Rutin attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity by ameliorating oxidative stress, apoptosis, and inflammation in rats. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.63, 2019.

QUIROS, Y. et al. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 2, p. 245–256, 2011.

RADHAKRISHNAN, E. K.; BAVA, S. V.; NARAYANAN, S. S.; NATH, L. R.; THULASIDASAN, A. K.; SONIYA, E. V.; ANTO, R. J. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. **PLoS One.**, v. 9, n. 8, 2014.

RAY, A. S.; HAIKAL, A.; HAMMOUD, K. A.; YU, A. S. Vancomycin and the risk of AKI: A systematic review and meta-analysis. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, p. 2132–2140, 2016.

RAZA, Z.; NAUREEN, Z. Melatonin ameliorates the drug induced nephrotoxicity: Molecular insights. **Nefrologia (Engl Ed)**. v. 40, n. 1, p. 12–25, 2020.

RHODES, N.J.; PROZIALECK, W.C.; LODISE, T.P.; VENKATESAN, N.; O'DONNELL, J.N.; PAIS, G.; CLUFF, C.; LAMAR, P, C.; NEELY, M.N.; GULATI, A.; SCHEETZ, M.H. Evaluation of vancomycin exposures associated with elevations in novel urinary biomarkers of acute kidney injury in vancomycin-treated rats.

Antimicrob Agents Chemother, v. 60, n.10, p. 5742-5751, 2016.

RODRIGUES, F. A. P.; SANTOS, A. D. C.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; PRATA, M. M. G., et al. Gingerol suppresses sepsis-induced acute kidney injury by modulating methylsulfonylmethane and dimethylamine production. **Scientifi. Reports**, v. 8, 2018.

RODRIGUES, F.A.; PRATA, M.M.; OLIVEIRA, I.C.; ALVES, N.T.; FREITAS, R.E.; MONTEIRO, H.S.; SILVA, J.A.; VIEIRA, P.C.; VIANA, D.A.; LIBÓRIO, A.B.; HAVT, A. Gingerol fraction from *Zingiber officinale* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, p.1872- 1878, 2014.

RODRIGUES, R. A. P. F. **metilsulfonilmetano atenua a citotoxicidade induzida por vancomicina em linhagem de células de túbulo proximal HK-2, relacionado com a via oxidativa Nrf-2**. 2022. Dissertação de Mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2022.

RYU, M. J.; CHUNG, H. S. [10]-Gingerol induces mitochondrial apoptosis through activation of MAPK pathway in HCT116 human colon cancer cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v. 51, n. 1, p. 92–101, 2015.

SAMPATH, S. J. P.; BIRINENI, S.; PERUGU, S.; KOTIKALAPUDI, N.; VENKATESAN, V. Therapeutic efficacy of 6-Gingerol and 6-Shogaol in promoting browning of White adipocytes vis-à-vis enhanced thermogenesis portrayed in high fat milieu. **Food Biosci.**, v. 42, 2021.

SANTOS, R. G. **Potencial Nefroprotetor do 8-Gingerol isolado do gengibre (Zingiber officinale roscoe) frente à toxicidade induzida por cisplatina**. 2019. Dissertação de Mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2019.

SEDLAK, J.; LIDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHAHRAJABIAN, M. H.; SUN, W.; CHENG, Q. Clinical aspects and health benefits of ginger (*Zingiber officinale*) in Both traditional Chinese medicine and modern industry. **Soil Plant Sci.**, v. 69, p. 546–556, 2019.

SHERIF, M.H.; ABAS, A.M.; ZAITOUN, L.A. Ginger extract protect Iodinated Contrast Media Nephrotoxicity in rats through modulation of Oxidative Stress, Cystatin C, NGAL and TNF α . **Research J. Pharm. and Tech.** v. 11, ed. 12, 2018.

SHI, H.; ZOU, J.; ZHANG, T.; CHE, H. et al. Protective Effects of DHA-PC against Vancomycin-Induced Nephrotoxicity through the Inhibition of Oxidative Stress and Apoptosis in BALB/c Mice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 66, p. 475-484, 2018.

SHI, H.-H.; WANG, C.-C.; DING, L. et al. Comparative evaluation of

phosphatidylcholine and phosphatidylserine with different fatty acids on nephrotoxicity in vancomycin-induced mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 85, n. 8, 2021.

SILVA, J. A. et al. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. **J. Chromatogr. B Analy. Technol. Biomed. Life Sci.** v. 15, n. 903, p. 157–162, 2012.

SIMON, A.; DARCSI, A.; KERY, A.; RIETHMÜLLER, E. Blood-brain barrier permeability study of ginger constituents. **J Pharm Biomed Anal**, v. 177, 2020.

SINGLETERY, K. Ginger. **Nutr. Today**, v. 45, p. 171–183, 2010.

SINGLETERY, K. W. Ginger Update: Potential Health Benefits. **Nutrition Today**, v. 58, n. 6, 2023.

SONG, X.; DU, Z.; YAO, Z.; TANG, X.; ZHANG, M. Rhein Improves Renal Fibrosis by Restoring Cpt1a-Mediated Fatty Acid Oxidation through SirT1/STAT3/twist1 Pathway. **Molecules**. v. 27, p. 2344, 2022.

SOUSA-LIMA et al., Methylsulfonylmethane (MSM), an organosulfur compound, is effective against obesity-induced metabolic disorders in mice. **Metabolism clinical and experimental**, v. 65, p. 1508 – 1521, 2016.

SOWLEY, E.; KANKAM, F. Harnessing the Therapeutic Properties of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) for the Management of Plant Diseases. **Ginger Cultiv. Its Antimicrob. Pharmacol. Potentials**, 2019.

STONER G. D. Ginger: is it ready for prime time? **Cancer Prev. Res.**, v. 6, p. 257–262, 2013.

TAKIGAWA, M.; MASUTOMI, H.; KISHIMOTO, Y.; SHIMAZAKI, Y.; HAMANO, Y.; KONDO, Y.; ARAI, T.; LEE, J.; ISHII, T.; MORI, Y.; ISHIGAMI, A. Time-Dependent Alterations of Vancomycin-Induced Nephrotoxicity in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 40, n. 7, p. 975–983, 2017.

TIAN, L.; SHAO, X.; XIE, Y.; WANG, Q., et al. Kidney injury molecule-1 is elevated in nephropathy and mediates macrophage activation via the mapk signalling pathway. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 41, p. 769–783, 2017.

TOGUCHI, A.; NOGUCHI, N.; KANNO, T.; YAMADA, A. Methylsulfonylmethane Improves Knee Quality of Life in Participants with Mild Knee Pain: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Nutrients**, v. 15, 2023.

TONG, J.; FANG, J.; ZHU, T.; XIANG, P.; SHANG, J.; CHEN, L.; ZHAO, J.; WANG, Y.; TONG, L.; SUN, M. Pentagalloylglucose reduces AGE-induced inflammation by activating Nrf2/HO-1 and inhibiting the JAK2/STAT3 pathway in mesangial cells. **J Pharmacol Sci.** v. 147, n. 4, p. 305-314, 2021.

TZENG, T.; LIOU, S.; S., CHANG, C. J.; LIU, I. M. The ethanol extract of Zingiber zerumbet attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **Evid Based Complement. Alternat. Med.** p. 1-8, 2013.

UZ, E.; KARATAS, O.F.; METE, E.; BAYRAK, R.; BAYRAK, O.; ATMACA, A.F.; ATIS, O.; YILDIRIM, M.E.; AKCAY, A. The effect of dietary ginger (Zingiber officinalis Rosc) on renal ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. **Renal Failure.** v.31, p. 251–260, 2009.

VELEZ, J. C. Q.; OBADAN, N. O.; KAUSHAL, A.; ALZUBAIDI, M.; BHASIN, B.; SACHDEV, S. H.; KARAKALA, N.; ARTHUR, J. M.; NESBIT, R. M.; PHADKE, G. M. Vancomycin-Associated Acute Kidney Injury with a Steep Rise in Serum Creatinine. **Nephron.** v. 139, n. 2, p. 131-142, 2018.

VELUSAMY, R. K.; TAMIZHSELVI, R. Protective effect of methylsulfonylmethane in caerulein-induced acute pancreatitis and associated lung injury in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, p. 1188–1199, 2018.

VOLAREVIC, V.; DJOKOVIC, B.; JANKOVIC, M.G.; HARRELL, C.R.; FELLABAUM, C.; DJONOV, V.; ARSENIJEVIC, N. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: A balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. **J. Biomed. Sci.**, v. 26, p. 1–14, 2019.

XIONG, S.; SALAZAR, G.; PATRUSHEV, N.; ALEXANDER, R. W. FoxO1 mediates an autocrine feedback loop regulating SIRT1 expression. **J Biol Chem.** v. 286, n. 7, p. 5289-99, 2011.

WAIKAR, S. S.; BONVENTRE, J. V. Creatinine Kinetics and the Definition of Acute Kidney Injury. **J Am Soc Nephrol.**, v. 20, p. 672 – 679, 2009.

WANG, X.; LIU, R.; ZHANG, W.; HYINK, D. P.; DAS, G. C.; DAS, B.; LI, Z.; WANG, A.; YUAN, W.; KLOTMAN, P. E.; LEE, K.; HE, J. C. Role of SIRT1 in HIV-associated kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 319, n. 2, p. 335-344, 2020.

WANG, Y.; YU, H.; ZHANG, X., et al. Evaluation of daily ginger consumption for the prevention of chronic diseases in adults: a cross-sectional study. **Nutrition.** v. 36, p. 79-84, 2017.

WASILEWSKA, A.; TARANTA-JANUSZ, K.; DĘBEK, W.; ZOCH ZWIERZ, W.; KUROCZYCKA-SANIUTYCZ, E. KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy. **Pediatr Nephrol.** v. 26, n. 4, p. 579-86, 2011.

WEIMBS, T.; TALBOT, J. J. STAT3 Signaling in Polycystic Kidney Disease. **Drug Discov Today Dis Mech.** v. 10, p. 113-118, 2013.

YAMABE, N.; KANG, K.S.; GOTO E.; TANAKA T.; YOKOZAWA T. Beneficial Effect of Corni Fructus, a Constituent of Hachimi-jio-gan, on Advanced Glycation End- product Mediated Renal Injury in Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. **Biol. Pharm. Bull.** v. 30, p.520-526, 2007.

YAQUB, S.; HASHMI, S.; KAZMI, M. K.; ALI, A. A.; DAWOOD, T.; SHARIF, H. A. Comparison of AKIN, KDIGO, and RIFLE Definitions to Diagnose Acute Kidney Injury and Predict the Outcomes after Cardiac Surgery in a South Asian Cohort. **Cardiorenal Med.**, v. 12, n. 1, p. 29–38, 2022.

YE, Q.-L.; WANG, D.-M.; WANG, X.; ZHANG, Z.-Q.; TIAN, Q.-X.; FENG, S.-Y.; ZHANG, Z.-H.; YU, D.-X.; DING, C.-M.; XIE, D.-D. Sirt1 inhibits kidney stones formation by attenuating calcium oxalate-induced cell injury. **Chemico-Biological Interactions**, v. 347, 2021.

YOON, S.-Y.; KIM, J.-S.; JEONG, K.-H.; KIM, S.-K. Acute Kidney Injury: Biomarker- Guided Diagnosis and Management. **Medicina**. v. 58, n. 340, 2022.

YU, J. T.; FAN, S.; LI, X. Y.; HOU, R.; HU, X. W.; WANG, J. N.; SHAN, R. R.; DONG, Z. H.; XIE, M. M.; DONG, Y. H.; SHEN, X. Y.; JIN, J.; WEN, J. G.; LIU, M. M.; WANG, W.; MENG, X. M. Novel insights into STAT3 in renal diseases. **Biomed Pharmacother**. v. 165, p. 115166, 2023.

YU, Q.; LI, J.; CUI, M.; MEI, C.; HE, Q.; DU, X. 6-Gingerol attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury through regulating MKP5-mediated P38/JNK pathway. **Sci Rep.**, n.14, n. 1, 2024.

ZAMMEL, N.; SAEED, M.; BOUALI, N.; ELKAHOUI, S.; ALAM, J. M.; REBAI, T., et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Zingiber officinale roscoe and Allium subhirsutum: In Silico, Biochemical and Histological Study. **Foods**, v. 10, 2021.,

ZHANG, B.; PHETSANG, W.; STONE, M. R. L., et al. Synthesis of vancomycin fluorescent probes that retain antimicrobial activity, identify Gram-positive bacteria, and detect Gram-negative outer membrane damage. **Communications biology**, v. 6, n. 40, 2023.

ZHANG, C.; LI, C. L.; XU, K. X.; ZHENG, Z. H.; CHENG, G. Z.; WU, H. J.; LIU, J. The Hippo pathway and its correlation with acute kidney injury. **Zool Res**. v. 43, n. 5, p. 897-910, 2022.

ZHANG, F.; MA, N.; GAO, Y.; SUN, L.; ZHANG, J. Therapeutic Effects of 6-Gingerol, 8-Gingerol, and 10-Gingerol on Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Ulcerative Colitis in Rats. **Phytother. Res.**, .n. 31, p. 1427–1432, 2017.

ZHAO, J.; DUAN, Q.; DONG, C.; CUI, J. Cul4a attenuates LPS-induced acute kidney injury via blocking NF-κB signaling pathway in sepsis. **J Med Biochem**. v. 41, n. 1, p. 62-70, 2022.

ZHONG, Y.; LEE, K.; HE, J. C. SIRT1 Is a Potential Drug Target for Treatment of Diabetic Kidney Disease. **Front. Endocrinol**. v. 9, p. 624, 2018.

ZHOU, J. et al. A comparison of RIFLE, AKIN, KDIGO, and Cys-C criteria for the definition of acute kidney injury in critically ill patients. **Int Urol Nephrol.**, v. 48, p. 125–132, 2016.

ZHU, Y.; WANG, C.; LUO, J.; HUA, S.; LI, D.; PENG, L., et al. The protective role of Zingerone in a murine asthma model via activation of the AMPK/Nrf2/HO-1 pathway. **Food Funct.**, v. 12, p. 3120–3131, 2021.

ANEXO



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise do potencial efeito nefroprotetor dos compostos [8]-gingerol e metilsulfonilmetano (MSM) na lesão renal induzida por vancomicina em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 9270120318, sob a responsabilidade de Alexandre Havt Bindá e equipe; Francisco Cleber Silva Ferreira; Francisco Adelfane de Paula Rodrigues; Késya Helena Araújo Costa; Thiago Miranda de Freitas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 26/04/2018.

We certify that the proposal "Analysis of the potential nephroprotective effect of the compounds [8]-gingerol and methylsulfonylmethane (MSM) on vancomycin-induced renal injury in mice", utilizing 104 Heterogenics mice (104 males), protocol number CEUA 9270120318, under the responsibility of Alexandre Havt Bindá and team; Francisco Cleber Silva Ferreira; Francisco Adelfane de Paula Rodrigues; Késya Helena Araújo Costa; Thiago Miranda de Freitas - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/26/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 04/2018 a 04/2021

Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 4 a 5 semanas

N: 104

Linhagem: Swiss

Peso: 25 a 30 g

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório Pré-clínico, local destinado para experimental animal, localizado no Centro de Biomedicina.

Fortaleza, 05 de fevereiro de 2021

Prof. Dra. Camilla Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará