



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

FRANCISCO ADELVANE DE PAULO RODRIGUES

**[6]-GINGEROL E [10]-GINGEROL MODULAM AS ALTERAÇÕES RENAIAS
PROMOVIDAS POR MODELO POLIMICROBIANO DE SEPTICEMIA EM
RATOS**

**FORTALEZA-CE
2017**

FRANCISCO ADELVANE DE PAULO RODRIGUES

**[6]-GINGEROL E [10]-GINGEROL MODULAM AS ALTERAÇÕES RENAIAS
PROMOVIDAS POR MODELO POLIMICROBIANO DE SEPTICEMIA EM
RATOS**

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

Orientador: Prof^o. Dr. Alexandre Havt Bindá.

**FORTALEZA-CE
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

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

- R613 Rodrigues, Francisco Advane de Paulo.
[6]-Gingerol e [10]-gingerol modulam as alterações renais promovidas por modelo polimicrobiano de septicemia em ratos. / Francisco Advane de Paulo Rodrigues. – 2017. 162 f.: il. color.
- Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.
1. [6]-gingerol. 2. Nefroproteção. 3. Sepse. 4. Alantoína. 5. Perfil Metabólico I. Título.
CDD 615.1
-

FRANCISCO ADELVANE DE PAULO RODRIGUES

**[6]-GINGEROL E [10]-GINGEROL MODULAM AS ALTERAÇÕES RENAIAS
PROMOVIDAS POR MODELO POLIMICROBIANO DE SEPTICEMIA EM
RATOS**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____/

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Alexandre Havt Bindá - Orientador
Universidade Federal do Ceará-(UFC)

Prof^o. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará-(UFC)

Prof^o. Dr. Manasses Claudino Fonteles
Universidade Federal do Ceará- Universidade Estadual do Ceará (UFC-UECE)

Prof^a. Dra Taina Veras de Sandes Freitas
Universidade Federal do Ceará-(UFC)

Prof^a. Dra. Cláudia Ferreira Santos
Universidade Estadual do Ceará-(UECE)

À minha família, em especial
à minha mãe, Da. **Maria**, por tudo que me proporcionou na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, único, grandioso e indescritível. Por ser fonte de luz e amor que nos propociona forças nos momentos necessários. Minha maior gratidão!

Aos ratos que foram os verdadeiros heróis desta jornada.

Ao Prof^o. Dr. **Alexandre Havt Bindá**, pela oportunidade de orientação que ocorreu desde a época de mestrado, pelo incentivo e por dividir suas experiências e conhecimentos, pela constante busca de alternativas e superação das dificuldades ocorridas durante execução desse trabalho e durante a implementação do Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM). Muitíssimo obrigado!

Ao Prof^o Dr. **Aldo Ângelo Moreira Lima**, coordenador do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), pelo acolhimento e pelos momentos de aprendizagem, de discussões e reflexões compartilhadas desde o momento no qual se tornou “temporariamente” meu orientador. Por despertar a curiosidade e o desejo de estudar o TGI. Um verdadeiro cientista!

Ao Prof^o. Dr. **Jame’s Almada da Silva**, que gentilmente nos cedeu às moléculas [6]-gingerol e [10]-gingerol e que muito colaborou para realização deste estudo. Por ser solícito e disposto a colaborar.

Ao meu amigo **Dr. Alan Santos** e ao professor **Dr. Edilberto Silveira** que nos permitiu a execução do estudo metabólico no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN). Possibilitando-nos o início de uma grande caminhada no campo da abordagem metabólica de biofluidos.

Aos professores, **presentes no exame de defesa**, por terem gentilmente aceito o convite para participar desta etapa da minha formação.

Aos professores do curso de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, em especial, **Prof^o. Dr. Armênio Aguiar dos Santos, Prof^o. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, Prof^o. Dr. Manasses Claudino Fonteles, Prof^a Dra**

Nylane Maria Nunes de Alencar e Prof^ª. Dra. Geane Gomes de Matos pelos conhecimentos transmitidos e dedicação permanente aos alunos e ao programa de pós-graduação.

Aos laboratórios pertencentes ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia: LTM (Laboratório de Toxinologia Molecular), LDI (Laboratório de Doenças Infeciosas), LAFICA (Laboratório de Inflamação e Câncer), LELC (Laboratório Escola Luiz Campelo), LAFAMULI (Laboratório do Musculo liso) e LNF (Laboratório de Neuro-Farmacologia), pela contribuição durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A minha amiga **Daiziane e Josiane** pela preparação e colaboração durante o estudo histopatológico no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento em Imagem (NEMPI-UFC).

Aos amigos pós-graduandos do LTM e LDI: **Jessica Dayana, Paloma, Alejandra, Herlice, Julio, Jerfeson, Samilly, Mara, Vinicios, Mariana, Cleber, Karol, Rafaela Pankov, Rafaela Gondim, Lyvia, Marilia, Klingem, Tamara e João Vitor, Andressa** pela amizade, pelo compartilhamento de inúmeros momentos e apoio durante o período de Doutorado.

A **Jeanine Moraes**, pelo companheirismo e pelos momentos de incentivo.

Ao meu amigo **Pedro Quintela**, pela convivência e pela troca de ideias e experiências ocorridas durante o período doutorado.

Aos amigos da pós-graduação em farmacologia, **Daniel Maia, Marcondes, Gdayllon, Ana Flávia, Pedro Everson, Stefânio, Rodolfo**, pela amizade e pelos momentos de cooperação.

Aos estudantes de iniciação científica, **Márcio, Pedro Mateus, Yuri, Claudiane, Tiago** pela dedicação aos experimentos.

Obrigado!

Aos técnicos e funcionários do IBMED (Instituto de Biomedicina), em especial a Da **Vandinha!** E aos demais, **Teresinha, José Amadeus e Haroldo**, pela companhia constante, alegre nos laboratórios e no instituto.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, **Seu Adalto, Seu Moreira, Gabriela, Augusto, Laura e Célia**, pelo empenho ao trabalho.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

“ Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível(...).Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão”

(São Francisco de Assis).

RESUMO

[6]-gingerol e [10]-gingerol modulam as alterações renais promovidas por modelo polimicrobiano de septicemia em ratos

A lesão renal aguda (LRA) é uma das manifestações mais críticas durante o evento séptico, manifestando-se por produção de espécies reativas de oxigênio, alterações glomerulares e tubulares, que contribuem para a piora do prognóstico e diminuição da sobrevivência. Os compostos fenólicos [6]-gingerol e [10]-gingerol são substâncias bioativas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) que por meio de suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e metabólicas possuem um grande potencial para a renoproteção. O presente estudo investigou os efeitos moduladores dos compostos [6]- e [10]-gingerol diante ao dano renal desencadeado pelo modelo polimicrobiano *cecal ligation and puncture* (CLP) de sepse. Foram utilizados ratos Wistar (180-210 g) divididos em 6 grupos (protocolo 45/14). Os grupos controles Sham [grupos: I, II e III.] foram induzidos à falsa cirurgia e subsequentemente tratados com tween-80 2%, com [6]-gingerol ou [10]-gingerol (25 mg/kg); grupos induzidos LRA [grupos: IV., V. e VII.] por meio do processo cirúrgico CLP e subsequentemente tratados com tween-80 2%, [6]-, ou [10]-gingerol (25 mg/kg). Os tratamentos foram realizados 2 horas pré e, por 12 e 24 após indução. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos indicativos de função renal, função tubular, perfil oxidativo, atividade antioxidante e a transcrição gênica de mediadores pró-inflamatórios através de RT-PCR, análise histopatológica e taxa de sobrevivência, além do perfil metabólico por meio de ensaios por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H . A infecção polimicrobiana modificou de forma considerável os parâmetros relacionados à função renal. Observou-se uma diminuição do *clearance* de creatinina (CL_{CR}) ($0,4 \pm 0,1$ mL/min), do fluxo urinário (FU) ($0,0086 \pm 0,001$ mL/min) e do conteúdo de GSH ($13,5 \pm 1,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.). Por outro lado, houve um aumento nos valores de ureia ($62,1 \pm 2,1$ mg/dL), da razão proteína urinária: creatinina urinária [PU: C_{RU}] ($46,6 \pm 7,4$ mg/dL), da atividade da LDH ($383,7 \pm 8$ U/L), da FENa ($1,5 \pm 0,3\%$), de MDA renal ($1,72 \pm 0,37$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.) e nitrito ($61,5 \pm 9,5$ nM/g prot.), além da elevação de TNF- α (1,380 relativa transcrição) e IL-1 β (5,87 relativa transcrição) no tecido renal. Estas alterações desencadearam falha renal e redução da sobrevivência dos animais ($P < 0,05$). O tratamento com ambos os compostos [6]-gingerol ou [10]-gingerol na dose de 25mg/kg atenuou a injúria renal, melhorando consideravelmente os parâmetros anteriores. Evidenciou-se uma conservação do CL_{CR} ($1,2 \pm 0,2$ mL/min e $1,0 \pm 0,07$ mL/min, [6]- e [10]-gingerol, respectivamente), do FU ($0,01 \pm 0,001$ mL/min; $0,010 \pm 0,001$ mL/min, [6]- e [10]-gingerol, respectivamente) com melhora da atividade da GSH ($26,2 \pm 2,0$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot. e $24,06 \pm 3,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot., [6]- e [10]-gingerol, respectivamente). Além da diminuição dos níveis de ureia ($46,83 \pm 2,7$ mg/dL, [6]-gingerol), da PU: C_{RU} ($22,9 \pm 7,18$ mg/dL e $21,58 \pm 4,2$ mg/dL, [6]- e [10]-gingerol, respectivamente), da atividade da LDH ($212,7 \pm 30,8$ U/L e $236,3 \pm 43,8$ U/L [6]- e [10]-gingerol, respectivamente), da FENa ($0,6 \pm 0,1\%$ e $0,58 \pm 0,09\%$, [6]- e [10]-gingerol, respectivamente), dos níveis de MDA renal ($0,74 \pm 0,16$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot., [6]-gingerol) e de nitrito ($36,65 \pm 4,1$ nM/g prot. e $38,98 \pm 7,952$ nM/g/prot., [6]- e [10]-gingerol, respectivamente). O processo inflamatório foi atenuado pelas reduções da transcrição gênica de TNF- α (0,865 e 1,030; [6]- e [10]-gingerol, respectivamente), de IL-1 β (3,330 e 1,790 relativas transcrições, [6]- e [10]-gingerol, respectivamente). Em adição, a injúria específica as células renais foi confirmada pelos valores expressivos de *Kidney Injury Molecule-1* (KIM-1) nos rins de animais CLP, que foram bloqueados

pelos fenóis [6]- e [10]-gingerol e assim, demonstrando proteção da função renal e aumentando a sobrevivência dos animais. A exploração por *principal component analysis* (PCA) reportou alterações fenotípicas no perfil metabólico por discriminação de metabólitos entre os grupos sham, CLP e CLP tratados com [6]- ou [10]-gingerol. A abordagem por RMN de ¹H reportou aumentos de creatina, alantoína, dimetilglicina (DMG) e taurina nas urinas do grupo CLP ($P < 0,05$). Além disso, os metabólitos de dimetilamina (DMA) e dimetil sulfona (DMS) estiveram mais presentes em amostras de animais CLP tratados com [6]- e [10]-gingerol. O presente estudo indica que o [6]- e [10]-gingerol possui efeito nefroprotetor diante da disfunção, do estresse oxidativo e do processo pró-inflamatório renal na sepse polimicrobiana. Além de designar metabólitos quantificados na urina como biomarcadores correlacionados com a fisiopatologia da sepse com manifestação de falha renal.

Palavras-chave: [6]-gingerol, Nefroproteção, Sepse Abdominal, Estresse Oxidativo, Alantoína, Dimetilamina, Perfil Metabólico.

ABSTRACT

[6]-gingerol and [10]-gingerol modulate the renal changes promoted by polymicrobial model of septicemia in rats

Acute renal failure (ARF) is one of the most complicated and critical events during the septic event, manifesting by production of reactive oxygen species (ROS), glomerular and tubular disorders, which contributes to worsening the prognosis and decreases in survival. [6]-gingerol and [10]-gingerol phenolic compounds are bioactive substances from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Such compounds own protective potential effect on renoprotection due to their antioxidant and anti-inflammatory properties. This study investigated the modulatory effects of the [6]- and [10]-gingerol compounds on the renal damage triggered by cecal ligation and puncture (CLP)-induced ARF. Male Wistar rats (180-210 g) were divided into 6 groups (protocol. 45/14). The control groups (Sham) were induced to false surgery and subsequently treated with 2% Tween-80, [6]- or [10]-gingerol (25 mg/kg); ARF groups were induced by CLP process and subsequently treated with 2% tween-80, [6]- or [10]-gingerol (25 mg/kg, i.p.). The treatments were performed 2 hours before and 12 and 24 hours after induction. The biochemical parameters indicative of renal and tubular function, oxidative profile, antioxidant activity and gene expression of pro-inflammatory mediators by RT-qPCR we evaluated. In addition, the metabolomic profile by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) assays and histological analysis were also performed. The polymicrobial infection altered considerably parameters related to renal function, decreasing CL_{CR} (0.4 ± 0.1 mL/min), FU (0.008 ± 0.001 mL/min) with reduction of the GSH content (13.55 ± 1.3 μ g/mg/prot.). Indeed, had an increased of the BUN (62.1 ± 2.1 mg/dL), PU: C_{UR} (46.6 ± 7.4 mg/dL), the LDH activity (383.7 ± 80.2 U/L), the FENa ($1.5\pm 0.3\%$), renal MDA (1.725μ g/mg prot.) and nitrite (61.5 ± 9.5 nM/g prot.). On the other hand, TNF- α levels, and IL-1 β were increased (1.4 ± 0.1 and 5.5 ± 0.8 relative expression, respectively), triggering kidney failure and decreasing the survival of animals. The treatment with both compounds [6]-gingerol and [10]-gingerol (25mg/kg) exerted protection on renal injury. Improved the CL_{CR} (1.2 ± 0.2 mL/min and 1.0 ± 0.07 mL/min, [6]- and [10]-gingerol, respectively) and FU (0.01 ± 0.001 mL/min, 0.010 ± 0.001 mL/min, [6]- and [10]-gingerol, respectively) with increased GSH activity (26.22 ± 2.0 μ g/mg prot. and 24.06 ± 3.5 μ g/mg prot., [6]- and [10]-gingerol, respectively). In addition, the BUN (46.83 ± 2.7 mg/dL, [6]-gingerol), PU: C_{UR} (22.95 ± 7.18 mg/dL and 21.58 ± 4.29 mg/dL [6]- and [10]-gingerol, respectively), the LDH activity (212.7 ± 30.85 mg/dL and 236.3 ± 43.8 mg/dL, [6]- and [10]-gingerol, respectively), FENa ($0.6\pm 0.1\%$ and $0.58\pm 0.09\%$ e [6]- and [10]-gingerol, respectively), renal MDA (0.7462 ± 0.16 mg de prot., [6]-gingerol) and nitrite (36.6 ± 4.1 nM/g prot. and 38.98 ± 7.9 nM/g prot. [6]- and [10]-gingerol, respectively) were all decreased. Besides the inhibition of TNF- α transcription (0.865 e 1.030 , [6]- and [10]-gingerol, respectively) and IL-1 β (3.330 e 1.790 , [6]- and [10]-gingerol, respectively), providing protection on kidney function and increased survival of CLP animals. In addition, the specific injury to kidney cells was confirmed by the expressive values of Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in septic animals, which were blocked by compounds [6]- and [10]-gingerol. Improvement in renal morphology was correlated with increased survival of CLP animals after [6]- and [10]-gingerol treatment. The principal component analysis (PCA) reported phenotypic changed in the metabolic profile by metabolite discrimination among the sham, CLP and CLP groups treated with [6]- or [10]-gingerol. The 1H NMR approach indicated increased in creatine, allantoin, dimethylglycine (DMG) and taurine in the CLP group ($P<0.05$). In

addition, the dimethylamine (DMA) and dimethyl sulfone (DMS) metabolites were more present in samples of CLP animals treated with [6]- and [10]-gingerol. The present study indicates that [6]- and [10]-gingerol has a nephroprotective effect on dysfunction, oxidative stress and renal proinflammatory process in polymicrobial sepsis. In addition to designating quantified metabolites in the urine as biomarkers correlated with the pathophysiology of sepsis with manifestation of renal failure.

Keywords: [6] -gingerol, Nephroprotection, Sepsis, Oxidative Stress, Allantoin, Dimethylamine, Profile Metabolomics.

SUMÁRIO

Introdução	22
1.1 Sepses: etiologia, aspectos epidemiológicos, fisiopatologia.	22
1.2 Resposta imune inata na sepsis: interação patógeno/hospedeiro.	24
1.3 Processo inflamatório e disfunção orgânica durante a sepsis.	26
1.4 Disfunção de múltiplos órgãos na sepsis.	29
1.5 Participação do óxido nítrico durante a sepsis.	31
1.6 Dano renal desencadeado pelo evento séptico.	33
1.7 Metabolismo e abordagem metabólica da fisiopatologia séptica.	38
1.8 Gengibre: <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	41
1.9 Compostos fenólicos [6]- e [10]-gingerol.	44
1.10 Mecanismos farmacológicos relacionados ao <i>Zingiber officinale</i> e gingeróis frente ao dano renal.	46
2 Justificativa e relevância	49
3 Objetivos	52
3.1 Objetivo Geral	52
3.2 3.2. Objetivos Específicos	52
4 Material e métodos	54
4.1 Animais e comitê de ética.	54
4.2 Indução da sepsis pelo método CLP.	54
4.2.1 Métodos usados na caracterização da sepsis.	55
4.3 Compostos [6]- e [10]-gingerol e outras substâncias utilizadas.	55
4.4. Grupos experimentais.	56
4.5 Desenho experimental.	56
4.6 Avaliação da manifestação de diarreia.	59
4.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.	59
4.8 Função renal: <i>clearance</i> de creatinina.	59
4.9 Avaliação da função tubular.	60
4.9.1 Fração de excreção de sódio, potássio e cloreto.	60
4.10 Avaliação dos parâmetros osmolares.	60
4.11 Determinação da peroxidação lipídica.	61
4.11.1 Dosagem malonaldeído (MDA) urinário.	61
4.11.2 Determinação da concentração de malonaldeído (MDA) no tecido renal	61

	de ratos.	
4.12	Análise dos níveis de nitrito em tecido renal de ratos.	62
4.13	Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido renal de ratos.	62
4.14	Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD) em tecido renal.	63
4.15	Avaliação dos mediadores inflamatórios, de transporte e marcadores precoces de lesão renal (RT-PCR).	63
4.16	Resonância magnética nuclear (RMN) e identificação de metabólitos urinários.	65
4.17	Estudo histopatológico.	67
4.18	Análise estatística.	67
5	Resultados	69
6	Discussão	112
7	Conclusões	135
	Referências	137
	Anexos	160

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Definições de SRIS, sepse e infecção.	23
FIGURA 2 -	Ativação de receptores Toll like por produtos bacterianos.	26
FIGURA 3 -	Eventos ocorridos após ativação por endotoxina (LPS).	27
FIGURA 4 -	Resumo da patogênese da sepse com a manifestação de MARS.	28
FIGURA 5 -	Eventos celulares desencadeados pelo TNF- α nas células do sistema imunológico e em célula alvo.	30
FIGURA 6 -	Sequência de eventos desencadeados a partir da ativação de LPS, culminando em disfunção vascular e disfunção de múltiplos órgãos.	32
FIGURA 7 -	Comprometimento celular desencadeado pelo aumento sistêmico de moléculas associadas à infecção.	36
FIGURA 8 -	Falha renal desencadeada por infecção polimicrobiana.	38
FIGURA 9 -	Rizoma do gengibre.	43
FIGURA 10 -	Estrutura química dos compostos [6]- e [10]-gingerol.	46
FIGURA 11-	Desenho experimental.	57
FIGURA 12-	Utilização de gaiolas metabólicas durante execução experimental.	58
FIGURA 13-	Unidades Formadoras de Colônias durante a padronização do modelo do modelo CLP	69
FIGURA 14-	Aumentos de creatinina e ureia sérica induzidos pelo método CLP em ratos.	70
FIGURA 15-	Alteração nos níveis de proteína urinária induzida pelo modelo polimicrobiano de sepse em ratos.	71
FIGURA 16-	Curva de sobrevivência dos animais submetidos à cirurgia para indução de sepse pelo modelo CLP.	71
FIGURA 17-	Efeito do [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre o peso dos animais induzidos ao dano renal pelo modelo CLP 48 horas após indução	73
FIGURA 18-	Animais sépticos seguidos dos tratamentos com [6]-gingerol, [10]-gingerol e não modificam o peso renal durante os tratamentos experimentais.	74
FIGURA 19-	Determinação do consumo de águas nos animais induzidos ao dano renal pelo modelo CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol	75
FIGURA 20-	Avaliação dos escores de diarreia após o tratamento com os compostos 6-gingerol e [10]-gingerol em animais induzidos ao dano	75

	renal pelo modelo CLP.	
FIGURA 21-	[6]-gingerol e [10]-gingerol reduzem os níveis plasmáticos de creatinina em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	76
FIGURA 22-	Recuperação do RFG (<i>Clearance</i> de creatinina) pelos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol diante da injúria renal pelo método CLP.	77
FIGURA 23-	Aumento dos valores plasmáticos de ureia pelo modelo CLP é reduzido pelo tratamento com o composto [6]-gingerol.	78
FIGURA 24-	Compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol diminuem a presença de proteína na urina de ratos induzidos à falha renal pelo modelo CLP.	79
FIGURA 25-	Sepse polimicrobiana aumenta os níveis de lactato em animais induzidos à injúria renal.	80
FIGURA 26-	[6]-gingerol e [10]-gingerol reduz a atividade da LDH em animais induzidos a sepse polimicrobiana pelo método CLP.	81
FIGURA 27-	Processo infeccioso através do método CLP diminui os níveis de ácido úrico sérico em animais com injúria renal.	82
FIGURA 28-	[6]-gingerol e [10]-gingerol normalizam fluxo e o volume urinário em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	83
FIGURA 29-	[6]-gingerol e [10]-gingerol e o processo CLP não modificaram a transcrição gênica de AQP-2 no tecido renal de ratos submetidos à falha renal.	84
FIGURA 30-	[6]-gingerol e [10]-gingerol melhora o funcionamento tubular em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	86
FIGURA 31-	<i>Clarence</i> Osmolar em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP com subsequentes tratamentos com [6]- e [10]-gingerol.	87
FIGURA 32-	Polinfecção, [6]-gingerol e [10]-gingerol não modificaram o <i>Clarence</i> de água livre em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	88
FIGURA 33-	Efeito do [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre os valores osmolares plasmáticos e urinários em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	89
FIGURA 34-	[6]-gingerol e [10]-gingerol atenuam os níveis de MDA urinários em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	90

FIGURA 35-	[6]-gingerol suprime a peroxidação lipica no tecido renal de animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	91
FIGURA 36-	[6]-gingerol e [10]-gingerol bloqueiam os níveis de nitrito renal em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	92
FIGURA 37-	[6]-gingerol e [10]-gingerol preservam a atividade da GSH renal em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	93
FIGURA 38-	Polinfecção, [6]-gingerol e [10]-gingerol não modificaram a atividade da SOD renal em animais induzidos a falha renal.	94
FIGURA 39-	Unidades formadoras de colônia no lavado peritoneal durante o dano induzido pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.	95
FIGURA 40-	Unidades formadoras de colônia no sangue durante o dano induzido pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.	95
FIGURA 41-	[6]-gingerol e [10]-gingerol bloqueiam a transcrição gênica de TNF- α no tecido renal de ratos com falha renal por CLP.	96
FIGURA 42-	[6]-gingerol e [10]-gingerol atenua a transcrição gênica de IL-1 β no tecido renal de ratos com falha renal por CLP.	97
FIGURA 43-	Papel dos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre a transcrição gênica de INF- γ e TGF- β 1 no tecido renal de ratos com falha renal por CLP.	98
FIGURA 44-	[6]-gingerol e [10]-gingerol bloqueiam a transcrição gênica de KIM-1 no tecido renal de ratos com falha renal por CLP.	99
FIGURA 45-	Perfis espectrais de RMN de ^1H de urinas dos animais sépticos e tratados com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.	100
FIGURA 46-	Análise multivariada da discriminação e agrupamentos dos metabólitos por PCA de amostras de animais sépticos com LRA tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.	102
FIGURA 47-	Determinação dos principais metabólitos envolvidos na via do ácido cítrico (TCA) marcados na urina de animais CLP, e nos tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol.	103
FIGURA 48-	Análise dos metabólitos envolvidos na via da glutamina e metabolismo muscular identificados na urina de animais CLP, e nos tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol.	104

FIGURA 49-	Identificação dos metabólitos envolvidos na via da metilamina e metabolismo da colina na urina de animais CLP, e nos tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol.	105
FIGURA 50-	[6]-gingerol e [10]-gingerol aumentam a sobrevivência de animais com falha renal após submissão ao modelo CLP.	106
FIGURA 51-	Imagens representativas do efeito dos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre as alterações histológicas (Hematoxilina-eosina) e sobre quantificação dos escores de dano renal em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.	108
FIGURA 52-	Sumário das biomarcações investigadas em conjunto pela abordagem por RMN de ¹ H e os demais métodos, caracterizando as vias e suas interligações.	134
FIGURA 53-	Modelo hipotético com o resumo dos principais achados associado à proteção renal pelas moléculas [6]-gingerol e [10]-gingerol.	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Terminologia utilizada para caracterizar a sepse.	23
TABELA 2 -	Fatores responsáveis pela insuficiência renal aguda pré-renal e renal.	37
TABELA 3 -	Resumo das principais alterações metabólicas na sepse.	40
TABELA 4-	Descrição dos principais aspectos botânicos do gengibre.	42
TABELA 5 -	Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: senso e A: antisenso).	65

ABREVIATURAS

- CARS** – Síndrome da Resposta Inflamatória Compensatória
- CD14** – Cluster of differentiation 14
- CENAUREMN** – Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
- CFTR** – Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CH₂O** – Clearance de água livre
- CLP** – *Cecal ligation puncture*
- Cosm** – *Clearance* osmolar
- DMA** – Dimetilamina
- DMG** – Dimetilglicina
- DMS** – Dimetil Sufona
- ERO** – Espécies Ativas de Oxigênio
- FEK⁺** – Fração de excreção de potássio
- FENa⁺** – Fração de excreção de sódio
- FECL⁻** – Fração de excreção de cloreto
- FU** – Fluxo urinário
- HDL** – Lactato desidrogenase
- HMGB-1** – *high-mobility group protein 1*
- i.p.** – Intraperitoneal
- ICAM** – Moléculas de Adesão do tipo intracelular
- IL** - Interleucina
- INF γ** – Interferon gama
- iNOS** – Óxido nítrico sintase induzida
- eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial
- IRA** – Insuficiência Renal Aguda
- LBP** – LPS-binding protein
- LPS** – Lipopolissacarídeos
- LRA** – Lesão renal aguda
- MARS** – Síndrome da Resposta Inflamatória Mista
- mmHg** – Milímetros de mercúrio
- MPO** – Mieloperoxidase
- MyD88** – *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NF- κ B – Fator nuclear Kappa B
NO – Óxido nítrico
NOD – *Nucleotide binding oligomerization domains*
NOS – Óxido nítrico sintase
PAF – Fator Ativador Plaquetário
PAM – Pressão arterial média
PAMP – *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PGs – Prostaglandinas
PKC – Proteína quinase C
PLC – Fosfolipase C
PMN – Neutrófilos polimorfonucleados
PRP – *Pattern Recognition Receptors*
RFG – Ritmo de filtração glomerular
ERN – Espécies reativas de nitrogênio
s.c. – Subcutâneo
SIRS – Resposta Inflamatória Sistêmica
TFG– Taxa de Filtração Glomerular
TGF β – *Transforming growth factor beta.*
TLR – Receptores Toll-like
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa
UTI – Unidade de Terapia Intensiva

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

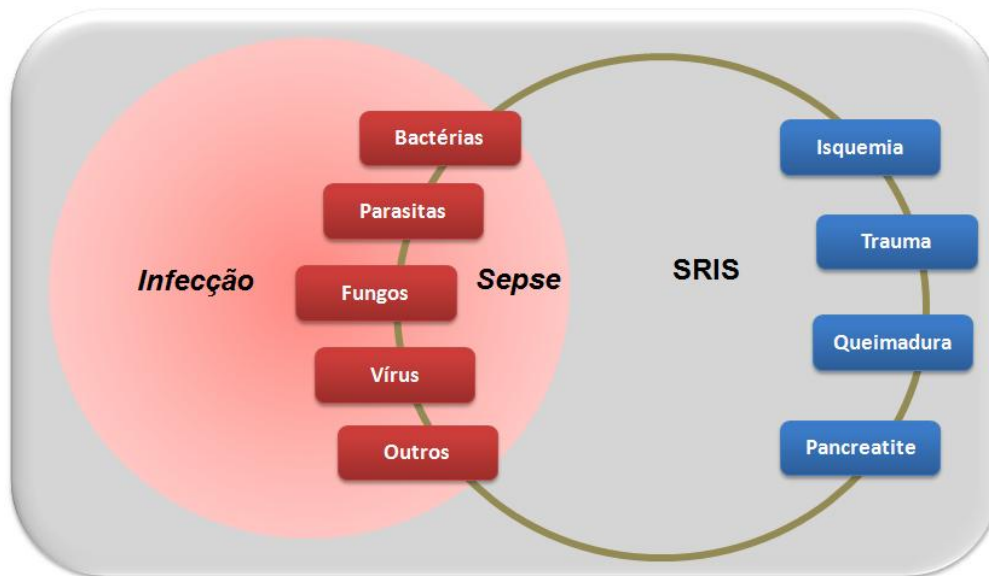
1.1 Sepses: etiologia, aspectos epidemiológicos, fisiopatologia.

A fisiopatologia da sepsis é um dos temas mais antigos da história da medicina, com descrições datadas desde a época de Hipócrates (CAWCUTT et al., 2014). A sepsis é definida como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), resultante principalmente de infecção por bactérias, embora possa também ocorrer em consequência de infecção por outros micro-organismos, tais como fungos, vírus, protozoários e helmintos (BENJAMIM et al., 2001, DOI et al., 2009 ANGUS, et al., 2013).

No entanto, ressalta-se que a terminologia SRIS define tanto a sepsis quanto doenças semelhantes, provenientes de causas não infecciosas como trauma, isquemia, queimadura, pancreatite e hemorragia (**Figura 1**) (VINCENT et al., 2006; DOI et al., 2009; ANGUS et al., 2016). Nesse sentido, a tabela 1 descreve os principais sintomas que são utilizados para caracterizar a terminologia do quadro clínico séptico (DOI et al., 2009).

A sepsis polimicrobiana se desenvolve quando a resposta inicial do hospedeiro não é eficiente em conter a infecção, resultando em inflamação generalizada e comprometimento funcional de múltiplos órgãos (ALVES-FILHO et al., 2010; ANGUS et al., 2016). É característica importante desta fisiopatologia a ativação da cascata inflamatória, fibrinolítica e do componente endotelial (KOCA et al., 2013).

Nas últimas décadas, o tratamento de pacientes com sepsis grave e choque séptico transitou para protocolos que visam melhorar pontualmente a qualidade do atendimento, assim como diminuir os índices de mortalidade (CAWCUTT et al., 2014). Entretanto, evidencia-se que as estratégias usadas para tratar a sepsis clínica ainda continuam com eficácia limitada (DOI et al., 2009) e, apesar do desenvolvimento de novos antibióticos e forte terapia com fármacos vasopressoras, a mortalidade permanece elevada, variando entre 30% e 50% em pacientes com sepsis grave e até 70%, quando em estado de choque está presente (JEAN-BAPTISTE et al., 2007).

Figura 1- Definições de SRIS, sepse e infecção.

Fonte: adaptado de Davies e Hagen (1997).

Nota: A figura reporta os fatores etiológicos responsáveis pela infecção/sepse (bactérias, parasitas, fungos, vírus) e pela SIRS (bactérias, parasitas, fungos, vírus, isquemia, trauma, queimadura, pancreatite).

Esta fisiopatologia desencadeia efeito devastador principalmente em ambiente hospitalar de emergência e em UTI. Atualmente, a sepse em unidade hospitalar é uma séria complicação clínica tanto em adultos como em crianças, em ambos os gêneros e, assim, considerada como um dos mais complexos problemas de saúde pública e uma das causas mais comuns de morte (CAMPOS et al., 2012; WANG et al., 2013; PEDRO et al., 2015, UMBRO et al., 2016).

Tabela 1- Terminologia utilizada para caracterizar clinicamente o processo séptico.

Condição	Descrição dos Sintomas
i SIRS	i. Variação da temperatura corporal (hipo- ou hipertermia), taquipneia, taquicardia, leucocitose ou leucopenia.
ii Sepse	ii. SRIS decorrente de uma infecção por bactérias, vírus, fungos ou polimicrobiana.
iii Sepse Grave	iii. Sintomas da sepse associada a sinais de hipoperfusão e disfunção de órgãos.
iv Choque Séptico	iv. Sepse grave acrescido de uma acentuada hipotensão arterial e hiporresponsividade a ressuscitação volêmica e vasopressores. A evolução do quadro de choque séptico leva a disfunção de um ou mais órgãos (Síndrome da Falência Múltipla dos Órgãos), podendo levar o paciente a óbito.

Fonte: adaptado de Doi et al., (2009).

Estima-se que a cada ano, cerca de 750.000 hospitalizações, 570.000 ocorrências em emergências e 215.000 mortes nos Estados Unidos sejam atribuídas a septicemia (JEAN-BAPTISTE et al., 2007; WANG et al., 2013; UMBRO et al., 2016), resultando em gastos anuais de cerca de 14 bilhões (MAYR et al., 2014).

Estudo recente sugere uma estimativa global de 31,5 milhões de casos de sepse e 19,4 milhões de casos de sepse graves, com potencialmente 5,3 milhões de mortes por ano (BERMEJO-MARTIN et al., 2016).

No Brasil, os estudos epidemiológicos para sepse são escassos. Entretanto, um estudo multicêntrico, realizado em UTIs brasileiras avaliando 75 UTIs distribuídas pelo país, demonstrou uma incidência de 16% para os casos de sepse, taxa média de mortalidade de 46,6%, sendo aproximadamente 34% para os casos de sepse grave (sepse associada à hipotensão, hipoperfusão ou disfunção de órgãos) e de 65% para o choque séptico (sepse associada à hipotensão não responsiva à fluidoterapia e insuficiência múltipla de órgãos) (SALES-JÚNIOR et al., 2006, SANTOS et al., 2014). Quanto ao agente infeccioso, 40,1% ocorriam por bacilos Gram-negativos, 32,8% cocos Gram-positivos e 5% fungos (SALES-JÚNIOR et al., 2006).

1.2 Resposta imune inata na sepses: interação patógeno/hospedeiro.

A desregulação imunológica é um evento crítico na patogenia séptica. Nesse sentido a correção da resposta imune e imuno-modulação são abordagens emergentes, importante, necessárias para o tratamento desta condição fisiopatológica (BERMEJO-MARTIN et al., 2016).

A interação entre microrganismos e hospedeiro é iniciada por meio do reconhecimento do agente etiológico, destacando-se os padrões moleculares relacionados aos patógenos (PMRPs), estruturas moleculares presentes em grupos de patógenos, habitualmente cruciais para a virulência e/ou sobrevivência do agente (COHEN et al., 2002; PUNEET et al., 2010). Os PMRPs são identificados pelos receptores de reconhecimento de padrão (RRP), expressos por células do sistema imune inato (COHEN et al., 2002; FLOHÉ et al., 2006; ALVES-FILHO et al., 2010).

Dentre os PMRP mais estudados estão as endotoxinas derivadas da parede celular das bactérias gram-negativas, formadas principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) (PUNEET et al., 2010; GAY et al., 2014). Estas moléculas são transferidas por

uma proteína plasmática ligadora de LPS chamada LBP (*LPS-binding protein*, do inglês) e reconhecidas pela família de receptores da classe *toll-like receptors* (TLR), em especial os subtipo 4 (TLR4) e a proteína *cluster of differentiation* 14 (CD14) existentes na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (**figura 2 e 3**) (SPILLER et al., 2010; SAVVA e ROGER, 2013, GAY et al., 2014). Vale salientar que atualmente já foram identificados mais de 13 subtipos de TLRs, que possuem especificidade de reconhecimento de PMRP distintos (**figura 2**) (SPILLER et al., 2010; SAVVA e ROGER, 2013, GAY et al., 2014).

A resposta imunomoduladora devida infecção é iniciada por meio da detecção da estrutura microbiana. Além dos receptores TLRs, também estão envolvidos os receptores NODs (*nucleotide binding oligomerization domains*), NLRs (*NOD-like receptors*, do inglês), e a família de receptores CLR (c-type lectin receptors) (SAVVA e ROGER, 2013; GAY et al., 2014).

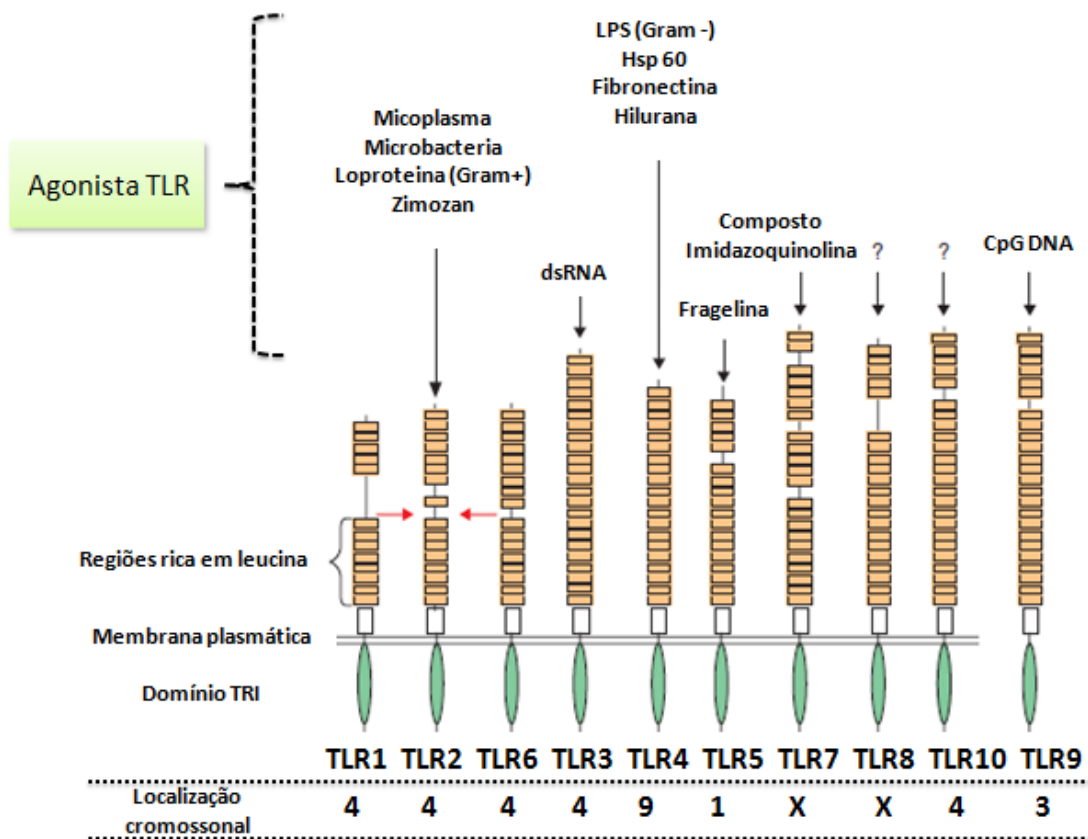
O TLR4 reconhece a resposta mediada por LPS. Além disso, o mecanismo mediado pelo TLR4 parece estar envolvido no reconhecimento de algumas proteínas virais e do ácido lipoteicóico (*Staphylococcus aureus*), embora este antígeno também seja reconhecido por TLR2 (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011; SAVVA e ROGER, 2013, GAY et al., 2014). O TLR2 é responsável pela sinalização da presença dos proteoglicanos nas infecções por bactérias gram-positivas (SAVVA e ROGER, 2013; GAY et al., 2014). Em adição, a evolução para sepse grave e choque séptico parece ter, ou não, implicação decisiva com os polimorfismos nestes receptores (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Após esta fase de reconhecimento, sucedem-se vários eventos de ativação celular e produção de citocinas, cujo resultado é a SIRS (ALVES-FILHO, 2009; SAVVA e ROGER, 2013). A **figura 3** apresenta os eventos ocorridos durante a ativação da resposta imune desencadeada pelo evento séptico.

Outras moléculas pertencentes à família TLR, estão envolvidas no primeiro momento da resposta imune inata, tais como TLR3 (relacionado à identificação de RNA de dupla hélice), TLR5 (capaz de identificar flagelina) e TLR9 (responsável por distinguir sequências CpG não-metiladas do DNA bacteriano) (FLOHÉ et al., 2006; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011; SAVVA e ROGER, 2013).

1.3 Processo inflamatório e disfunção orgânica durante a sepse.

O foco da infecção inicia o processo inflamatório na sepse, onde os microrganismos se proliferam, liberam diversos componentes, como lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, ácido lipoteicóico e exotoxinas, ou invadem a circulação sistêmica (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011; FANG et al., 2015). A interação entre PMRP e os TLRs, dentre eles TLR-2, TLR-3 e TLR-4, ativam as vias de sinalizações celulares, que incluem a participação das proteínas intracelulares NOD e MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) (ALVES-FILHO et al., 2009).

Figura 2- Ativação de receptores Toll like por produtos bacterianos.



Fonte: Adaptado de Amanta e Fetton (2002).

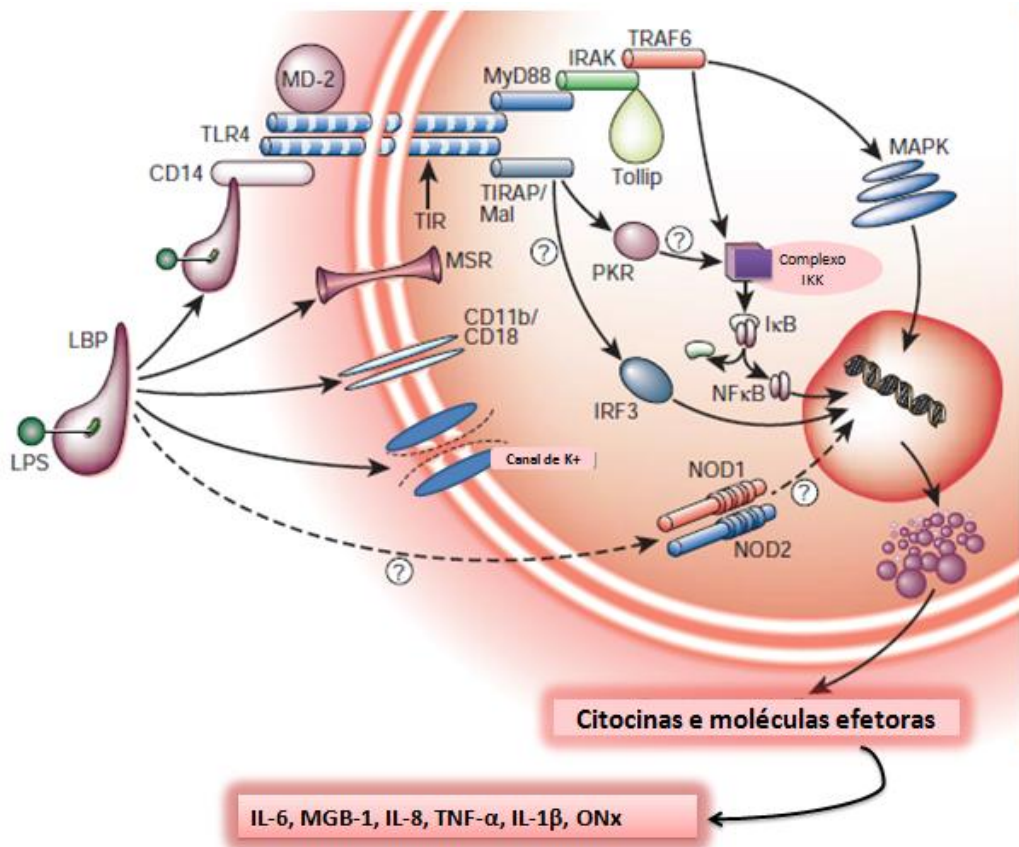
Nota: subtipos de receptores *Toll-likes* com suas estruturas moleculares extracelular e intracelular como também os seus respectivos agonistas.

Subsequentemente, a ligação entre os componentes bacterianos e os RRP, desencadeia a interação de MyD88 com a enzima IRAK (quinase associada ao receptor de interleucina-1, uma serina-treonina-quinase), o que leva a ativação das quinases I κ B

e I κ B, as quais formam o dímero I κ K, que, por sua vez, desativa a proteína I κ B (inibidor de NF- κ B) ligada ao fator de transcrição nuclear NF- κ B (fator nuclear kappa B), que é o responsável pela ativação de genes para transcrição de inúmeras citocinas partícipes da SIRS, que são relacionadas à infecção ou não (XU et al., 2013; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

A ativação de NF- κ B é responsável pela síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α (fator de necrose tumoral α) e TNF- β (fator de necrose tumoral β), evento considerado crucial para o estado hiper-inflamatório da patogenia séptica (**figura 3 e 4**) (DOI et al., 2009; ALVES-FILHO et al., 2009; ALVES-FILHO et al., 2010; FILGUEIRAS-JÚNIOR et al., 2012). Ressalta-se que alguns pacientes evoluem para o óbito precocemente, em decorrência da reação inflamatória sistêmica intensa, demonstrando que estes mediadores contribuem para a evolução e piora do prognóstico da patobiologia séptica (DOI et al., 2011).

Figura 3- Eventos ocorridos após ativação por endotoxina (LPS).



Fonte: adaptado de Cohen (2002).

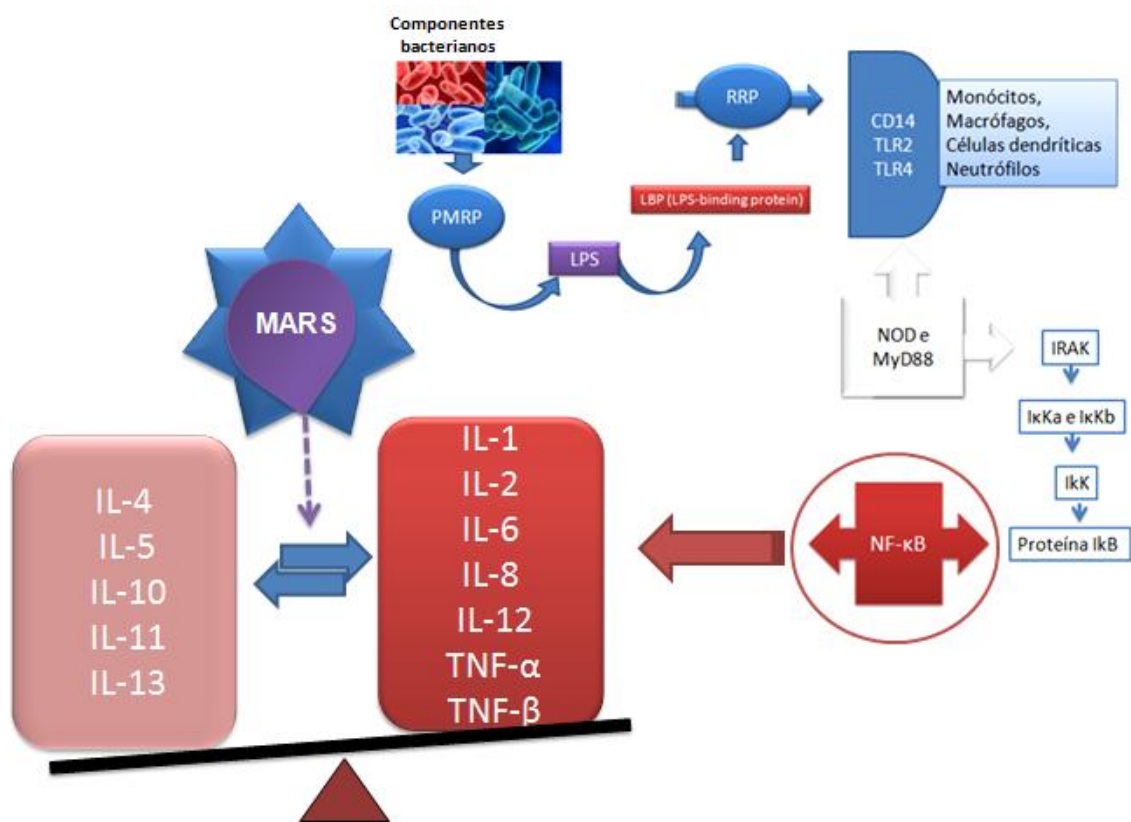
Nota: O reconhecimento do componente bacteriano (endotoxina) por receptor TLR4 desencadeia uma cascata de ativações intracelulares, desta forma resultando na liberação de NF κ B e transcrição gênica de moléculas efetoras cruciais para a progressão séptica. TLR4: Toll-like receptor 4; complexo MD-2, MSR:

Macrophage Scavenger; Receptor integrinas CD11b/CD18, IRAK: Receptor quinase associado a IL-1, MyD88: Proteína de diferenciação mieloide 88, TIRAP/Mal: também chamado de “MyD88-adapter-like protein or Mal” do inglês, TIR: Proteína contendo o domínio adaptador; proteína *Tollip*.

Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias, tais como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-11 e IL-13 possibilitam o desenvolvimento do processo de anergia e alentecimento da resposta aos agentes etiológicos, contexto típico de imunossupressão denominada síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) (SPILLER, 2009; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011; KOCA et al., 2013).

É complexa a tentativa de regulação do equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória, podendo ocorrer um fenômeno de intensa “dissonância imunológica”, na qual ocorrem SIRS e CARS no mesmo paciente, sendo esta condição denominada MARS (síndrome da resposta inflamatória mista antagônica) e, por meio destas considerações, propõe-se que o balanço entre os mediadores pró/anti-inflamatórios seja o papel chave para a compreensão da evolução da severidade da sepse (DOI et al., 2009; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Figura 4- Resumo da patogênese da sepse com a manifestação de MARS.



Fonte: adaptado de Doi et al., (2009).

Nota: Durante a evolução da fisiopatologia da sepse observa-se um distúrbio na produção de mediadores envolvidos relacionados com a resposta inflamatória. Precocemente, a resposta pró-

inflamatória é prevalente, seguida de uma resposta antiinflamatória compensatória. Estágios com a flutuação e manutenção de resposta pró e antiinflamatória de forma simultânea (MARS) também pode ser notado.

A ativação de TNF- α seguida à estimulação de receptores TLRs e NF κ -B representa um importante efector da injúria séptica, contribui significativamente para os efeitos deletérios celulares, através da ativação de apoptose e necrose celular (**figura 5**) (JEAN-BAPTISTE et al., 2007).

O TNF- α estimula os leucócitos e as células endoteliais a liberarem outras citocinas, como o próprio TNF- α , e desencadeia a expressão de moléculas de adesão na superfície celular e o aumento do *turnover* de ácido aracdônico (JEAN-BAPTISTE et al., 2007; ALVES FILHO et al., 2009).

Devido à sua capacidade única para orquestrar a cascata de citocinas, o TNF- α é considerado como um "regulador mestre" da produção de citocinas inflamatórias durante a infecção, enquanto que a IL-1 também conduz papel regulador da inflamação, atuando em sinergismo com TNF- α para a progressão do evento séptico (SCHULTE et al., 2013).

Esta interação sinérgica entre TNF- α e IL-1 propicia o desenvolvimento de um estado pró-coagulante através da inibição da trombomodulina, promovendo uma série de alterações hemodinâmicas, tais como aumento da permeabilidade vascular, diminuição da resistência vascular periférica e inotropismo negativo (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Ambas citocinas, TNF- α e IL-1, amplificam as cascatas inflamatórias de forma autócrina e parácrina por ativação de macrófagos, induzindo-os a secretar outras citocinas pró-inflamatórias (ex: IL-6 e IL-8), mediadores do ácido aracdônico, e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), levando a disfunção de órgãos (SCHULTE et al., 2013).

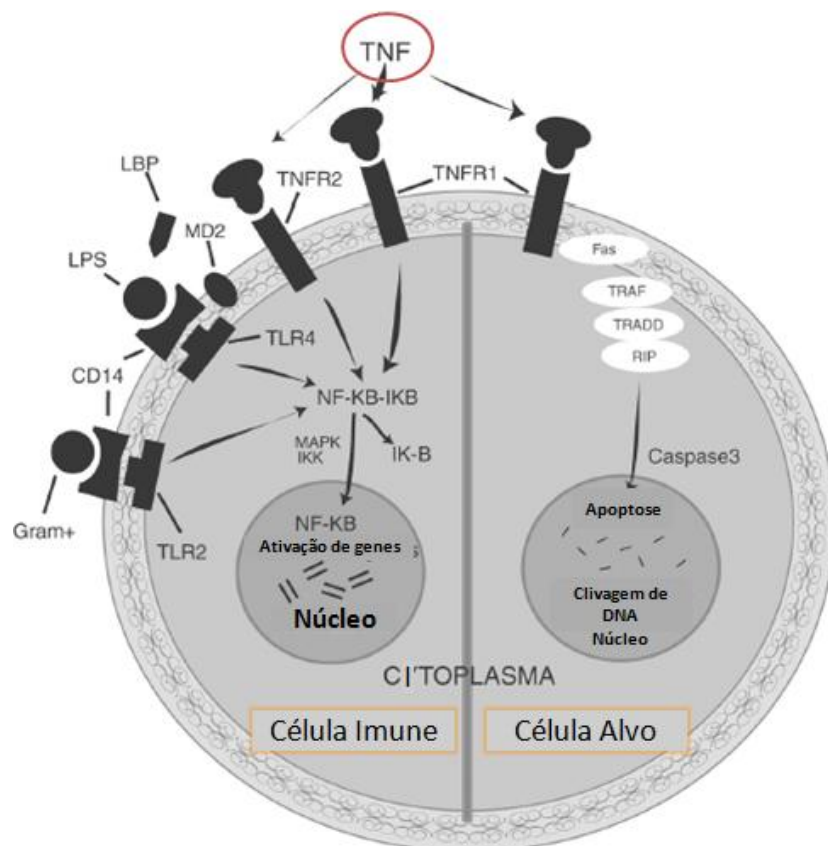
1.4 Disfunção de múltiplos órgãos na sepse.

A patogênese da disfunção orgânica é multifatorial e incompletamente compreendida (BEJAMIM et al., 2001). Hipoperfusão tecidual e hipóxia são fatores dominantes (BOFFA et al., 2004; GAY et al., 2014). Os mecanismos envolvem distúrbios na homeostase microvascular, que são resultantes da síntese de substâncias vasoativas, tais como o fator de agregação plaquetária (PAF), histamina, prostanoídes,

além de infiltrado celular (principalmente por neutrófilos) (COHEN 2002; BONFFA et al., 2004; GAY et al., 2014).

O dano gerado diretamente ao tecido ocorre pela liberação de enzimas lisossomais e radicais livres derivados do superóxido, somados à produção aumentada de NO, causam mais instabilidade vascular e assim, contribuindo para a depressão miocárdica direta, que ocorre no evento séptico (COHEN, 2002). A **figura 6** apresenta os eventos da patogênese da sepse a partir da indução pelo componente bacteriano, com a participação ativa de neutrófilos e monócitos, que subsequentemente desencadeiam a ativação de citocinas, produção de radicais livres, a cascata do ácido araquidônico, participação de enzimas lisossomais e, assim, resultam em instabilidade vascular, coagulopatia, febre, vasodilatação e extravasamento capilar (ALVES-FILHO et al., 2009; SPILLER, 2009).

Figura 5- Eventos celulares desencadeados pelo TNF- α nas células do sistema imunológico e em célula alvo.



Fonte: Adaptado de Jean-Baptiste et al., (2007).

Nota: a ligação entre TNF- α e seus receptores () nas células imunes e alvo desencadeia efeitos diferente. Na célula imune o TNF- α ativa NF κ B e produção de outras citocinas. Por outro lado, sua interação ao

receptor TNFR1 na célula alvo cumina com a ativação de caspase 3 e morte celular. *Tumor necrosis factor receptor 1 and 2* (TNFR1 e TNFR1).

A supra expressão de mediadores plasmáticos tais como as citocinas IL-6, IL-8, HMGB-1 (*high-mobility group protein 1*), TNF- α , IL-1, e a participação de PAF e ON são tidos como os fatores mecanicistas para a falha de múltiplos órgãos (JEAN-BAPTISTE et al., 2007). Funcionalmente, a disrupção de vários órgãos/sistemas é observado através da injúria hepática e pancreática, alterações metabólicas e renais (CRACIUN et al., 2014), cardiopatia severa com disfunção ventricular e choque (ZAKY et al., 2014), além de encefalopatia associada a presença elevada de ON e estresse oxidativo em células nervosas (**Figura 6**) (HERNANDES et al., 2014).

1.5 Participação do óxido nítrico durante a sepse.

O ON é uma pequena molécula produzida endogenamente, possui uma meia-vida curta e metabolismo extensivamente evidenciado e caracterizado em condições fisiológicas e patofisiológicas (LUPP et al., 2013; ANGELI et al., 2016).

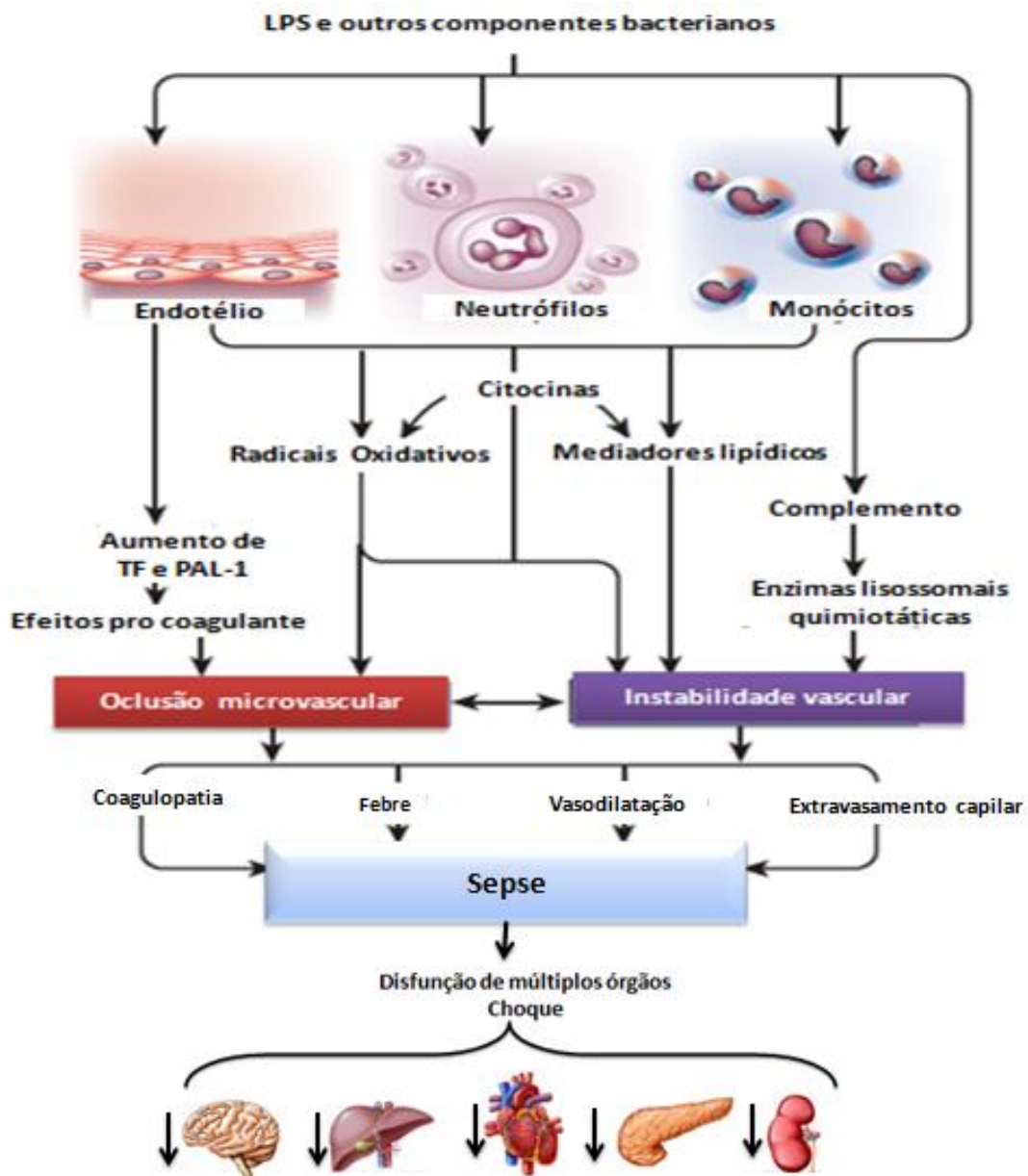
É relevante participação do ON durante o evento séptico. Tem sido bem reportado que a síntese de ON encontra-se elevada em pacientes com sepse moderada e choque séptico (VÁZQUEZ et al., 2011; ANGELI et al., 2016). O ON exerce papel fundamental no âmbito das alterações vasculares, com consequente exacerbação da vasodilatação sistêmica, e assim contribui para a hipoperfusão tecidual e falência de vários sistemas (FORTIN et al., 2010).

A combinação de ON com o ânion superóxido (O_2^-) advindo da NADPH-oxidase forma peroxinitrito ($ONOO^-$), que é um composto nitroativo altamente reativo e responsável em parte, pelo colapso hemodinâmico induzido por endotoxemia (LUPP et al., 2013). Esta espécie reativa é um potente agente oxidante responsável pela nitrosilação de proteínas, oxidação de biomoléculas tais como aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos (FORTIN et al., 2010, LUPP et al., 2013).

Salienta-se que o peroxinitrito leva à nitratação de proteínas-chave na função celular, envolvida na produção de energia e na defesa antioxidante, o que resulta na diminuição da função das células, contribuindo para ser um dos fatores desencadeadores

da injúria renal aguda e de outros órgãos induzida por sepse (FORTIN et al., 2010; SEIJA et al., 2012).

Figura 6- Sequência de eventos desencadeados a partir da ativação de LPS, culminando em disfunção vascular e disfunção de múltiplos órgãos.



Fonte: Adaptado de Cohen (2002) e Jean-Baptiste et al., (2007).

Nota: representação dos eventos desencadeados a partir da ativação de substâncias oriundas do endotélio, neutrófilos e monócitos por meio do LPS e componentes bacterianos. Observa-se uma sequência de eventos que causam disfunção vascular e ao decaimento da função de órgãos essenciais para a manutenção das funções vitais.

Os mecanismos lesivos durante a sepse estão fortemente atribuídos ao metabolismo do ON alterado, que é associado à progressiva e abrupta falha de órgão e sistemas. Neste cenário, o sistema renal merece atenção, já que este tem por função contrarregular os demais sistemas. Estudo de Heemskerk et al., (2006) demonstrou que a elevação da expressão de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) renal durante a sepse humana por endotoxemia estava relacionada com os aumentos de ON plasmático e urinário, somado aos achados de lesão microscópica do túbulo proximal. De forma plausível, este dano foi prevenido através da inibição seletiva por aminoguanidina da iNOS.

Evidencia-se que o peroxinitrito, produzido pelos neutrófilos e macrófagos após estimulação por LPS, contribui para a imunossupressão de leucócitos durante a sepse (FORTIN et al., 2010). Além disso, Seija e colaboradores (2012) apresentou em modelo pré clínico de sepse que ocorre elevação da produção de NO e de superóxido, levando em seguida à formação de peroxinitrito no tecido renal e, seguidamente, queda das taxas renais e lesão morfológica glomerular e tubular.

1.6 Dano renal desencadeado pelo evento séptico.

A sepse grave leva à falência de órgãos, como já mencionado. Desta forma, aumenta os fatores etiológicos para a alta mortalidade. Disfunção de órgãos é um fator importante independente de prognóstico para a mortalidade em UTI (RODRIGUES et al., 2012). O rim é um órgão fundamental na regulação da homeostase do corpo, sendo um dos órgãos mais afetados pela sepse. Estudo de Portela e colaboradores (2013) identificou a correlação entre a septicemia e doença renal, demonstrando experimentalmente que a presença de infecção polimicrobiana resulta em alteração renal, com o aumento sistêmico de creatinina, ureia e proteína urinária.

Mesmo com o avanço da medicina, vale ressaltar que a falha renal continua a ser uma das complicações mais frequentes e temidas em pacientes sépticos, culminando em complicação do prognóstico e aumentando os custos do tratamento de suporte, além de contribuir de forma significativa para a mortalidade nestes enfermos (WU et al., 2007; XU et al., 2013). Estudos recentes apontam que a falha renal aumenta proporcionalmente com a gravidade da sepse. Estima-se que ocorra lesão renal aguda (LRA) em 19% dos pacientes com sepse, 23% dos pacientes com sepse grave, e 51% de

pacientes com choque séptico, além da elevada taxa de mortalidade que se aproxima a 70% (WU et al., 2007; PORTELLA, 2013; XU et al., 2013).

A alta frequência da mortalidade por LRA associada à sepse exige uma melhor compreensão de sua fisiopatologia. Em adição, a prevenção da lesão renal em ambientes de terapia intensiva continua a representar um grande desafio (DOI et al., 2009; SOUZA et al., 2012). Diante disso, diversos mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos para explicar a LRA induzida por septicemia, tais como a vasodilatação induzida por hipoperfusão glomerular; microcirculação desregulada na rede capilar peritubular; disfunção tubular induzida pelo estresse oxidativo e reações inflamatórias por ação de citocinas sistêmica e/ou produção de citocinas local (RODRIGUES et al., 2012).

A produção de citocinas induz disfunção tubular, juntamente com o estresse oxidativo. Tais fatores têm sido implicados na progressão da LRA induzida por septicemia (LI et al., 2014).

Os receptores TLRs são os principais receptores para reconhecimento de patógeno microbiano nas células imunes inatas, os mesmos foram identificados em vários órgãos, incluindo o rim. Em modelos experimentais, rins de animais com sepse manifestaram uma supra expressão de receptor TLR4 e de NF- κ B, o que favoreceu a deterioração da função renal (RODRIGUES et al., 2012).

Por receber uma considerável parte do DC (Débito Cardíaco), aproximadamente um quinto, e por filtrar grandes volumes de plasma por hora, sugere-se que os túbulos renais em pacientes sépticos são suscetíveis à exposição continuada à DAMPS (Padrões moleculares associados ao dano), PAMPs, EROs e ERNs presentes na circulação, seja através do sangue ou através do seu filtrado no lúmen tubular (MARTENSSON et al., 2016). Nesse contexto, este meio tóxico é tido como uma ameaça para os néfrons com esperado estresse celular ou lesão. No entanto, apesar do comprometimento funcional renal, quase que completo e comumente observado na sepse, evidências histológicas de lesão celular são incompletas (MARTENSSON et al., 2016). A **figura 7** diagrama como as moléculas supra- expressadas sistêmicas poderiam influenciar a função renal.

Resalta-se que não há terapias eficazes para tratar ou prevenir lesão renal induzida por sepse, pois a patogênese da LRA na sepse permanece em parte desconhecida, com mecanismos complexos, que vão desde a hipoperfusão, produção de

radicais livres, resposta pró-inflamatória acentuada e disfunção na expressão de transportadores renais (GAY et al., 2014).

Por outro lado, vias de estresse oxidativo e processo inflamatório parecem ser os fatores fisiopatológicos da deterioração da função renal durante a sepse grave. Durante a sepse, a quantidade de glutatona reduzida (GSH) diminui devido à produção excessiva de EROs em tecidos hipóxicos, o que favorece para o acúmulo dessas espécies. Existe uma relação inversa entre a produção de EROs no tecido renal e o conteúdo total da GSH neste órgão (SHUM et al., 2016, SHANG et al., 2016). Além disso, a disfunção renal é correlacionada com redução da atividade da catalase e da superóxido dismutase (SOD), sugerindo que esta capacidade antioxidante alterada pode ter contribuição efetiva para LRA séptica (SHANG et al., 2016). Em adição, Hocherl e colaboradores (2010) evidenciaram que a elevada expressão de NF- κ B estava associada ao aumento no tecido renal de IL-1 β , TNF- α e iNOS, além de alteração na expressão de receptores tubulares de V2 para ADH e Aquaporina-2 (AQP-2).

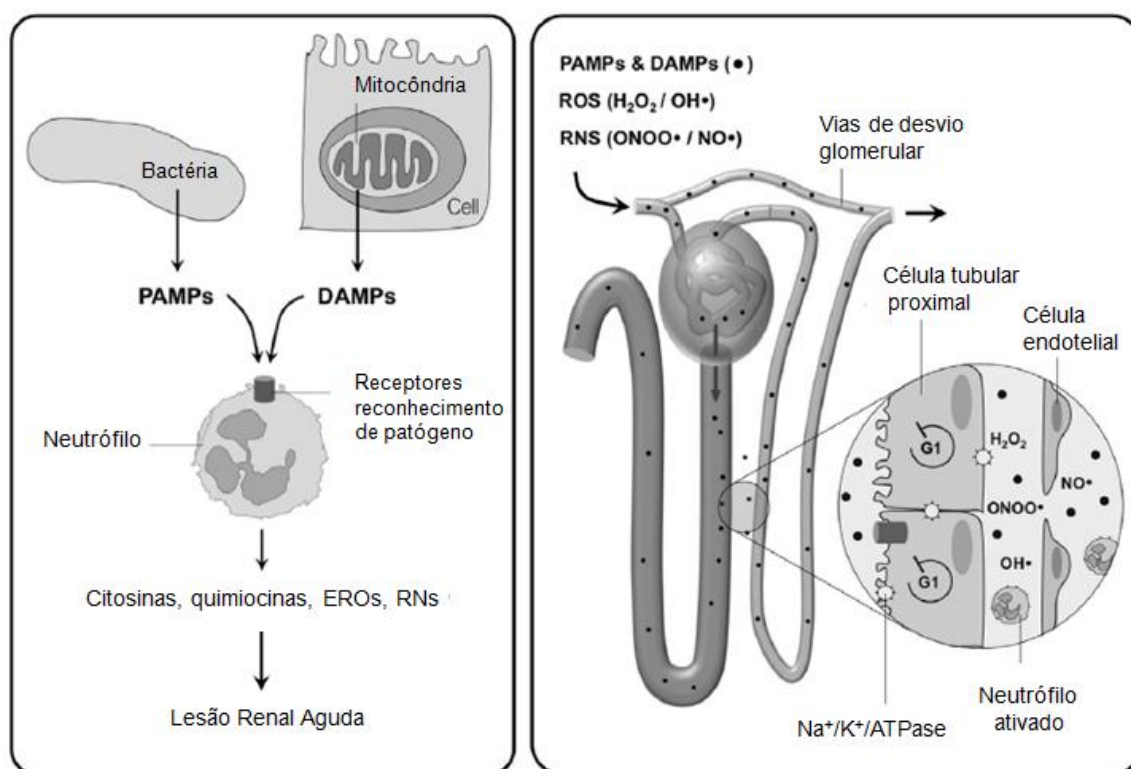
No contexto clínico, a LRA séptica está correlacionada com a geração de EROs somada à depleção de atividade antioxidante (SHUM et al., 2016). Nesse sentido, estas espécies podem causar lesão direta ao endotélio e das estruturas extracelulares como as moléculas presentes nas membranas e o glicocálix, prejudicando a vasoreatividade endotélio-dependente, além de mediar à ação vasoconstritora da endotelina-1, o que pode contribuir para desordens hemodinâmicas e glomerulares (SHUM et al., 2016; MARTENSSON et al., 2016).

Além do exposto, estudos indicam uma infra-regulação endotelial vascular da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o que contribui para a hiporreatividade vascular na sepse (SOUZA et al., 2012). É sugerido que essa alternância entre infra-regulação de eNOS e super-regulação de iNOS durante o evento infeccioso favoreça à produção de radicais de oxigênio e participação considerável do peroxinitrito, desenvolvendo além de vasodilatação sistêmica, lesão tubular e microtrombia glomerular (**figura 8**) (SCHRIER et al., 2004).

Por si só, com ou sem a presença de infecção como fator etiológico, ao longo das últimas décadas houve um aumento da incidência de LRA em ambiente hospitalar, a qual é responsável por desencadear a curto e em longo prazo, efeitos deletérios nos pacientes acometidos e, por conseguinte, aumentando os cuidados com saúde pública em

todo o mundo (REWA e BAGSHAW, 2014). É reconhecido que a LRA é uma complicação frequente em pacientes internados em UTIs, resultando em aumento no tempo de internações, além de contribuir para o desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) e no aumento do risco de mortalidade (REWA e BAGSHAW, 2014; HOSTE et al., 2015). A **Tabela 2** resume as principais causas da injurias renais, pré-renais e renais nas quais a sepsis tem fatores associados.

Figura 7- Comprometimento celular desencadeado pelo aumento sistêmico de moléculas associadas à infecção.



Fonte: adaptado de MARTENSSON et al., (2016).

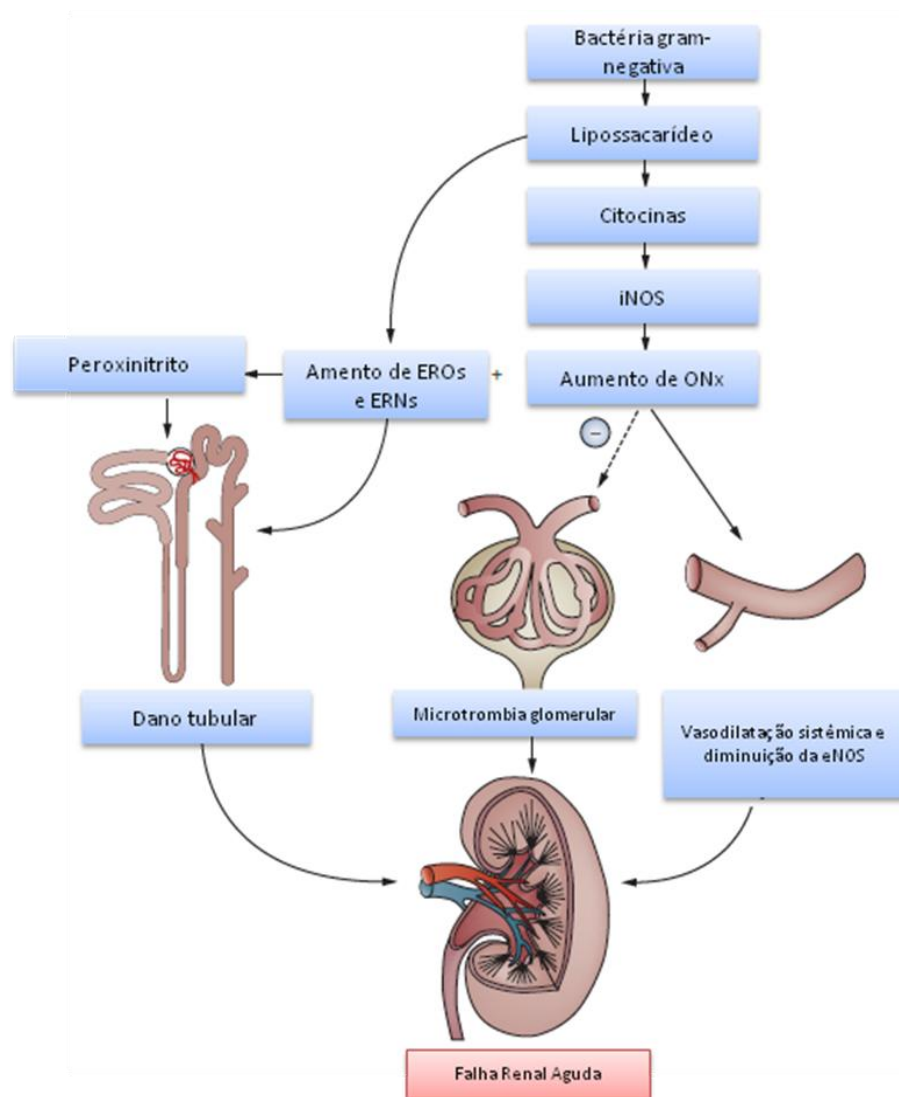
Nota: A resposta inflamatória sistêmica é desencadeada por PAMPs de microorganismos invasores e por Damps de células danificadas. Ativando neutrófilo que liberam mediadores inflamatórios, ROS e RNS causando estresse nas células tubulares nos rins e lesão. Os túbulos se adaptam ao estresse celular através da conservação de energia por meio das seguintes alterações: DAMPs (padrões moleculares associados a danos); PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos); RNS (espécies reativas de nitrogênio); EROS (espécies reativas de oxigênio).

A fisiopatologia das injurias renais agudas se manifesta de forma singular através da ruptura progressiva das funções glomerular e tubular, caracterizada pela abrupta perda da função renal e da incapacidade dos rins em excretar metabólitos residuais, concentrar urina e de manter o balanço hidro-eletrolítico (SCHRIER et al., 2004; HOSTE et al., 2015).

Tabela 2- Fatores responsáveis pela insuficiência renal aguda pré-renal e renal.

Insuficiência renal “pré-renal” (causas)	Insuficiência renal aguda “renal” (causas)
<p>i) Hipovolemia: Hipovolemia: hemorragias, perdas gastrointestinais, queimaduras, excesso de diuréticos, febre, desidratação.</p>	<p>i) Obstrução vascular renal: obstrução de veia renal (trombose, compressão), obstrução de artéria renal (aterosclerose, trombose, embolia, vasculite).</p>
<p>ii) Diminuição do débito cardíaco: insuficiência cardíaca (IC), infarto agudo do miocárdio (IAM), tamponamento cardíaco, arritmias.</p>	<p>ii) Doenças do glomérulo ou da microvasculatura renal: glomerulonefrite, vasculite, síndrome hemolítica urêmica, púrpura trombocitopênica trombótica, coagulação intravascular disseminada, esclerodermia, lupus eritematoso sistêmico.</p>
<p>iii) Alteração da relação entre resistência vascular sistêmica e renal: choque distributivo, uso abusivo de anti-hipertensivos, sepse, anafilaxia, noradrenalina, anfotericina B, ciclosporina, síndrome hepatorenal.</p>	<p>iii) Necrose tubular aguda: isquemia (igual à IRA pré-renal), toxinas (meios de contraste, antibióticos, ciclosporina, quimioterápicos, acetaminofen, rabdomiólise, hemólise, ácido úrico, oxalato, discrasia de leucócitos).</p>
<p>iv) Fármacos: anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), ciclosporina, contraste iodado.</p>	<p>iv) Nefrite intersticial: alérgica (antibióticos como betalactâmicos, sulfonamidas, trimetopim, rifampicina, AINEs, diuréticos, captopril), infecções (bacterianas, virais ou fúngicas), infiltração (linfoma, leucemia, sarcoidose) e idiopática</p>
<p>v) Hiperviscosidade: mieloma múltiplo, macroglobulinemia, policitemia.</p>	<p>v) Depósito e obstrução intratubular: proteínas do mieloma, ácido úrico, oxalato, aciclovir, metotrexato, sulfonamidas.</p>

Fonte: Nunes et al., (2010).

Figura 8- Falha renal desencadeada por infecção polimicrobiana.

Fonte: Adaptado de Heemskerk et al., (2009).

Nota: A falha renal é resultante de intensa ativação de EROs e ERNs (peroxidonitrito) a partir de estímulos oriundos de componentes bacterianos. A produção de citocinas estimulam a produção de ON que também é fator importante para dano tubular, glomerulares e vasculares.

1.7 Metabolismo e abordagem metabólica da fisiopatologia séptica.

A homeostase metabólica é vigorosamente interrompida durante o processo séptico. A sepse está associada a um estado global catabólico, que leva ao colapso das reservas de carboidratos, lípidos e proteínas (ENGLERT et al., 2016). As modificações metabólicas associadas à sepse são complexas, nesse sentido a **tabela 3** reporta as principais alterações e o impacto metabólico na patogenia séptica.

Muitos desses distúrbios metabólicos são mediados por alterações correguladas pelo sistema nervoso autonômico e endócrino. A ativação destes dois sistemas ocorre simultaneamente e, em geral é dinâmica, com mudanças frequentemente ao longo do curso desta fisiopatologia e, assim, contribuindo para o aumento do consumo de energia (ENGLERT et al., 2016).

As citocinas inflamatórias, que tem participação decisiva na patogênese da sepse, como citado anteriormente, desempenham um papel chave na ativação do sistema neuroendócrino. Semelhante, a infusão de TNF- α e IL-1 β em modelos pré-clínicos é capaz de induzir uma síndrome de estado hipermetabólico (WILSON et al., 2013; MARSHALL et al., 2014). A compreensão incompleta de como as vias metabólicas é alterada na sepse é proposto como fator limitante no desenvolvimento de uma terapêutica eficaz (MARSHALL et al., 2014).

A falência de múltiplos órgãos está fortemente associada com a disfunção metabólica, apesar da terapia apropriada. Esta síndrome é caracterizada por ineficiência da utilização do oxigênio celular, embora o fornecimento de oxigênio esteja adequado. Hipóxia citopática é proposta como um dos mecanismos responsáveis pela falha multiorgânica no estabelecimento da sepse (FINK et al., 2002). Esta linha de raciocínio passou a ser mais evidente a partir de achados de estruturas mitocondriais alteradas em modelo pré-clínico de sepse (ENGLERT et al., 2016).

Deficiência da atividade das enzimas mitocondriais pertencente à cadeia respiratória e da fosforização oxidativa leva a uma mudança para a produção anaeróbia de ATP, acompanhada por aumento de radicais livres. Estudo com pacientes sépticos apresentaram a relação entre a diminuição dos níveis de ATP tecidual e de glutatona. Ambos associados com piores prognósticos (FINK et al., 2002; CROMPHAUT et al., 2008).

O metabolismo de todos os principais macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) é desregulado na sepse. A hiperglicemia é uma das alterações metabólicas mais comuns apresentada em pacientes sépticos. Resultado de metabolismo glicogênico alterado e profunda resistência à insulina, principalmente nos estágios tardios da fisiopatologia (CROMPHAUT et al., 2008; MICKIEWICZ et al., 2015).

Além de anormalidades no metabolismo de carboidratos, a sepse também é caracterizada por alterações no metabolismo de proteínas e lipídios. A disrupção acelerada das proteínas leva a deterioração do músculo esquelético, ao descondicionamento e a recuperação prolongada em pacientes críticos. Além da decomposição generalizada das proteínas, a sepse está associada a concentrações alteradas de aminoácidos circulantes (SU et al., 2015).

Tabela 3: Resumo das principais alterações metabólicas na sepse.

Mudança Fisiológica em Sepse	Impacto metabólico
↑ Gliconeogênese, glicólise	Hiperglicemia
↑ Catabolismo de proteínas	Alteração na circulação de aminoácidos
↑ Lipólise	↑ Triglicerídeos ↓ lipoproteínas
↓ Micronutrientes	↑ Estresse oxidativo
↑ Ativação neuroendócrina	↑ Catecolaminas
↑ Cortisol	↑ Hormônios contrareguladores
↑ Liberação de catecolaminas	Hiperglicemia ↑ Estresse catabólico
↑ Liberação de citocinas	↑ Gliconeogênese ↑ Glicólise
Piora na utilização de oxigênio	↑ Hiperglicemia ↑ Resistência à insulina ↑ Proteólise
	↑ EROs

Fonte: Englert et al., (2016).

Os lipídios são a principal fonte de energia de pacientes com infecções, sendo a lipólise evidenciada nos pacientes sépticos. Nesses pacientes o metabolismo lipídico é caracterizado por aumento sérico dos triglicerídeos e diminuição dos níveis de lipoproteínas circulantes (ENGLERT et al., 2016).

Atualmente, o lactato é o biomarcador mais utilizado por clínicos para o acompanhamento das perturbações metabólicas na sepse moderada a grave. Os níveis elevados de lactato podem estar correlacionados à insuficiência da perfusão de órgãos e/ou desordens mitocondriais hepáticas e doenças malignas. Apesar de falta de

especificidade, os valores elevados de lactato (mais comumente ≥ 4 mmol/L, embora os limites superiores do normal possam variar entres laboratórios) e o *clerance* de lactato são marcadores de hipoperfusão tecidual e desvio de via metabólica, utilizados para o diagnóstico e prognóstico da sepse. Além disso, por vez a dificuldade em normalizar os valores deste produto metabólico durante a reanimação acompanha em paralelo o aumento do risco de mortalidade em pacientes UTI (SINGH et al., 2016; ENGLERT et al., 2016).

Embora o lactato seja um biomarcador útil e muito utilizado tanto para o diagnóstico e prognóstico da sepse, este é altamente inespecífico diante a infinidade de alterações metabólicas induzidas por esta fisiopatologia (BAKKER et al., 2013). O estudo metabolômico, que visa identificar os metabólitos utilizados e/ou produzidos pelo metabolismo celular, incluindo lipídios, nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos se faz eficiente em relação a esse quesito (MICKIEWICZ et al., 2015).

A abordagem metabolômica é usualmente aferida por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas. Recentemente, alguns estudos vêm na tentativa de demonstrar a caracterização metabólica por essas técnicas científicas em modelos clínicos e preclínicos (LIANG et al., 2016; MICKIEWICZ et al., 2015). Os achados dessas abordagens têm identificado uma gama de metabólitos e perfis metabólicos diferentes entre os modelos, isto sendo correlacionado à severidade do dano, ao fator etiológico e ao curso do tratamento (LIANG et al., 2016; HOERR et al., 2012; LI et al., 2015; MICKIEWICZ et al., 2015).

1.8 Gengibre: *Zingiber officinale* Roscoe.

O gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) é originário de florestas tropicais do Sudoeste da Ásia e, atualmente, é cultivado em diversos países do mundo, dentre eles o Brasil (**Figura 9**) (PALHARIN et al., 2008). O gengibre pertence à família Zingiberaceae que apresenta distribuição em áreas tropicais e semi-tropicais, incluindo cerca de 50 gêneros e 1100 espécies. Do ponto de vista econômico destaca-se o *Zingiber officinale* Roscoe, com rizomas aromáticos (SOUZA, 2005). A **tabela 4** apresenta as principais características da constituição botânica do gengibre.

Popularmente, o gengibre tanto na forma de extratos frescos e/ou secos vem sendo utilizado para o tratamento de diversas enfermidades. Vale resaltar que desde a

antiguidade, esta especiaria é bem usada para o cuidado de várias patologias, incluindo as doenças eméticas, artrite e doenças neurológicas, dentre outras (ARYAEIAN e TAVAKKOLI, 2015).

Nas últimas duas décadas aumentaram-se de forma considerável os relatos científicos apontando ações benéficas advindas do *Z. officinale* Rosc. (ARYAEIAN e TAVAKKOLI, 2015). De forma geral, evidencia-se atividades anti-inflamatória, hipoglicêmica, antioxidante, antiulcerosa, antiemética, anti-náusea, ansiolítica, antipirética, anti-úlceras e antitumoral pertencentes ao gengibre (ZHOU et al., 2006; SUHKLA, 2007; ALI et al., 2008; SHARMA, 2014).

Tabela 4 – Descrição dos principais aspectos botânicos do gengibre.

		Classificação
GENGIBRE	➤ Reino	○ Plantae
	➤ Filo	○ Magnoliophyta
	➤ Classe	○ Liliopsida
	➤ Ordem	○ Zingiberales
	➤ Família	○ Zingiberaceae Lindl, 1835.
	➤ Espécie	○ <i>Zingiber officinale</i> Roscoe, 1807

Fonte: Beal, (2004).

Em relação à função metabólica foi evidenciado que o *Z. officinale* possui efeitos benéficos sobre o metabolismo associado a disfunção correlacionada ao processo inflamatório (ARYAEIAN e TAVAKKOLI, 2015; MATSUDA et al., 2009; HAN et al., 2005).

Alguns estudos relatam um forte potencial anti-inflamatório para o *Zingiber officinale*. Em modelo experimental de inflamação de vias aéreas por ovoalbumina, o extrato desta planta hábil em melhorar a resposta imunológica através da supressão de via Th-2, redução da participação de eosinófilos, monócitos e neutrófilos, como também redução da expressão de citocinas IL-4, IL-5 e INF γ , além de relaxar a musculatura lisa das vias aéreas (AHUI et al., 2008). Além disso, em pacientes com diabetes de melitus tipo 2 a intervenção com o extrato do *Z. oficionalle* melhorou os parâmetros glicêmicos, a sensibilidade à insulina e o perfil lipídico (ARYAEIAN e TAVAKKOLI, 2015).

É amplamente conhecido que o *Z. officinale* tem efeito protetor sobre a inflamação articular e em modelos de artrite, através de suas propriedades anti-

inflamatórias e antioxidantes. Esta planta inibe as vias da ciclooxigenase-2 e lipoxigenase-5. Além do que conserva os valores ideais de glutathione e da atividade da enzima SOD, como também inibe a liberação de substância P (mediador da inflamação e dor) e, por fim, diminuem os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 e de prostaglandinas (BLACK et al., 2010; RAMADAN et al., 2013; ARYAEIAN e TAVAKKOLI, 2015).

Figura 9- Rizoma do gengibre.



Fonte: adaptado de Dabague, (2008); Lima et al., (2014).

Previamente, o extrato desta planta melhora a resposta inflamatória hepática, por diminuir os níveis de TNF- α e IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias, através da inibição da ativação da NF- κ B (LI et al., 2012). Além disso, no sistema nervoso o extrato do gengibre diminui a atividade de NF- κ B, iNOS, e ciclooxigenase 2 (COX-2) (JUNG et al., 2009; HO et al., 2013). Recentemente, foi demonstrada a existência de flavonóides e fenóis no extrato do *Z. officinale* que podem ser responsáveis pelo efeito nefroprotetivo e a outros órgãos. Essas moléculas são dotadas de ações antioxidantes e anti-inflamatória (KAFESHANI et al., 2015).

São vários os constituintes presentes no gengibre, dentre eles, é relevante a quantidade de compostos voláteis (10% a 30%), além de vários outros componentes pungentes (ZICK et al., 2008). Ressalta-se que os componentes pungentes não voláteis são os constituintes biologicamente ativos desta espécie, tais como os compostos gingeróis, shogaols, paradols e zingerone. Dentre estes os gingeróis se destacam, representam uma série de compostos homólogos diferenciados pelo comprimento das suas cadeias alquila não ramificada (SHUKLA e SINGH, 2007; ZICK et al., 2008).

Os gingeróis foram identificados como os principais componentes ativos no rizoma fresco. Os shogaols, que representam uma série de compostos homólogos derivados dos gingeróis através da eliminação da hidroxila do C-5, e com consequente formação de uma ligação dupla entre C-4 e C-5, também possuem importante atividade farmacológica, porém com menos relatos do que os gingeróis (JIANG et al., 2005). Diferentemente dos gingeróis os shagaols são mais presentes no extrato seco do gengibre.

Por outro lado, ainda é citada a presença do composto 6-paradol, semelhante ao Gingerol e é formado por meio da hidrogenação do shogoal (JIANG et al., 2005; SHUKLA e SINGH, 2007). No entanto, ainda são escassos os dados experimentais para este composto. Porém é reportado que tem potencial antioxidante e antiinflamatório (CHUNG et al., 2001).

1.9 Compostos fenólicos [6]- e [10]-gingerol.

Os compostos gingeróis são os principais constituintes químicos não voláteis encontrados no rizoma do gengibre, estes formam uma família de compostos homólogos, diferenciados entre si pelo número de átomos de carbono em sua cadeia lateral (**figura 10**). Desta forma, os compostos desta família com 10, e 14 átomos de carbono dão origem ao [6]- e [10]-gingerol, respectivamente (JIANG et al., 2005). Dentre estes, o [6]-gingerol é o maior componente pungente fenólico do gengibre e amplamente estudado devido as suas propriedades farmacológicas (CHANG et al., 2015).

Recentemente, elevou-se o número de trabalhos experimentais demonstrando que os efeitos farmacológicos do gengibre são advindos dos compostos fenólicos gingeróis (BERNAD et al., 2015; CHAKRABORTY et al., 2012). Em especial o [6]-gingerol e o [10]-gingerol são considerados como moléculas com grande potencial farmacológico e responsável pelas ações benéficas e terapêuticas dessa espécie (FUNK et al., 2009; CHAKRABORTY et al., 2010). Por conseguinte, alguns relatos na literatura mencionam que a proteção do [6]-gingerol e [10]-gingerol são obtidas a partir de suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anti-carcinogênica e anti-mutagênica (OJEWOLE, 2006, SARKAR et al., 2011; HANIADKA et al., 2012; ZICK et al., 2008).

O [6]-gingerol tem um forte potencial em atenuar a resposta inflamatória induzida em modelos *in vitro* e *in vivo* (TZENG et al., 2015). Estudo de Tripathi et al., (2007) observou-se que este composto reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS, tais como o TNF- α , IL-12 e IL-1- β . Identificou-se ainda a redução da expressão das quimiocinas RANTES (CCL5) e MCP-1, além da redução do NF- κ B.

Outros estudos relatam que além da redução da expressão de COX-2, os compostos [6]- e [10]-gingerol têm a capacidade de reduzir o dano oxidativo e produção de PGE₂ *in vitro* (LANTZ et al., 2007; KIM et al., 2005). Recentemente foi demonstrado efeito do [6]-gingerol em reduzir a expressão de IL- β , IL-6 e TNF- α em modelo animal de colite (CHANG et al., 2015).

O composto [10]-gingerol detém ação antioxidante significativa, semelhante ao [6]-gingerol. Os dois compostos inibem o dano oxidativo por redução da produção de EROs, diminuindo os níveis do ânion superóxido, do radical hidroxila e, reduzindo a produção de nitrito, além de reduzir a atividade da via xantina/xantina oxidase, que é uma fonte de formação dessas espécies (BADRELDIN et al., 2008; DUGASANI et al., 2010).

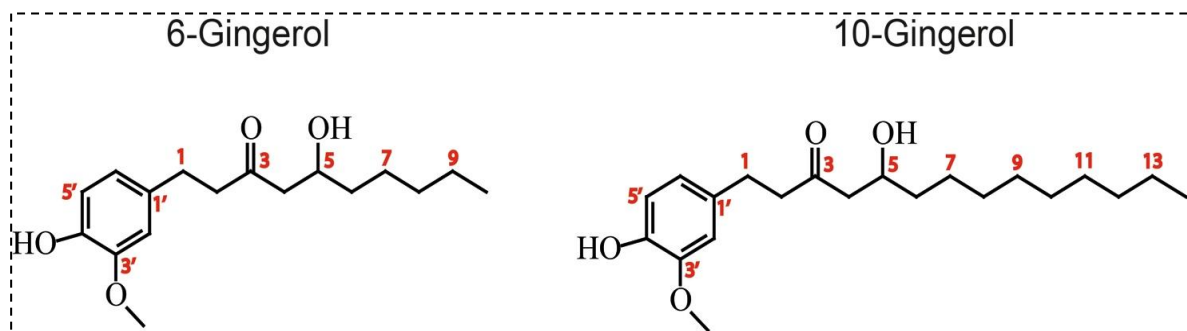
Previamente, estudo *in vitro* confirmou as ações benéficas para ambos os gingeróis ([6]- e [10]-gingerol). Estes demonstraram possuir efeitos anti-inflamatório em células nervosas, detendo a capacidade de reduzir a produção de várias moléculas envolvidas na resposta inflamatória tais como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e ON ativados por LPS (HO et al., 2013).

O [10]-gingerol por si só apresenta efeitos benéficos diante da hepatotoxicidade induzida por diclofenaco de sódio, além de ser detentor de forte ação antibactericida, atividade anti-inflamatória e anti-atrite (NAGOSHI et al., 2006; FUNK et al., 2009; ALQASOUMI, 2012).

1.10 Mecanismos farmacológicos relacionados ao *Zingiber officinale* e gingeróis diante a falha renal.

Os rins são frequentemente afetados por lesões isquêmicas e nefrotóxicas. Na última década, alguns estudos apresentaram efeito modulador do *Z. officinale* diante de algumas nefropatias. No contexto da nefropatia diabética o extrato do *Z. officinale* reduziu as principais alterações renais causadas em modelo animal, tais como o acréscimo de creatinina e ureia plasmática, além da redução dos níveis de proteína urinária, efeitos esses associados a ação antioxidante e metabólica dos compostos desta planta (Tezeng et al., 2013).

Figura 10- Estrutura química dos compostos [6]- e [10]-gingerol.



Fonte: Autor.

Nota: Resultado obtido por ensaios com RMN de ^1H no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), ligado ao DQOI/UFC.

O extrato do gengibre foi hábil em proteger o dano estrutural causado por isquemia de reperfusão renal, além de manter o CL_{CR} de forma adequado, evitou a dilatação tubular, a vacuorilação celular e o edema intersticial no tecido renal isquêmico (MAGHSOUDI et al., 2011).

Em relação à proteção nefrotóxica, o extrato etanólico e clorofórmio da planta em questão, melhoraram a defesa anti-oxidante renal diante do dano oxidativo por tetracloreto de carbono (CCl_4), reduziu os níveis de peroxidação lipídica, aumentou a atividade antioxidante da SOD e GSH, com melhora dos aspectos funcionais e retenção de compostos nitrogenados (HAMED et al., 2012).

O [6]-gingerol apresentou mecanismo antioxidante e protetor diante da nefrotoxicidade desencadeada *in vivo* por cisplatina, normalizando o desequilíbrio redox celular, através do decréscimo de malonaldeído (MDA) e manutenção das atividades da catalase, SOD e GSH de forma adequadas (KUHAD et al., 2006). Achados histopatológicos no tecido renal associados às alterações bioquímicas (aumento de creatinina, ureia e ácido urico) demonstraram o aspecto protetor do extrato do gengibre

diante da administração em dias consecutivos de aminoglicosídeo (LAKSHMI, et al., 2010).

O uso de uma fração enriquecida com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol reduziu os fatores relacionados o dano nefrotóxico induzido por gentamicina, tanto os aspectos funcionais (CL_{CR} , $FENa+$ e $FEK+$), quanto na estrutura morfológica renal (expressão de marcadores do estresse oxidativo e citocina pró-inflamatórias teciduais). Desta forma modulando a dinâmica glomerular e intra-tubular (RODRIGUES et al., 2014).

Ainda mais recente, por meio do mesmo modelo clássico de nefroticidade tubular por gentamicina, avaliando apenas o [6]-gingerol, evidenciou-se que esta molécula apresenta efeito anti-apoptótico, diminui o estresse oxidativo e normaliza os aspectos morfológicos renal, desta forma demonstrando ações nefroprotetivas e a capacidade de restabelecer a função renal (HEGAZY et al., 2016).

Nesse sentido, estudos avaliando o potencial farmacológico dos compostos [6]- e [10]-gingerol em modelo experimental de dano renal, secundário à infecção polimicrobiana de sepse por CLP são escassos e necessários. De forma geral, reforça-se a hipótese de que as propriedades citadas e existentes para estes compostos poderiam ser aceitas para melhorar a fisiopatologia da falha renal séptica e, por seguinte, tornar mais claros os possíveis mecanismos de nefroproteção que os mesmos possam ter. Além disso, ganhando respaldo para melhorar a conduta clínica.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A sepse é uma síndrome heterogênea, complexa e de difícil tratamento. Inaceitavelmente, suas taxas de mortalidade (sepse e do choque séptico) não mudaram ao longo das últimas décadas, permanecendo elevadas. Atualmente, é um dos principais problemas de saúde pública na grande maioria dos países (SOUZA et al., 2012).

A falha de múltiplos órgãos, em especial a LRA em pacientes sépticos contribui para a piora do prognóstico e maior taxa de mortalidade (XU et al., 2013). Neste sentido, torna-se essencial uma melhor compreensão da fisiopatologia do dano renal nesta síndrome, com a prevenção e o tratamento da falha renal ganhando enorme importância (ZARBOCK, 2014). Nesse contexto, o modelo animal CLP é amplamente utilizado, sendo considerado como “padrão ouro” em pesquisas com sepse, contribuindo para o entendimento e desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento. Em adição, nesta condição tem sido amplamente sugerido o uso de métodos voltados para a verificação das alterações metabólicas e perfil metabolômico nessa síndrome, tais como abordagens por RMN e a espectrometria de massas.

Estudos recentes com o extrato do *Z. officinale*, têm demonstrado que seus constituintes possuem a capacidade de proteção sobre a função renal em modelos experimentais (dano por isquemia-reperfusão e nefrotoxicidade relacionada a fármacos como cisplatina e gentamicina). Em um recente estudo, nosso grupo reportou a proteção renal por meio de tratamento com uma fração enriquecida com gíngerois diante da nefrotoxicidade causada por gentamicina (RODRIGUES et al., 2014). Em conjunto, evidenciou-se que estes compostos possuem potencial efeito sobre a função renal, através de sua atividade antioxidante, propriedade anti-inflamatórias e metabólicas.

Diante ao exposto, a inexistência de estudos relatando os efeitos destes compostos diante à falha renal desencadeada por sepse polimicrobiana, e as evidências do potencial protetor destas moléculas, proporciona uma causalidade aceitável para referendar a utilização dos mesmos como tratamento. Desta forma, o foco de investigação deste estudo experimental foi determinar os mecanismos associados ao possível mecanismo renoprotetor dos compostos [6]- e [10]-gingerol diante a nefropatia causada pela sepse em modelo de CLP. Além disso, caracterizar o perfil metabólico

por meio de ensaios usando o método RMN ^1H na falha renal séptica e dos presentes tratamentos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral.*

- I. Investigar o potencial terapêutico e os efeitos farmacológicos dos compostos isolados [6]- e [10]-gingerol, além da exploração do perfil metabolômico durante a injuria renal induzida pelo modelo polimicrobiano de sepse em ratos.

3.2 *Objetivos específicos.*

- Verificar os efeitos do tratamento com os compostos [6]- e [10]-gingerol sobre os parâmetros da função renal e tubular em ratos submetidos ou não ao dano por CLP.
- Analisar a curva de sobrevivência em animais induzidos de falha renal pela sepse polimicrobiana e subsequentemente tratados com os compostos [6]- e [10]-gingerol.
- Avaliar o perfil oxidativo e atividade antioxidante em ratos tratados com [6]- e [10]-gingerol submetidos ou não ao dano por CLP.
- Investigar os achados histopatológicos no tecido renal na ausência e presença do [6]- e [10]-gingerol em ratos submetidos ou não ao método CLP.
- Avaliar o perfil molecular através da transcrição gênica de TNF- α , IL-1 β , INF γ , TGF- β 1, KIM-1, Aquaporina 2(AQP-2) em rins submetidos ou não ao dano por CLP e subsequentemente tratados com [6]- e [10]-gingerol.
- Explorar o perfil metabolômico através da RMN de ^1H de animais com injuria renal desencadeada pela polinfecção bacteriana, tratados com os fenóis [6]- e [10]-gingerol.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA.

Foram utilizados ratos Wistar, com uma média de peso entre 180 a 200 gramas (n= 6-8 por grupo). Os mesmos foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em condições controladas em estantes ventiladas. Tiveram ciclo claro/escuro (12/12 horas), temperatura mantida em 22±2°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 em Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, número de **protocolo 45/14**.

4.2 INDUÇÃO DA SEPSE PELO MÉTODO CLP.

A indução da septicemia foi realizada pelo modelo de ligadura e punção do ceco, método CLP (*cecal ligation and puncture*: CLP), adaptado de estudos de SOUZA et al., (2012) e RODRIGUES et al., (2012).

Inicialmente, os animais foram anestesiados com uma solução anestésica com quetamina 10% (90mg/Kg) e xilazina 2% (10 mg/Kg) por via intraperitoneal (i.p). Após anestesia, os mesmos ficaram sobre uma placa aquecedora EFF 421 (Insight®) que manteve a temperatura de 37°C de forma constante durante todo o processo cirúrgico. Após fixação de cada animal, foi realizada uma assepsia local com álcool iodado e, em seguida, conduzido uma laparotomia com incisão longitudinal de aproximadamente 1,5cm e subsequente exposição do ceco. Este foi semi-ocluído com fio de seda na região próxima à válvula ileocecal. Em seguida, o ceco foi puncionado cinco vezes com uma agulha de 18 G e suavemente comprimido para confirmar a perda do conteúdo cecal. Imediatamente, o intestino foi devolvido para a cavidade abdominal e a incisão da parede abdominal foi fechada em duas camadas com suturas feitas com fio de seda 4.0. Em seguida, a região abdominal foi limpa com iodo. Por fim, para garantir uma fluido-terapia adequada, cada animal recebeu uma solução de NaCl 0,15 M (25 ml/kg, s.c). Após o processo cirúrgico, os animais continuaram na placa devidamente aquecida até a recuperação da anestesia, que ocorreu entre 60 a 220 minutos.

Os animais do grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, contudo não tiveram ligadura e nem as punções no ceco. Foi construída uma curva de sobrevivência para avaliar a percentagem de sobrevivência desses animais durante as 48h seguidas da indução.

4.2.1 MÉTODOS USADOS NA CARACTERIZAÇÃO DA SEPSE.

Inicialmente foi realizado um estudo piloto para a determinação do processo infeccioso através da contagem de UFC/ml no lavado peritoneal e no sangue e, desta forma, a confirmação do quadro infeccioso. Os animais foram divididos em 2 grupos com 10 animais. Em ambos os grupos também foi avaliado indiretamente a função renal pela dosagem plasmática dos biomarcadores creatinina, ureia, e proteína urinária. Todo procedimento ocorreu durante 48h após o procedimento CLP.

O lavado peritoneal foi obtido da seguinte maneira. Após assepsia da região abdominal com álcool iodado 1%, um volume de 5 ml de salina 0,9% estéril foi administrado na cavidade abdominal e, posteriormente, cerca de 0,5 ml do conteúdo peritoneal foi coletado. O sangue foi coletado por punção da veia cava abdominal. Volume de 100 µl das amostras foi semeado em placas contendo o meio de cultura ágar Mueller-Hinton (Difco™ Mueller hinton Agar, França) preparado seguindo as instruções do fabricante. Semeou-se o sangue puro e o lavado peritoneal foi diluído 1:1000, 1:10000 e 1:100000 em salina estéril antes da semeadura.

Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24 horas a 37° C e o número de colônias foram quantificados. Os resultados foram expressos como Log da Unidade Formadora de Colônias (UFC)/ml para as bactérias presentes no sangue e UFC/cavidade. Além disso, foram coletados plasma e urina nos animais para confirmação das alterações renais causadas pela indução do CLP.

4.3 COMPOSTOS [6]- E [10]-GINGEROL E OUTRAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.

Todos os produtos químicos e outras fármacos aqui mencionadas foram obtidos da Sigma-Aldrich® USA, ou Vetec® Brasil. Os compostos [6]- e [10]-gingerol foram obtidos por meio de técnica de isolamento padronizada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) conforme descrito previamente por Silva

et al., (2012), e cedidos gentilmente pelos Professores Dr. Jame's Almada da Silva e Dr. Paulo Cezar Vieira.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.

- **Grupo sham**

- i. Animais foram induzidos à cirúrgica falsa sham (cirúrgica placebo) conforme descrito no item 4.2. Não tiveram isolamento e perfuração do ceco.

- **Grupos controle substâncias [6]- e [10]-gingerol**

- ii. Animais receberam procedimento falso-cirúrgica conforme descrito no item 4.2, porém não tiveram isolamento e nem punção do ceco. Além disso, receberam o tratamento com [6]-gingerol (i.p, 25 mg/kg) 2h pré-cirúrgica e 12 e 24h pós-cirúrgico.
- iii. Animais receberam procedimento falso-cirúrgica conforme descrito no item 4.2, porém não tiveram isolamento e nem perfuração do ceco. Além disso, receberam o tratamento com [10]-gingerol (i.p, 25 mg/kg) 2h pré-cirurgia e 12 e 24h pós-cirúrgico.

- **Grupo CLP**

- iv. Animais receberam procedimento cirúrgico de CLP conforme descrito no item 4.2.

- **Grupo CLP + [6]- e [10]-gingerol**

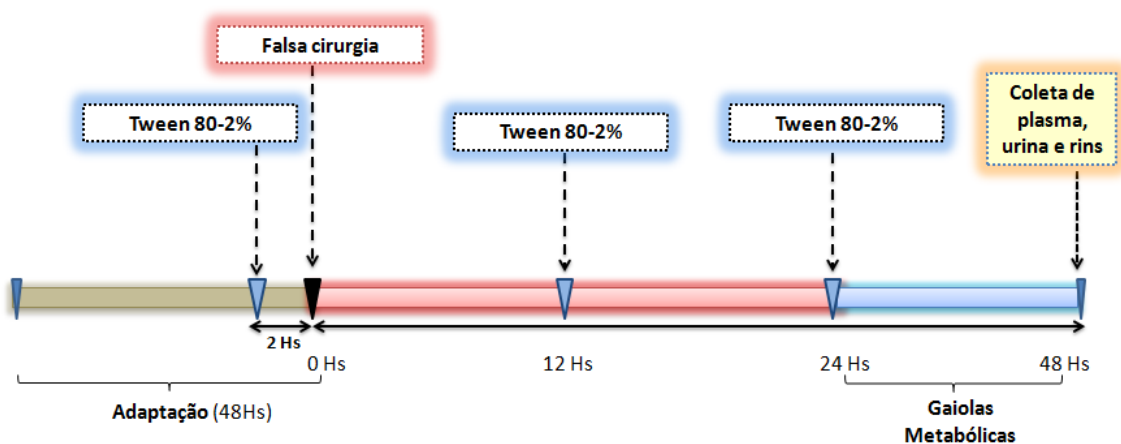
- v. Animais receberam procedimento cirúrgico CLP conforme descrito no item 4.2, seguido do tratamento com [6]-gingerol (i.p, 25 mg/kg) 2h pré-cirurgia, e 12 e 24h pós-cirúrgico.
- vi. Animais receberam procedimento cirúrgico de CLP conforme descrito no item 4.2, seguido do tratamento com [10]-gingerol (i.p, 25 mg/kg) 2h pré-cirurgia e 12 e 24h pós-cirúrgico.

4.5 DESENHO EXPERIMENTAL.

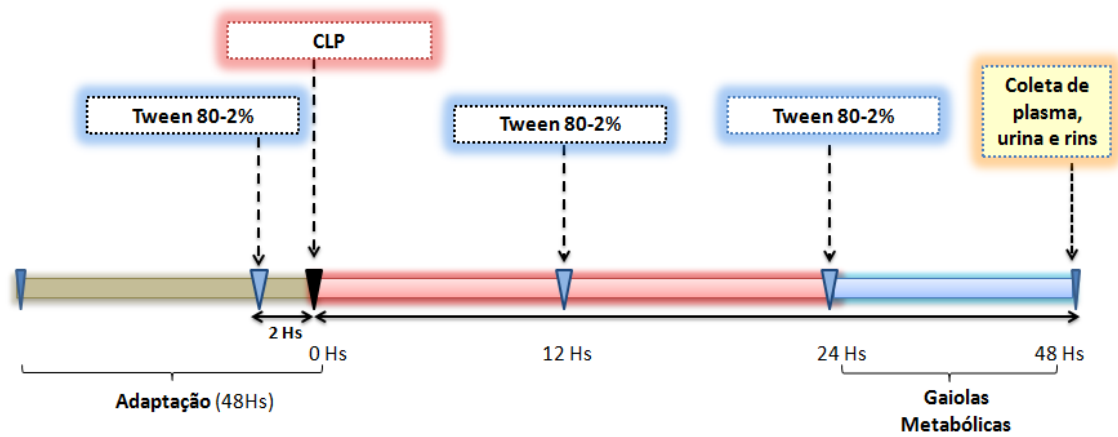
Os animais foram divididos aleatoriamente em seus respectivos grupos experimentais. Duas horas antes do processo indutor com falsa cirurgia sham ou CLP, os animais receberam veículo (tween-80 2%) e, os compostos [6]- ou [10]-gingerol 25

mg/kg (ip) conforme Rodrigues et al., (2014) e Kuhad et al., (2006). E subsequentemente, após a indução por falsa cirurgia sham ou por CLP, os animais continuaram a ser tratados com tween-80 2%, com [6]- ou [10]-gingerol na dose de 25 mg/Kg (ip), 12 e 24h após à indução da sepse polimicrobiana ou por falsa cirurgia (**Figura 11**). Todos os animais foram transferidos e mantidos individualmente em gaiolas metabólicas. Depois de coletar as amostras de urina em 24 horas, os ratos foram anestesiados com Ketamina (90mg/kg) e Xilasina (10mg/kg), colocados em uma mesa cirurgica com temperatura mantida em 37°C. Seguidamente, foi feita uma incisão na região abdominal, a veia cava abdominal foi dissecada e puncionada. Foram coletadas amostras de sangue em microtúbulos heparinizados ou não e, em seguida, centrifugados a 3.500 rpm, 4°C por 15 minutos. O plasma e soro obtidos foram armazenados a -80 °C para em seguida serem conduzidas às dosagens bioquímicas. Os rins foram coletados, pesados em uma balança de precisão analítica (Mettler Toledo- AB104S®). Em seguida, uma fração do tecido foi armazenada em formol 10% tamponado e, seguidamente, conduzido para a preparação de lâminas histológicas e execução do estudo histológico. O restante do tecido renal coletado foi dividido e quatro frações e armazenados a -80 para os ensaios com biologia molecular, dosagens da atividade antioxidante e de biomarcadores proteicos. Ao término das coletas os animais, ainda sob o efeito de anestesia, foram submetidos à eutanásia por desanguinação.

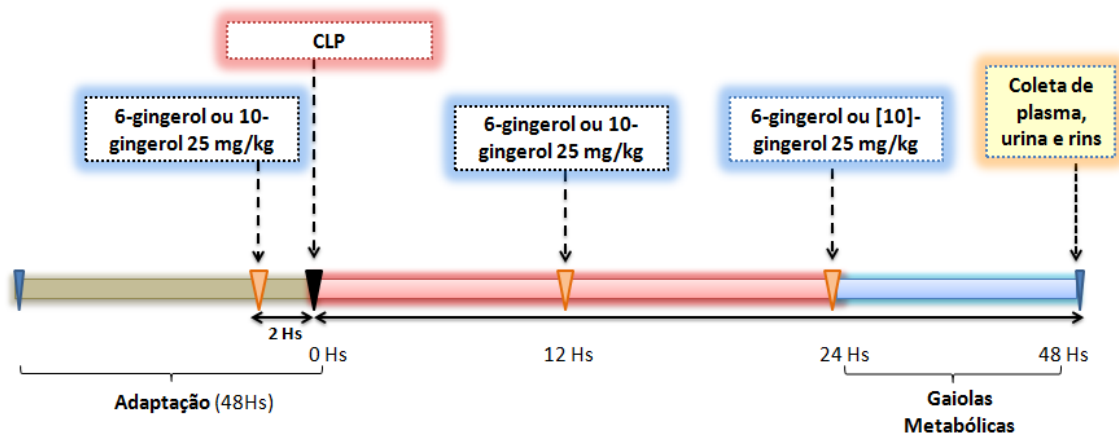
Figura 11- Desenho experimental, grupo controle: sham.



Fonte: Autor.

Figura 11.2- Desenho experimental, grupo: CLP.

Fonte: Autor.

Figura 11.3- Desenho experimental, grupos: CLP + [6]-gingerol, CLP+[10]-gingerol.

Fonte: Autor.

Figura 12- Utilização de gaiolas metabólicas durante execução experimental.

Fonte: Autor.

4.6 AVALIAÇÃO DA MANIFESTAÇÃO DE DIARREIA.

As manifestações de diarreia apresentada durante as 24 h nas quais os animais permaneceram em gaiolas metabólicas foram monitoradas e tabuladas em escores, segundo proposta por Nakagawa et al., (2007) com algumas adaptações. As quantificações foram realizadas a partir das observações feitas individualmente a cada animal, feitas nas últimas 24 h nas gaiolas metabólicas. Foram atribuídos escores: 0, Nenhuma manifestação; 1, moderada diarreia; 2, severa diarreia. Os resultados foram expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo.

4.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.

Alíquotas de ($\pm 200 \mu\text{l}$) urina e de plasma foram utilizadas para mensuração de creatinina, ureia, lactato, ácido úrico, LDH plasmáticos pelos kits Creatinina-K, Ureia-CE, lactato liquiform, ácido úrico-liquiform e LDH Liquiform, respectivamente. Já a proteína urinária o foi dosada pelo kit SensiProt®. Todos os kits mencionados foram comercialmente fornecidos pelo fabricante (Labtest®, Fortaleza, CE, Brasil) e os protocolos de diagnóstico seguiram as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL, U/L ou mm/L.

4.8 FUNÇÃO RENAL: CLEARANCE DE CREATININA.

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®, Fortaleza, CE, Brasil, como citado anteriormente. Estimou-se o Ritmo Filtração Glomerular (RFG) através do *clearance* de creatinina (CL_{CR}), este foi utilizado para determinar a função renal dos animais e calculado por meio da seguinte fórmula (RODRIGUES, 2013):

$$CL_{CR} = (CrU \times Vu / CrP)$$

Onde:

CrU = concentração urinária creatinina (mg/dL); Vu = volume urinário (mL/min);

CrP = concentração plasmática de creatinina (mg/dL).

Os valores do CL_{CR} foram expressos em mL/min.

4.9 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR

4.9.1 FRAÇÃO DA EXCREÇÃO DE SÓDIO, POTÁSSIO E CLORETO.

A fração excretada de sódio (FNa^+) e a fração excretada de potássio (FEK^+) consistem nos percentis de Na^+ , K^+ e Cl^- excretados em relação ao filtrado. A fração de excreção de sódio (FNa^+), (FEK^+) e (FECl^-) foram calculadas a partir da mensuração de sódio, potássio e cloreto urinário e plasmático por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil) utilizando o método eletrodo íon seletivo. Foi utilizado como diluente o Snap Park® (Roche, Brasil) para preparo da solução padrão e solução para mensuração de eletrólitos urinários. O aparelho foi calibrado usando padrão contendo 140 mEq/l de Na^+ e 5 mEq/l de K^+ . O controle para mensuração das amostras foi realizado com Isetrol® (Roche, Brasil).

Com as concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, potássio e potássio foram determinados às frações de excreção para Na^+ , K^+ e Cl^- (FNa^+ , FEK^+ e FECl^-), respectivamente conforme descrito previamente por Souza (2010). Estes parâmetros servem para analisar o manejo tubular de tais íons.

O cálculo utiliza as seguintes fórmulas:

$$\begin{aligned} \text{FNa}^+ &= \frac{\text{Clearance Na}^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100 \\ \text{FEK}^+ &= \frac{\text{Clearance K}^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100 \\ \text{FECl}^- &= \frac{\text{Clearance Cl}^-}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100 \end{aligned}$$

Os valores foram expressos em %.

4.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OSMOLARES

4.10.1 DETERMINAÇÃO DAS OSMOLALIDADES PLASMÁTICA E URINÁRIA.

A determinação das osmolalidades plasmática e urinária foi feita através de osmometria de congelamento (osmometro vapro 5520®) usando padrões com

osmolalidades apropriadas para as amostras de urina e plasma (100, 290 e 500 mOsm/kg). Conhecendo-se as osmolalidades plasmática e urinária, alguns parâmetros puderam ser quantitativamente avaliados, conforme as equações conforme Portella, (2009):

$$\text{Cosm (mL/min)} = \frac{\text{Osmolalidade}_{\text{urina}} (\mu\text{Osm/ml}) \times \text{FU (mL/min)}}{\text{Osmolalidade}_{\text{plasmática}} (\mu\text{Osm/ml})};$$

$$\text{CH2O (mL/min)} = \text{FU (mL/min)} - \text{Cosm (mL/min)}.$$

Cosm = clearance osmolar; CH2O = clearance de água livre; FU= fluxo urinário e RFG = Ritmo de filtração glomerular (CL_{CR}), ambos em mL/min.

4.11 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LÍPIDICA

4.11.1 DOSAGEM MALONDEALDEÍDO (MDA) URINÁRIO.

Para analisar o dano oxidativo renal desencadeado pelo modelo CLP e do possível tratamento com o [6]- e [10]-gingerol foi analisada a produção de malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica, determinada pela reação com ácido tiobarbitúrico. Para tanto, 0,4 ml da amostra de urina com 0,6 ml de H₂O foram adicionados a 1,0 ml de TCA (tricloroacético) 10% e 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2).

Todos os tubos de ensaio com a solução foram mantidos no gelo durante essa primeira etapa do processo. A solução foi homogeneizada e depois colocada em banho maria a 100 °C durante 20 min para que ocorresse a reação com o ácido tiobarbitúrico. Após refrigeração e adição de TCA 70%, a mistura final foi centrifugada por 15min a 3000 rpm e a leitura realizada por espectrofotometria em absorbância de 534 nm (WALKER e SHAH, 1990).

4.11.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO TECIDO RENAL DE RATOS.

Para confirmar o dano oxidativo direto no tecido renal e uma possível ação protetora dos gingeróis em estudo, o grau de lipoperoxidação no tecido foi mensurado

por meio da determinação dos níveis de MDA através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Ohkawa et al (1979). Foi feito um homogenato dos tecidos renais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. 250 µL do homogenato e, em seguida, foi adicionado 1,5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1% + 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Estes seguiram para banho fervente (95-100 °C) por 45 minutos. A mistura foi resfriada em água corrente e, a seguir, foi adicionado 2 mL de n-butanol. O tubo foi agitado no vórtex por 1 min. e centrifugado a 1200rpm/15min. Após a centrifugação foi retirado a fase orgânica para realização da leitura em espectrofotômetro (520-535 nm). Os resultados foram expressos em micromols de malondialdeído (MDA) por mg de proteína. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método adaptado de Bradford (1976).

4.12 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE NITRITO EM TECIDO RENAL DE RATOS.

A dosagem de nitrito é baseada na utilização do reagente de Griess. Este tem a capacidade de expor a presença de nitrito em amostras por uma reação de diazotização, formando durante a reação um cromóforo de cor rósea. O reagente é constituído de ácido fosfórico 5%, N-1-naftilenodiamina (NEED) 0,1%, Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e água destilada.

Para realização do ensaio foi feito homogenato a 10% do tecido renal com tampão de fosfato de potássio (PBS). O ensaio consiste na adição de 100 µL do sobrenadante do homogenato em 100 µL do reagente de Griess. Para a quantificação de nitrito uma curva padrão foi construída através de uma diluição seriada com concentrações de 100, 50, 25 12,5, 6,25, 3,12, e 1,56 µM. A leitura foi feita na faixa de absorvância de 560 nm (GREEN et al., 2000).

4.13 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM TECIDO RENAL DE RATOS.

O princípio do teste consiste na utilização do DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)], que extensivamente usado para analisar a atividade da GSH em amostra de tecidos. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB) de cor amarela que pode ser detectado por espectrofotometria (SEDLAK e LINDSAY, 1968).

Para avaliação das alterações no conteúdo tecidual renal (100mg) de glutatona reduzida foi feito homogenato a 10% em solução gelada de EDTA 0,02 M. O preparo das amostras foi feito da seguinte forma: 40 μ L de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato) foram adicionadas a 50 μ L de água destilada e 10 μ L de TCA (ácido tricloro acético) 50%. O material foi centrifugado a 3000 g por 10 min e retirado 60 μ L do sobrenadante, que foi adicionado às soluções de DTNB em tampão Tris. A curva padrão foi obtida mediante leitura de curva padrão de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μ g) e os resultados foram expressos em μ g/mg de proteína.

4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM TECIDO RENAL.

O homogenato (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (10 min, 3600 rpm a 4°C). O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para o ensaio utilizou-se o sobrenadante. Em uma câmara escura foram misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8), 30 μ L da amostra, 150 μ L do NBT 75 μ M e 300 μ L de riboflavina 2 μ M. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos à lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 min. A leitura foi feita espectrofotometricamente em 560nm (Sun et al., 1988). Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína.

4.15 AVALIAÇÃO DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, DE TRANSPORTE E MARCADORES PRECOSES DE LESÃO RENAL (RT-PCR).

4.15.1 Extração do RNA total

As amostras foram congeladas a -80 °C até o momento da extração. Foi feito um homogenato com trizol e, em seguida, a extração de RNA foi realizada com o sistema RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, 1 μ L de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com a finalidade de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

4.15. 2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) de acordo com o instruções do fabricante. O protocolo da reação continha 1 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µl do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para 200ng/µL e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para completar 20µL. O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, USA) foi 25° C por 5 min., 42° C por 30 min., e 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.15.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Conforme a Tabela 5, foram avaliados na transcrição do mRNA os genes relacionados com transporte e o processo pró-inflamatório celular, além da transcrição de, TNF- α , IL-1 β , INF- γ , TGF- β 1, KIM-1, AQP-2 com o aparelho do iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). O gene de referência utilizado foi o GADPH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Para a reação foi utilizado 10 µl da SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), 2 µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1 µl de cDNA das amostras completando com água livre de nucleases para um volume final de 20µL. Todos os iniciadores utilizados e as condições da qPCR estão na **Tabela 5**. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de melting, realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos) e os níveis relativo de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$, qual $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do grupo tratado}) / (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do controle})$ como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 5 - Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: senso e A: antisenso).

Processo Relacionado	Genes	Sequências dos iniciadores (5' - 3')	Prod. (pb)	n° NCBI	Condições do PCR	Fonte*
Inflamação e resposta inata	TNF- α	S – GTACCCACTCGTAGCAAAC AS – AGTTGGTTGTCTTTGAGATCCATG	107	NM_021578		RTprimer ID: 3899
	IL-1 β	S – GACCTGTTCTTTGAGGCTGACA AS – CTCATCTGGACAGCCCAAGTC	78	AF079314.1	95°C - 20''	RTprimer ID: 3771
	INF- γ	S – ACAGTAAAGCAAAAAAGGATGCA AS – GCTGGATCTGTGGGTTGTTC	69	NM_138880.2	60°C - 20'' 72°C - 45''	RTprimer ID:4300
	TGF- β 1	S- GGGCTACCATGCCAACTTCTG AS- GAGGGCAAGGACCTTGCTGTA	87	NM_021578.2		Zhao et al., 2016
Biomarcadores de função renal	KIM-1	S-CGCAGAGAAACCCGACTAAG AS-CAAAGCTCAGAGAGCCCATC	132	AF035963.1	95°C - 20'' 58°C - 20'' 72°C - 45''	Rached et al., 2008
Transporte celular	Aquaporina-2	S – GAGCAGCATGTGGGAACT AS – AGCGTGGCCAAGAATC	69	NM_012909.2	95°C - 20'' 58°C - 20'' 72°C - 45''	RTprimer ID:4280
Referência	GAPDH	S – GTTACCAGGGCTGCCTTCTCT AS – AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA	61	NM_013011.3	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	

* RTPrimer: <http://medgen.ugent.be/rtpimerdb/search.php>

4.16 RESONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS URINÁRIOS

4.16.1 Espectros de RMN e identificação dos metabólitos

Para a aquisição dos espectros de RMN de hidrogênio, 400 μ L de urina foi adicionado a 200 μ L de um solução tampão de fosfato preparado em D₂O (pH = 7,4) contendo 1mM de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-d4) e 2mM de azida de sódio (NaN₃). Uma alíquota de 550 μ L da solução resultante foi transferida para um tubo de RMN (5 mm). Os espectros foram adquiridos a 330 K usando um espectrômetro de RMN Bruker, modelo Avance DRX-500, observando o núcleo de hidrogênio a 499,6 MHz, equipado com uma sonda BBI (5 mm). Os espectros de ¹H foram adquiridos usando uma sequência de pulsos com supressão do sinal da água, *noesypr1d* (com tempo de recuperação (d1) de 20,0 s e com o tempo de mistura (d8) de 100 ms), usando 64 K de número de pontos, janela espectral de 25 ppm e 128 transientes (NS). O *shimming*, *matching*, *tunning* e a largura do pulso (p1) foi ajustado para cada amostra. Os espectros foram processados no programa TOPSPIN com 64K pontos aplicando-se uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz. Os deslocamentos químicos foram calibrados em relação ao sinal do TMSP-d4 (0,0 ppm). As atribuições

dos sinais referentes aos metabólitos presentes na urina foram baseadas em experimentos de RMN 1D e 2D, bem como na comparação com os dados de RMN disponíveis no banco de dados *Human Metabolome Database* (HMDB, <http://www.hmdb.ca>) e na literatura (SERRANO-CONTRERAS et al. 2016, PELANTOVÁ et al., 2015).

4.16.2 Análise de componentes principais

Para análise de componentes principais (PCA) dos dados utilizou-se o programa AMIX® (versão 3.9.12, Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). A região do espectro utilizada foi de 0,50-9,00 ppm divididas em intervalos (denominados *buckets*) de 0,02 ppm. As áreas referentes aos sinais residuais da água (4,5-5,3 ppm) e da uréia (5,53-5,97 ppm) foram excluídas gerando uma matriz de dados composta de 40 amostras (linhas) e 251 variáveis (colunas) para cada amostra. A área de cada *bucket* foi integrada usando o modo de integração especial (*special integration mode*). Em seguida, os espectros foram escalados com relação à intensidade total (*scaled to total intensity*), ou seja, a intensidade do sinal medido para cada *bucket* foi dividida pela integral de todos os sinais do espectro. Dessa forma, as diferenças espectrais oriundas da variação da quantidade da amostra empregada podem ser minimizadas. Por outro lado, foi aplicado o escalamento por Pareto (*Pareto scaled*) nas colunas. A identificação dos metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos foi realizada através dos gráficos de influências (*loadings*), que mostram o peso relativo de cada *bucket* para as tendências observadas no gráfico de escores.

4.16.3 Quantificação dos metabólitos presente na urina

A quantificação dos metabólitos responsáveis pela discriminação das amostras foi realizada no conjunto de dados original usando o TMSP-d4 como referência interna. Para compensar a variação no volume da urina das amostras, as concentrações dos metabólitos foram normalizadas em relação ao valor da creatinina em cada amostra (os resultados foram expressos como mM/M de creatinina). Para a normalização dos dados, a função de múltipla integração do AMIX-viewer foi empregado e em seguida conduzido ao tratamento estatístico relacionado a dados não paramétricos.

4.17 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Os rins dos animais de todos os grupos foram seccionados transversalmente e uma quantidade foi armazenado em cassetes histológicos e armazenado em formol 10% tamponado por 48 horas. Logo após esse período foram armazenados em álcool 70% até o processo de fixação. O material foi conduzido ao processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser desidratado em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento, realizou-se a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina com corte em 5µm de espessura foram colocados em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas pela técnica hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI), sendo posteriormente registradas através de fotomicrografias.

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM) ou valor mediano, máximo e mínimo. Os dados foram analisados previamente pelo teste normalidade de *Shapiro–Wilk test*, seguido do pós-teste teste *T student* (dados normais), Mann Whitney (dados não normais). Para avaliação de múltiplos grupos foi feita a análise de Variância (ANOVA) seguido do teste Bonferroni's post hoc (dados normais) ou aplicação do teste *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste Dunn's (dados não normais). Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$. A análise foi realizada usando o programa GraphPad Prism 5.0 (Software GraphPad, USA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

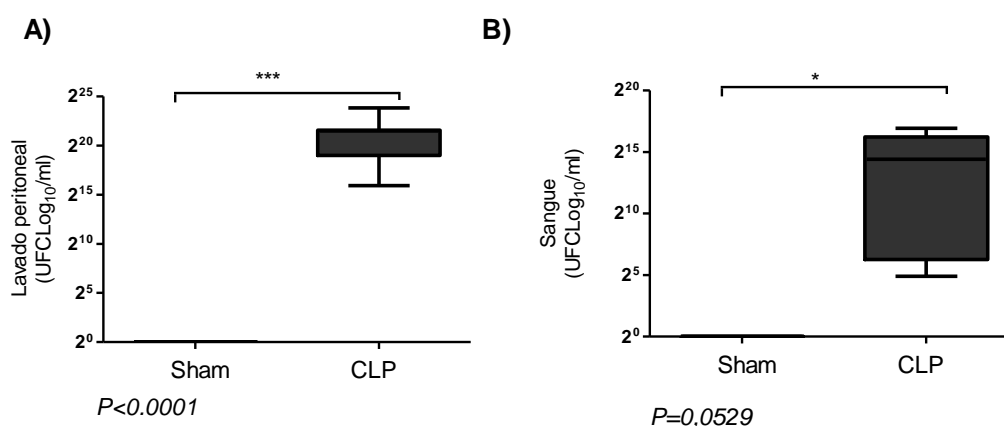
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO POLIMICROBIANO DE SEPSE (CLP) ASSOCIADO ÀS ALTERAÇÕES RENAIAS.

Os resultados a seguir apresentam a caracterização do modelo adotado. Estes reportam os dados referentes à quantificação de bactérias após a indução da polinfecção e a expressão dos biomarcadores clínicos renais. Os dados são oriundos dos experimentos pilotos realizados previamente ao início do protocolo experimental.

5.1.1 Presença de bactérias na cavidade peritoneal e no sangue de animais induzidos à sepse.

Inicialmente, foi realizado um bloco de experimentos pilotos para caracterizar o processo infeccioso, juntamente com a identificação das alterações nos marcadores renais desencadeados pelo modelo CLP. Conforme apresentado na **Figura 13-A** os animais do grupo CLP apresentaram valores medianos elevados e significativos de UFC no lavado peritoneal quando comparado ao grupo Sham, ($P < 0,001$). De acordo com a **Figura 13-B** os animais do grupo CLP mantiveram também valores medianos elevados de presença de bactérias no sangue quando comparado ao grupo sham ($P = 0,0529$). Os animais do grupo Sham não apresentaram bactérias em ambos os líquidos biológicos avaliados (sangue e lavado peritoneal), (**Figura 13**).

Figura 13- Unidades Formadoras de Colônias durante a padronização do modelo do modelo CLP.

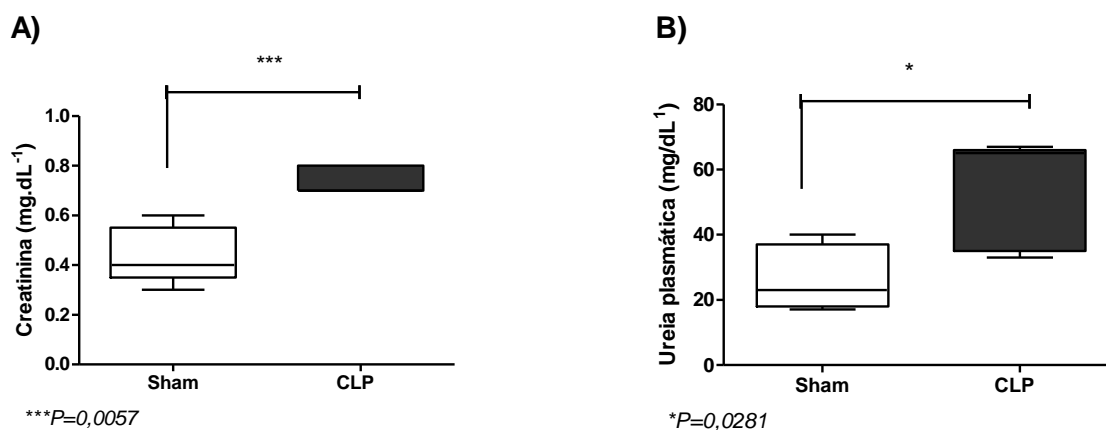


Os resultados referentes as unidades formadoras de colônia (UFC/ml) no lavado peritoneal (A) e no sangue (B) de ratos jovens submetidos ao processo CLP (n =6-7). Foi realizado test Mann Whitney. *** $P < 0,001$ e $P = 0,0529$ em relação ao grupo Sham.

5.1.2 Determinação dos biomarcadores renais durante a padronização do modelo CLP em ratos jovens.

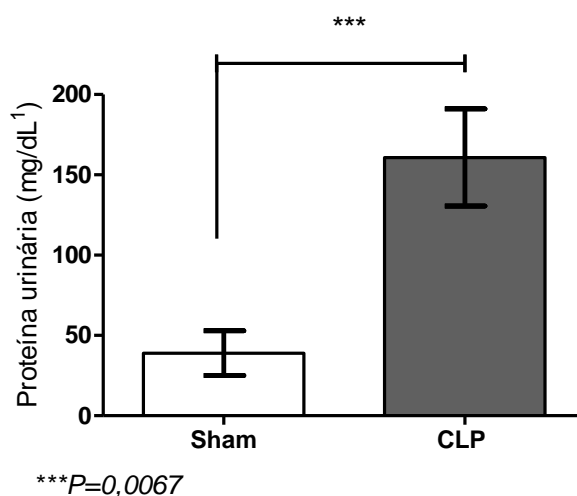
No intuito de confirmar as alterações renais nos animais submetidos ao processo infeccioso polimicrobiano, realizou-se a dosagem de compostos nitrogenados, creatinina e ureia em ambos os grupos experimentais. Por meio da Figura 14-A podemos observar que os animais do grupo CLP, após 48hs de indução, apresentaram aumento significativo nos valores medianos de creatinina (0,70 mg/dL) frente ao grupo Sham (0,40 mg/dL), ($P=0,0057$). O mesmo foi observado para os valores plasmáticos medianos de ureia (65,00 mg/dL) quando comparado ao grupo Sham (23,00 mg/dL) ($P<0,02$), observados na imagem 14-B. Por conseguinte, através da figura 15 podemos observar que os animais do grupo CLP apresentaram aumento da presença de proteínas na urina ($160,8\pm 30,2$ mg/dL) quando comparado ao grupo controle sham ($38,95\pm 13,94$ mg/dL), ($P<0,001$).

Figura 14 – Aumento de creatinina e ureia sérica induzida pelo método CLP em ratos.



Os valores representam a mediana, valor mínimo e máximo concentração de creatinina (A) e ureia (B) plasmática (mg/dL), ($n = 6-8$), após a indução de sepse pelo método CLP. A análise estatística foi feita pelo teste normalidade (Shapiro–Wilk test), seguida do pós-teste Mann Whitney. $***P = 0,0057$ e $*P = 0,0281$ em relação ao grupo Sham.

Figura 15- Alteração nos níveis de proteína urinária induzida pelo modelo polimicrobiano de sepse em ratos.

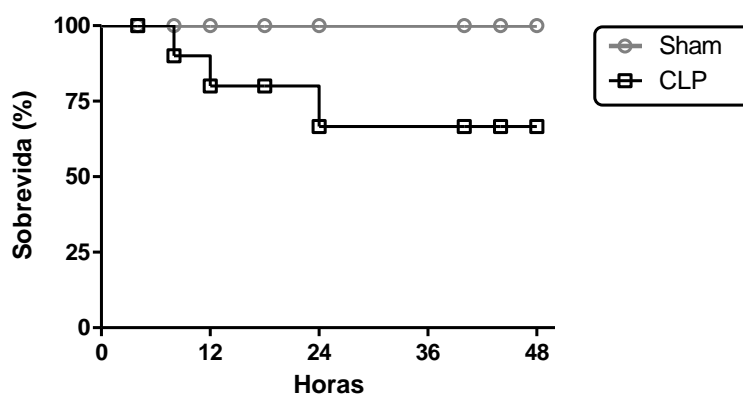


Os valores representam a média±erro padrão da média de proteinúria ($n = 6-7$) em animais induzidos ao método CLP. A análise estatística foi realizada pelo teste normalidade (Shapiro–Wilk test), seguida do teste *T student*. *** $P = 0,0067$ em relação ao grupo Sham.

5.1.3 Sobrevida dos animais durante a padronização do modelo CLP.

Conforme a **Figura 16**, o processo cirúrgico do método CLP desencadeou uma redução da sobrevida dos animais no grupo séptico (48hs: 66,6 %) em relação ao grupo sham que manteve 100% de sobrevida após 48hs seguida à indução.

Figura 16- Curva de sobrevida dos animais submetidos à cirurgia para a indução de sepse pelo modelo CLP.



Os valores estão expressos em percentagem de sobrevida nas 48 h após a indução da sepse pelo método CLP. Sobrevida de 100% e 66,6 % nos grupos Sham ($n=6$) e CLP ($n=9$), respectivamente.

5.2 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DOS COMPOTOS [6]-GINGEROL E [10]-GINGEROL SOBRE AS ALTERAÇÕES RENAIIS INDUZIDAS PELO MODELO CLP.

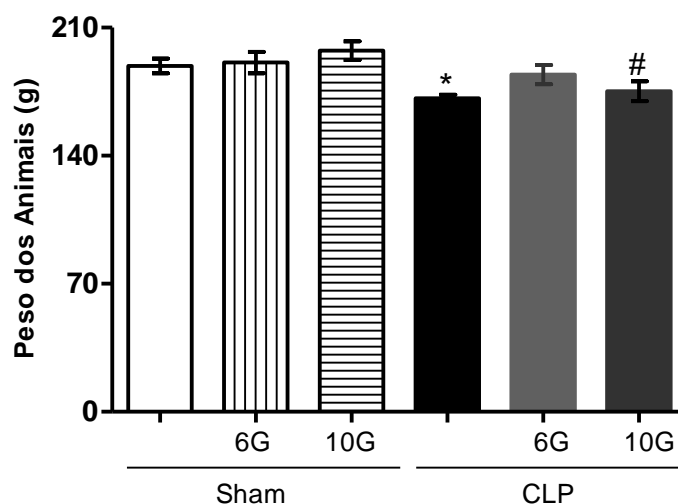
Após a caracterização do modelo CLP, com correlação entre infecção e biomarcadores renais, os resultados reportados nesta seção são referentes aos dados experimentais da investigação do efeito dos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol diante das alterações renais desencadeadas pela septicemia em ratos jovens, utilizando o modelo de sepsis induzido por ligadura e perfurações cecal, modelo CLP (*cecal ligation puncture*), que é caracterizado por extravasamento do conteúdo cecal e infecção polimicrobiana. Especificamente, o trabalho concentrou-se na investigação do perfil bioquímico de marcadores renais, parâmetros da função renal, estresse oxidativo e avaliação do aspecto morfológico renal e da participação do processo inflamatório diretamente ao órgão.

5.2.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS GERAIS.

5.2.1.1 Análise do peso dos animais submetidos ao dano renal pelo modelo polimicrobiano de Sepsis (CLP) e subsequentemente tratados com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Conforme a figura 17, o peso corporal dos animais pertencentes aos grupos *Sham*, *Sham-6G* e *Sham-10G*, mantiveram um padrão semelhante (189,0±4,01g; 191,0±5,8g e 197,5±5,1g, respectivamente) não se diferenciando estaticamente entre si. O processo cirúrgico com CLP desencadeou nos animais uma diminuição significativa de peso (171,3±2,05g) em relação ao grupo *Sham-10G* ($P < 0,001$). Esse fenômeno também foi observado no grupo CLP+10G (175,3±5,4 g) em relação ao grupo *Sham-10G* após as 48h da indução cirúrgica ($P < 0,05$), (**Figura17**).

Figura 17- Efeito do [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre o peso dos animais induzidos ao dano renal pelo modelo CLP 48 horas da indução.

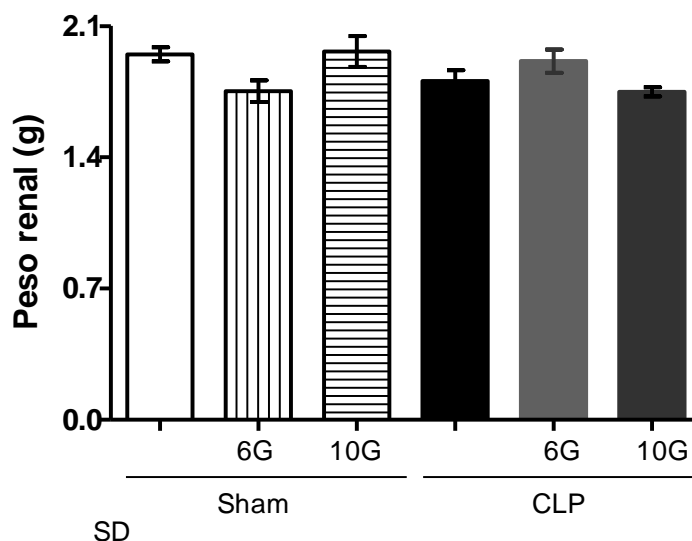


Os valores representam a média±erro padrão da média dos valores do peso dos animais (n=7-8) em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni's. * $P < 0,001$ vs Sham-10G, # $P < 0,05$ vs Sham-10G.

5.2.1.2 Determinação do peso renal de animais induzidos à sepse (CLP) e subsequentemente tratados pelos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Alterações e complicações renais podem desencadear modificações no peso e na arquitetura renal, resultante de fatores como a retenção hídrica e edema celular. A **figura 18** demonstra que o peso renal em todos os grupos não se alterou. Sem diferença estatística nesse parâmetro, tanto nos grupos controles Sham, *Sham-6G*, *Sham-10G* ($1,9 \pm 0,033$ g; $1,7 \pm 0,05$ g e $1,9 \pm 0,08$ g, respectivamente), ou quando estes foram comparados com os grupos CLP e CLP tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol, ($1,8 \pm 0,05$ g; $1,9 \pm 0,06$ g e $1,7 \pm 0,02$ g, respectivamente), ($P > 0,05$) (**Figura18**).

Figura 18- Animais sépticos seguidos dos tratamentos com [6]-gingerol, [10]-gingerol e não modificam o peso renal durante os tratamentos experimentais.



Os valores representam a média \pm erro padrão da média dos valores do peso dos animais ($n = 7-8$) em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente, tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. SD: Sem diferença estatística.

5.2.1.3 Determinação do consumo de água por animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

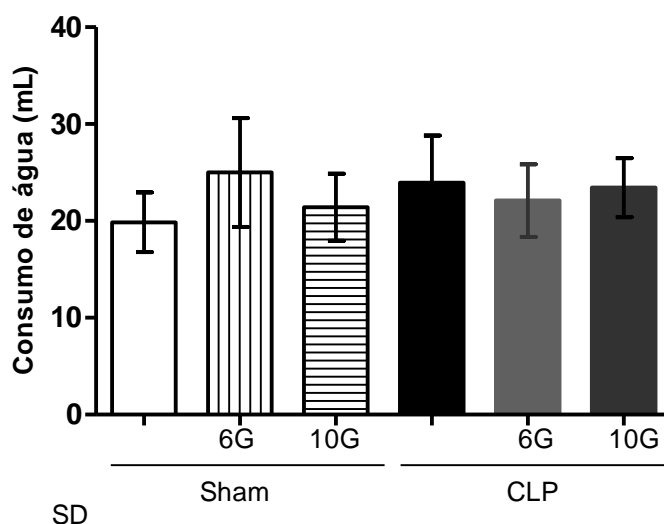
A figura 19 apresenta os valores de consumo de água durante o período experimental, nas últimas 24h, e conforme observado não ocorreu diferença entre a ingestão dentre todos os grupos avaliados (**Figura19**).

5.2.1.4 Avaliação da manifestação de diarreia em animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

De acordo com a **figura 20** os animais dos grupos sham, Sham-6G e Sham-10G não manifestaram presença de diarreia após a indução por falsa cirurgia [0 (0-)]. No entanto o grupo CLP apresentou significativa presença de diarreia [2(1-3)], quando este foi comparado aos grupos Sham, Sham-6G e Sham-10G, ($P < 0.01$). Os compostos utilizados como tratamentos apresentaram uma tendência à redução da manifestação de diarreia pós o evento diarreico nos animais dos grupos CLP+6G [0,5 (0-2)] e CLP+10G

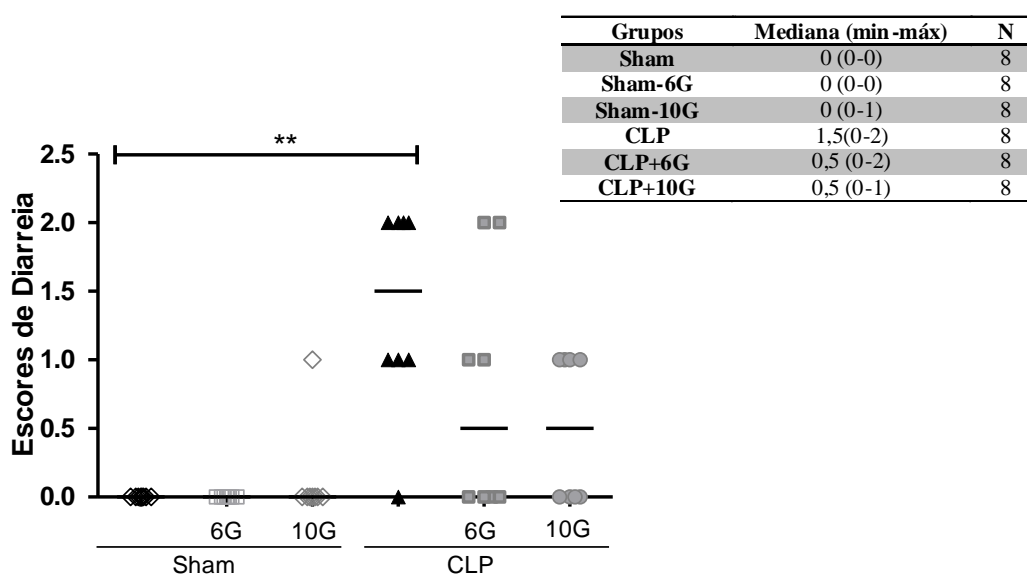
[0,5(0-1)], em relação ao grupo CLP de forma específica, porém sem diferença estatística, ($P>0,05$), (**Figura20**).

Figura 19- Detetminação do consumo de águas nos animais induzidos ao dano renal pelo modelo CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Os valores representam a média±erro padrão da média do consumo de água dos animais durante o período de 24hs (n=7-8) em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni's. SD: Sem diferença estatística.

Figura 20- Avaliação dos escores de diarreia após o tratamento com os compostos 6- gingerol e [10]-gingerol em animais induzidos ao dano renal pelo modelo CLP.



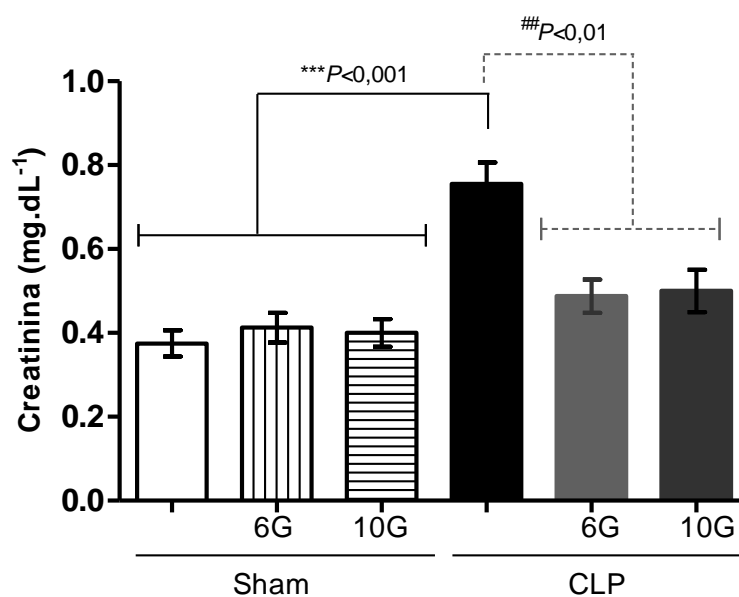
Os valores representam a mediana dos escores da manifestação de diarreia em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol (n=8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn's. *** $P<0,01$ vs CLP.

5.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL.

5.3.1 Determinação dos níveis séricos de creatinina em animais induzidos a Sepses (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Conforme exposto na **figura 21**, os animais dos grupos controles não se diferenciaram entre si em relação aos valores de creatinina plasmática [Sham ($0,3 \pm 0,03$ mg/dL), Sham-6G ($0,4 \pm 0,034$ mg/dL) e Sham-10G ($0,40 \pm 0,03$ mg/dL)]. Os valores de creatinina foram aumentados de forma significativa no grupo CLP ($0,75 \pm 0,05$ mg/dL) em relação ao grupo Sham e demais grupos, ($P < 0,001$). Ambos os grupos, CLP+6-G ($0,48 \pm 0,03$ mg/dL) e CLP+10G ($0,50 \pm 0,01$ mg/dL) tiveram valores significativamente inferiores em relação ao grupo CLP ($P < 0,01$), (**Figura 21**).

Figura 21- [6]-gingerol e [10]-gingerol reduzem os níveis plasmáticos de creatinina em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.

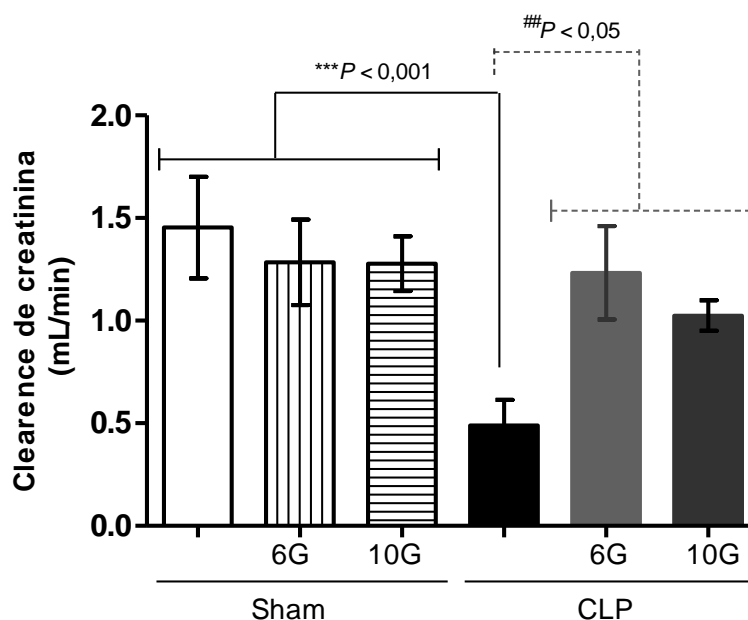


Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis plasmáticos de creatinina em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. Grupos durante o período de 24hs (n = 7-8): Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. *** $P < 0,001$ vs CLP, ## $P < 0,01$ vs CLP.

5.3.2 Determinação do ritmo de filtração glomerular (*clerance de creatinina*) de animais induzidos à sepse (CLP) e subsequentemente tratados pelos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

A taxa de função renal foi determinada pelo RFG através da estimativa do *Clarence* de Creatinina (CL_{CR}), que teve o intuito de avaliar a velocidade e a eficiência da filtração renal como também diagnosticar disfunção ou diminuição do fluxo sanguíneo renal. Conforme a **figura 22** os animais do grupo CLP apresentaram redução significativa no CL_{CR} ($0,46 \pm 0,1$ mL/min) quando comparado ao grupo Sham ($1,4 \pm 0,2$ mL/min), Sham-6G ($1,2 \pm 0,2$ mL/min) e Sham-10G ($1,2 \pm 0,13$ mL/min), ($P < 0,001$). O tratamento com [6]-gingerol foi efetivo em manter o CL_{CR} no grupo CLP+6G ($1,2 \pm 0,2$ mL/min) de forma satisfatória e adequada em relação ao grupo CLP ($P < 0,01$). O grupo CLP+10G ($1,0 \pm 0,07$ mL/min) também obteve valores de CL_{CR} estaticamente maiores do que o grupo CLP, ($P < 0,05$). Não se observou qualquer diferença entre os grupos controles (**Figura22**).

Figura 22- Recuperação do RFG (*Clarence* de creatinina) pelos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol diante a injuria renal pelo método CLP.

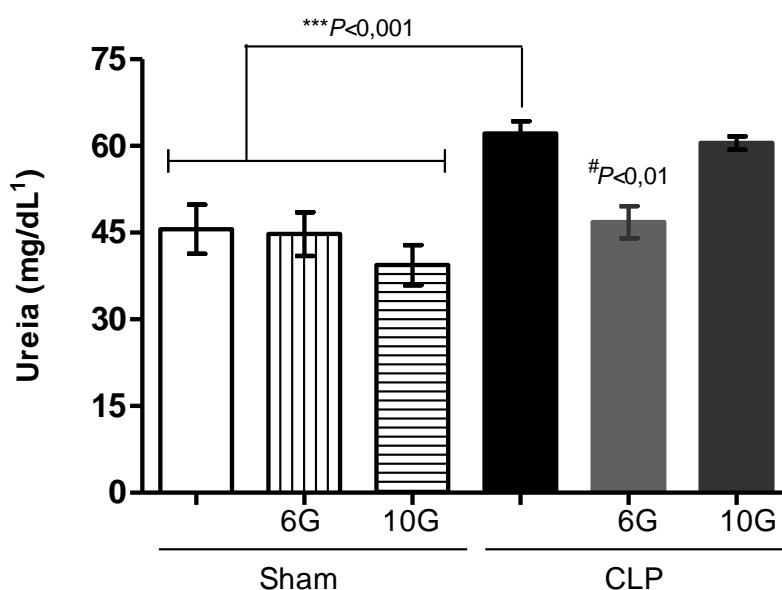


Os valores representam a média \pm erro padrão do *Clarence* de creatinina de animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. durante o período de 24hs (n = 7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. *** $P < 0,001$ vs CLP, ## $P < 0,05$ vs CLP.

5.3.3 Determinação da concentração plasmática de ureia em animais induzidos à sepse (CLP) e subsequentemente tratados pelos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

No presente estudo, de acordo com a figura 23, a indução do processo infeccioso experimental desencadeou um aumento significativo nos valores de ureia plasmática no grupo CLP ($62,1 \pm 2,1 \text{ mg/dL}$), quando comparados aos grupos controles Sham ($45,6 \pm 4,2 \text{ mg/dL}$), Sham-6G ($44,7 \pm 3,7 \text{ mg/dL}$) e Sham-10G ($39,3 \pm 3,4 \text{ mg/dL}$) ($P < 0,001$). No entanto, o grupo CLP+6G ($46,8 \pm 2,7 \text{ mg/dL}$) com animais tratados com [6]-gingerol, manifestou redução significativa nos valores deste metabólito plasmático em relação ao grupo CLP ($P < 0,05$). A mesma figura ainda reporta que os animais do grupo CLP+10G ($53,6 \pm 4,3 \text{ mg/dL}$) não obtiveram valores diferentes em relação ao grupo CLP, (Figura23).

Figura 23- Aumento dos valores plasmáticos de ureia pelo modelo CLP é reduzido pelo tratamento com o composto [6]-gingerol.

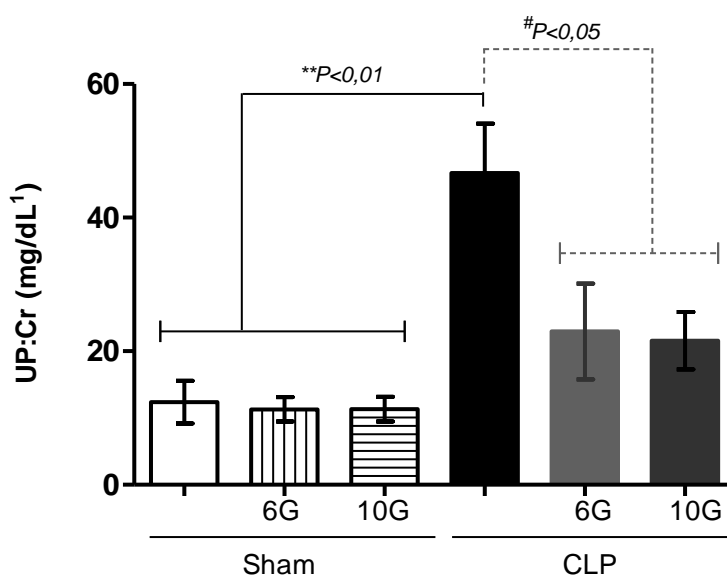


Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis plasmáticos de ureia em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. ($n = 7-8$). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $***P < 0,001$ vs CLP, $\#P < 0,01$ vs CLP.

5.3.4 Determinação da razão proteína urinária/creatinina (PU/C_{RU}) em animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Conforme observado na **figura 24** a razão PU:C_{RU} aumentou de forma significativa no grupo CLP (46,6±7,4 mg/dL) quando comparado ao grupo Sham (12,3±3,1 mg/dL), Sham-6G (11,2±1,8 mg/dL) e sham10-G (11,3±1,8 mg/dL), ($P<0,01$). Os tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol, nos grupo CLP+6G (45,5±12,7 mg/dL) e CLP+10G (47,9±8,7 mg/dL), respectivamente, demonstraram a habilidade de reduzir a presença de proteínas na urina quando comparado ao grupo CLP, ($P<0,001$). Não foi observada diferença estatística entre os grupos controles, ($P<0,05$) (**Figura24**).

Figura 24- Compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol diminuem a razão proteína/creatinina urinárias de ratos induzidos à falha renal pelo modelo CLP.



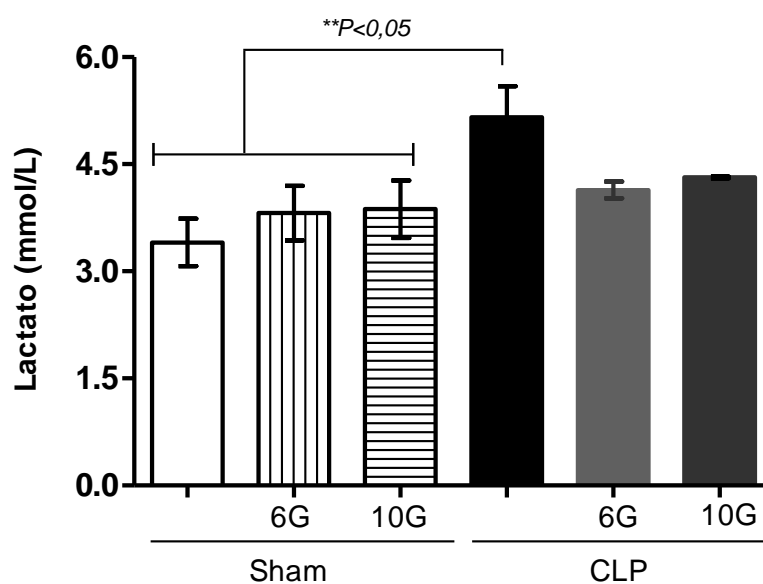
Os valores representam a média ± erro da razão proteína/ creatinina urinárias (PU:C_{RU}), durante 24hs, em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n = 7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $**P<0,01$ vs CLP, $^{\#}P<0,05$ vs CLP.

5.3.5 Determinação da concentração de lactato sérico em animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Conforme a **figura 25** ocorreu significativo aumento na concentração de lactato plasmático nos animais do grupo CLP ($5,1 \pm 0,4$ mmol/L) quando este foi comparado aos grupos controles Sham ($3,4 \pm 0,3$ mmol/L), Sham-6G ($3,3 \pm 0,2$ mmol/L) e Sham-10G ($3,8 \pm 0,4$ mmol/L).

O tratamento com [6]-gingerol e [10]-gingerol, nos grupos CLP+6G ($4,2 \pm 0,12$ mmol/L) e CLP+10G ($4,2 \pm 0,2$ mmol/L), respectivamente, diminuem os valores observados no grupo CLP, porém essa redução não foi estatisticamente diferente (**Figura25**).

Figura 25- Sepse polimicrobiana aumenta os níveis de lactato em animais induzidos a injúria renal.



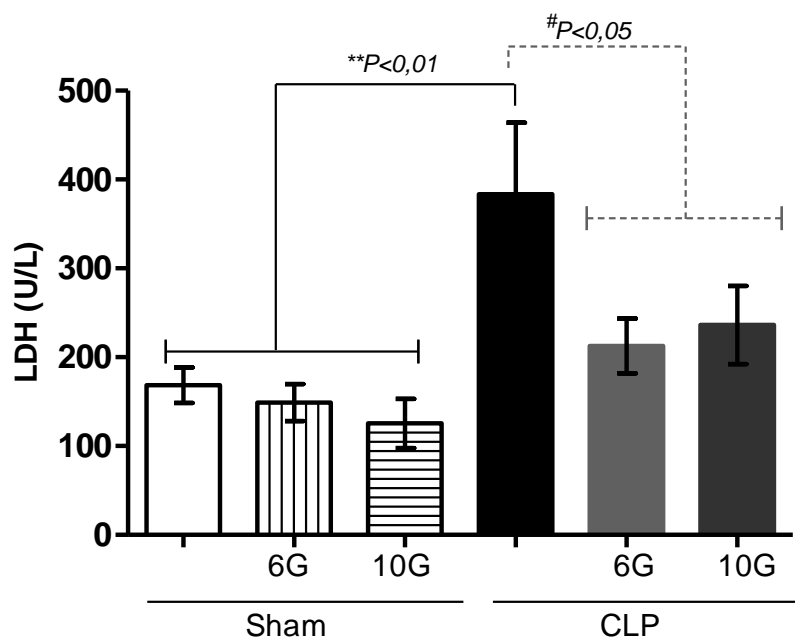
Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis séricos de lactato em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. durante o período de 24hs ($n = 7-8$). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $**P < 0,05$ vs CLP.

5.3.6 Determinação da concentração de LDH plasmático em animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Conforme demonstrado na figura 26, o grupo CLP aumentou os valores séricos da lactato desidrogenase de forma significativa quando comparado aos grupos controles, grupo CLP: $383,7 \pm 80,2$ U/L versus Sham: $168,5 \pm 19,8$ U/L; Sham-6G: $149,0 \pm 20,9$ U/L e Sham-10G: $125,5 \pm 2,6$ U/L, ($P < 0,05$). Não se observou diferença entre os grupos controles.

Os níveis de LDH foram reduzidos nos animais sépticos quando estes receberam o tratamento com [6]-gingerol, grupo CLP+6G ($212,7 \pm 30,8$ U/L). O mesmo perfil de comparação estatística foi obtido para os animais que receberam o tratamento com o [10]-gingerol, grupo CLP+10G ($236,3 \pm 43,8$ U/L), (**Figura 26**).

Figura 26- [6]-gingerol e [10]-gingerol reduzem a atividade da LDH em animais induzidos a sepse polimicrobiana pelo método CLP.

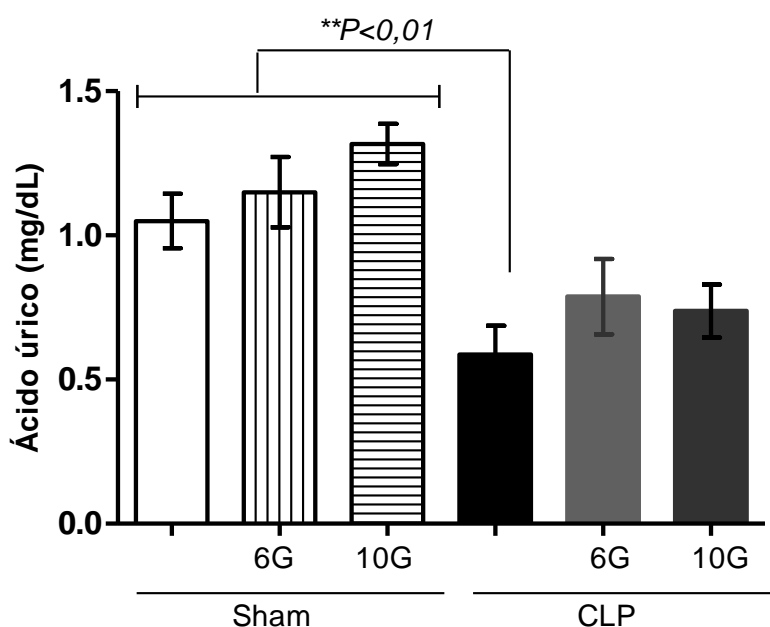


Os valores representam a média ± erro padrão dos níveis plasmáticos de LDH, em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. ($n = 7-8$). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,001$ vs CLP, # $P < 0,05$ vs CLP.

5.3.7 Determinação dos valores de ácido úrico em animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Conforme a figura 27, os níveis séricos de ácido úrico foram diminuídos no grupo CLP ($0,58 \pm 0,09$ mg/dL) quando estes foram comparados aos controles sham, sham-6G e 10-G ($1,0 \pm 0,09$ mg/dL; $1,150 \pm 0,12$ mg/dL e $1,317 \pm 0,07$ mg/dL, respectivamente), ($P < 0,01$). O tratamento com os compostos fenólicos [6]-gingerol e [10]-gingerol não modificou a diminuição desse marcador nos animais sépticos ($0,78 \pm 0,13$ mg/dL; $0,73 \pm 0,09$ mg/dL).

Figura 27- Processo infeccioso através do método CLP diminui os níveis de ácido úrico sérico em animais com injúria renal.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis plasmáticos de ácido úrico em animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. ($n = 7-8$). Grupo: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $*P < 0,01$ vs CLP.

5.3.8 Determinação do volume e fluxo urinário em animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

A figura 28 apresenta os valores para o fluxo urinário por minuto durante 24h (**Figura28-A**) e o débito urinário (volume de urina) (**Figura28-B**). Conforme expresso na figura 28-A e -B, os animais do grupo CLP tiveram um reduzido fluxo urinário e uma baixa produção de urina ($0,008 \pm 0,001$ mL/min e $11,98 \pm 1,6$ ml/24h) em relação aos grupos controles: Sham ($0,01 \pm 0,002$ mL/min e $22,5 \pm 2,8$ ml/24h), Sham-6G

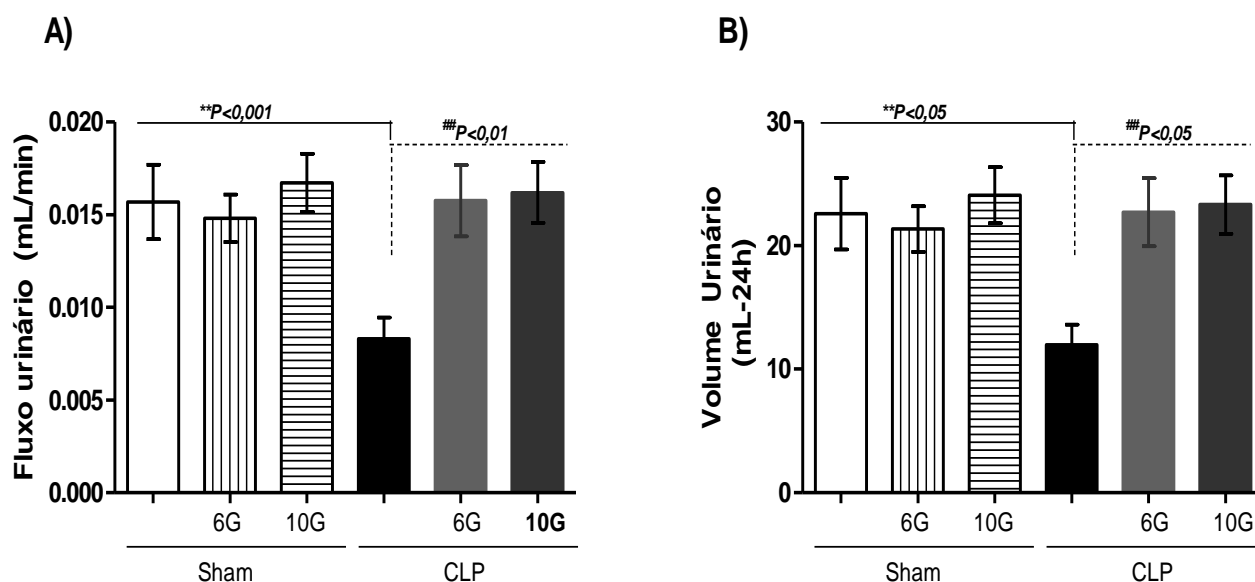
($0,01 \pm 0,001$ mL/min e $21,3 \pm 1,8$ ml/24h) e Sham-10G ($0,01 \pm 0,001$ mL/min e $24,08 \pm 2$ ml/24h), desta forma caracterizando a injúria renal como oligúrica.

O tratamento com [6]-gingerol foi eficiente em restabelecer o fluxo urinário e o débito urinário, grupo CLP+6G [$0,01 \pm 0,001$ mL/min (a) e $22,7 \pm 2,7$ ml/24h (b)] em relação ao grupo CLP. Por meio da mesma figura podemos ainda observar que os animais que receberam o tratamento com [10]-gingerol também restabeleceram os parâmetros avaliados de fluxo e volume urinário [$0,01 \pm 0,001$ mL/min (a) e $23,3 \pm 2,3$ ml/24h (b)].

5.3.9 Avaliação da transcrição gênica de aquaporina-2 (AQP-2) no tecido renal de ratos induzidos com CLP, tratados com 6-gingerol e 10-gingerol.

No intuito de identificar se as alterações encontradas para o débito urinário, como também se o fluxo urinário foi dependente da participação de AQP-2 realizou-se a verificação da participação desse transportador no epitélio renal. Como demonstrado na figura 29 a expressão quantitativa relativa de AQP-2 não foi alterada no modelo estudado entre o grupo controle e os demais ($P > 0,05$).

Figura 28- [6]-gingerol e [10]-gingerol normalizam fluxo e o volume urinário em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.



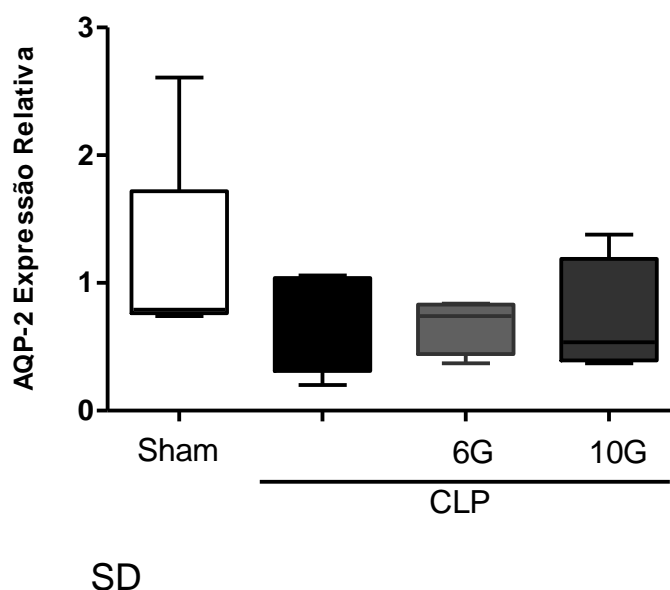
Os valores representam a média \pm erro padrão dos volumes (FiguraA) e fluxo urinários (FiguraB) em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n=7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $**P < 0,001$ vs CLP, $##P < 0,01$ vs CLP.

5.4 ANÁLISE DA FUNÇÃO TUBULAR

5.4.1 Determinação da função tubular, fração de excreção de Na^+ , k^+ e Cl^- em animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Como observado na figura 30-A os animais do grupo CLP induzidos a septicemia aumentaram significativamente as taxas de excreção de Na^+ em relação ao grupo sham (CLP: $1,2 \pm 0,19\%$ vs Sham: $0,43 \pm 0,07\%$), ($P < 0,05$). Os animais quando tratados com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol tiveram uma redução nesses valores com $P < 0,05$ (Sham-6G $0,61 \pm 0,14\%$ e Sham-10G $0,58 \pm 0,09\%$), respectivamente. Não ocorreram alterações significativas entre os grupos controles sham-6G ($0,4 \pm 0,05\%$) e Sham-10G ($0,6 \pm 0,1\%$), (**Figura30-A**).

Figura 29 - [6]-gingerol e [10]-gingerol e o processo CLP não modificaram a transcrição gênica de AQP-2 no tecido renal de ratos submetidos á falha renal.



Os valores da figura representam os valores medianos da transcrição gênica de AQP-2 no tecido renal. Grupos: Sham, CLP, CLP+ 6G e CLP+ 6G. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. SD: Sem diferença estatística.

Já em relação à fração de excreção de k^+ , observou-se uma elevação nesse parâmetro nos animais induzidos ao dano renal, grupo CLP ($48,6 \pm 15,2\%$). Se diferenciando de forma estatística quando comparado ao grupo Sham ($28,16 \pm 7,2\%$), grupo sham-6G ($30,1 \pm 4,7\%$) e grupo sham-10G ($21,3 \pm 3,1\%$), $P < 0,05$. Foi notado

também que o tratamento com o composto [6]-gingerol reduziu os valores para FEK^+ ($23,5 \pm 4,3\%$) e o mesmo foi observado para o tratamento com o composto [10]-gingerol, configurado no grupo CLP+10G ($37,1 \pm 6,3\%$). No entanto, em ambos os grupos reduziram este parâmetro de forma similar (**Figura 30-B**).

De acordo com a **figura 30-C**, a fração de excreção de CL^- elevou-se de forma significativa no grupo CLP ($3,0 \pm 0,36\%$) quando comparado ao grupo sham ($0,9 \pm 0,23\%$), ($P < 0,01$). O tratamento com [6]-gingerol reduziu esse aumento conforme observado no grupo CLP+6G ($1,1 \pm 0,28\%$), ($P < 0,05$). O mesmo foi observado para o grupo CLP+10G ($2,0 \pm 0,2\%$), porém sem diferença estatística. Não foi observada também diferença estatística entre os grupos Sham-6G ($0,8 \pm 0,13\%$), Sham-10G ($0,8 \pm 0,14\%$) e Sham. A somação desses achados sugere que a septicemia causa alteração tubular renal, com alterações no manejo iônico (**Figura 30-C**).

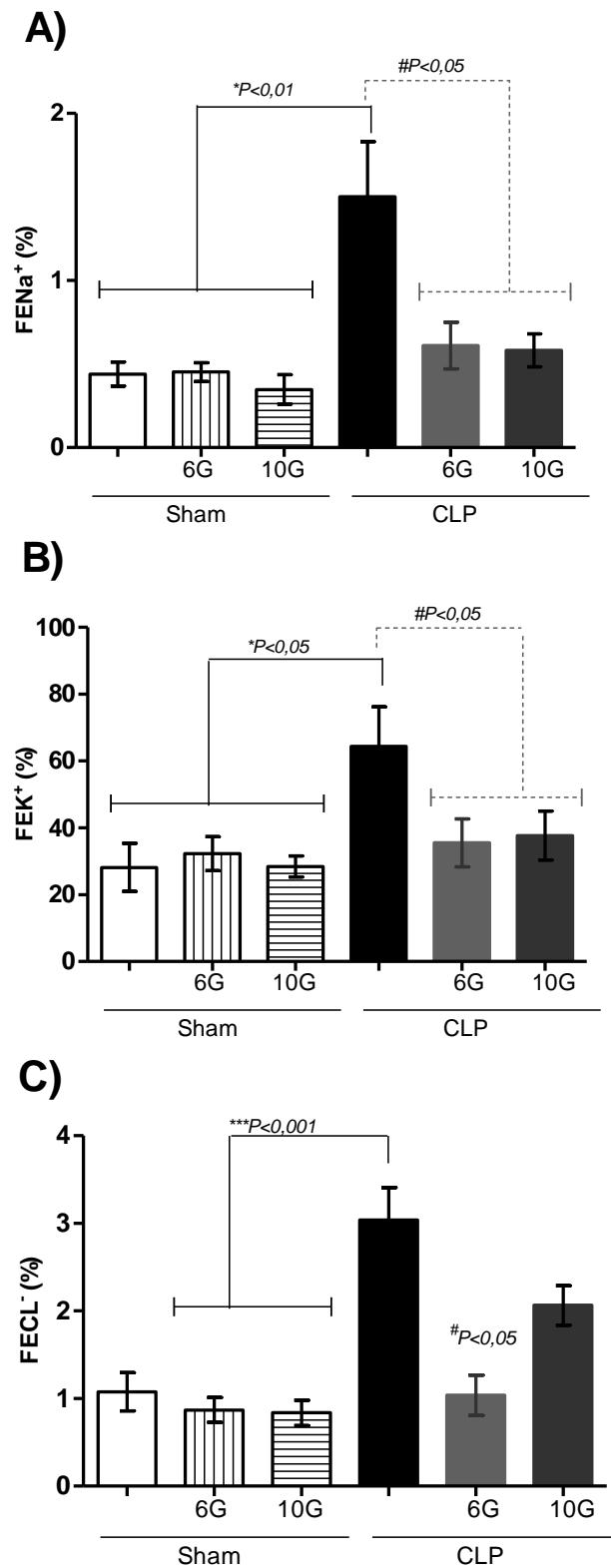
5.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS OSMOLARES

5.5.2 Determinação da clearance osmolar (C_{osm}) de animais induzidos a sepsis (CLP) e subsequentemente tratados com compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

Conforme a figura 31 não foi observada diferença estatística nos valores dos clearances osmolares dentre todos os grupos: Sham $0,017 \pm 0,001 \text{ mL/min}$; Sham-6G ($0,01 \pm 0,002 \text{ mL/min}$); Sham-10G ($0,01 \pm 0,001$); CLP ($0,01 \pm 0,003 \text{ mL/min}$); CLP+6G ($0,01 \pm 0,0019 \text{ mL/min}$); CLP+10G ($0,01 \pm 0,001 \text{ mL/min}$) (**Figura 31**).

O mesmo padrão de avaliação foi observado na figura 32 para o parâmetro do clearance de água livre, não se identificando diferença entre os grupos: sham ($0,002 \pm 0,002 \text{ mL/min}$); Sham (-6G- $0,004 \pm 0,003 \text{ mL/min}$); Sham-10G ($-0,002 \pm 0,001 \text{ mL/min}$); CLP ($-0,01 \pm 0,002 \text{ mL/min}$); CLP+6G ($-0,003 \pm 0,002 \text{ mL/min}$) e CLP+10G ($-0,001 \pm 0,001 \text{ mL/min}$) (**Figura 32**).

Figura 30- [6]-gingerol e [10]-gingerol melhora o funcionamento tubular em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.



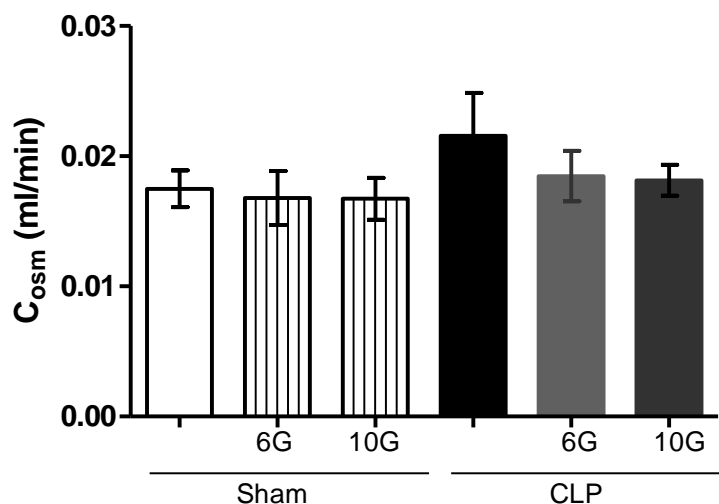
Os valores representam a média±erro padrão da FENA⁺ (Figura), FEK⁺ (FiguraB) e FECL⁻ em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n = 7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi

feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$ vs CLP, *** $P < 0,001$ vs CLP, # $P < 0,05$ vs CLP.

5.5.1 Determinação da osmolalidade plasmática e urinária de animais induzidos a sepse (CLP) e subsequentemente tratados compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

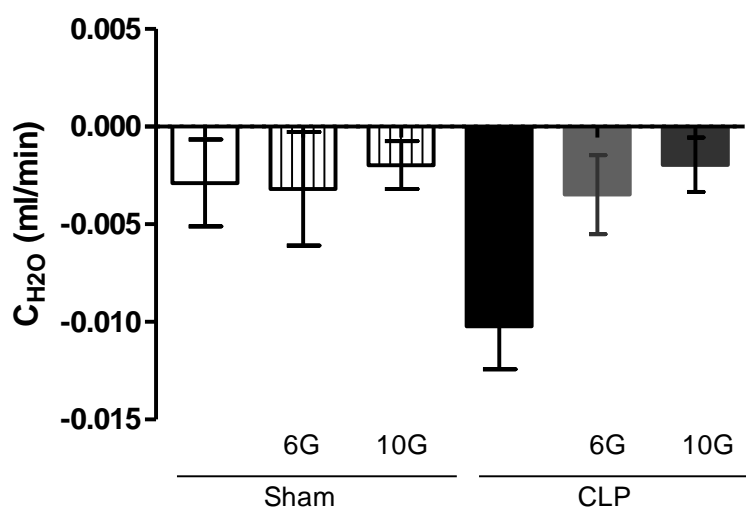
De acordo com a **figura 33-A**, os animais do grupo CLP induzidos a septicemia reduziram de forma significativa a osmolalidade plasmática ($218,5 \pm 4,732$ mOsm/kg) quando comparado ao grupo Sham ($262,9 \pm 3,1$ mOsm/kg) ($P < 0,05$). Os tratamentos com [6]-gingerol ($247,3 \pm 9,2$ mOsm/kg) e como o [10]-gingerol ($245,5 \pm 7,7$ mOsm/kg) na dose de 25 mg/Kg não foram efetivos em melhorar os parâmetros osmolares plasmáticos. Por outro lado, os valores de osmolalidade urinária aumentaram no grupo CLP ($496,1 \pm 52,9$ mOsm/Kg) quando comparado ao grupo Sham-10G ($288,4 \pm 16,06$ mOsm/kg). Ambos os tratamentos com [6]-gingerol ($320,9 \pm 45,64$ mOsm/kg) e [10]-gingerol ($287,9 \pm 25,3$ mOsm/Kg) reduziram a osmolalidade urinária, no entanto não se diferenciando de forma estatística do grupo CLP ($P < 0,05$), (**Figura 35-B**).

Figura 31- Clearance Osmolar em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP com subsequentes tratamentos com [6]- e [10]-gingerol.



Os valores representam a média \pm erro padrão do clearance osmolar de animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. ($n=7-8$). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

Figura 32- Polinfecção, [6]-gingerol e [10]-gingerol não modificaram o *Clarence* de água livre em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP..



Os valores representam a média±erro padrão do clearance de água livre em animais induzidos pelo método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n=7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni's.

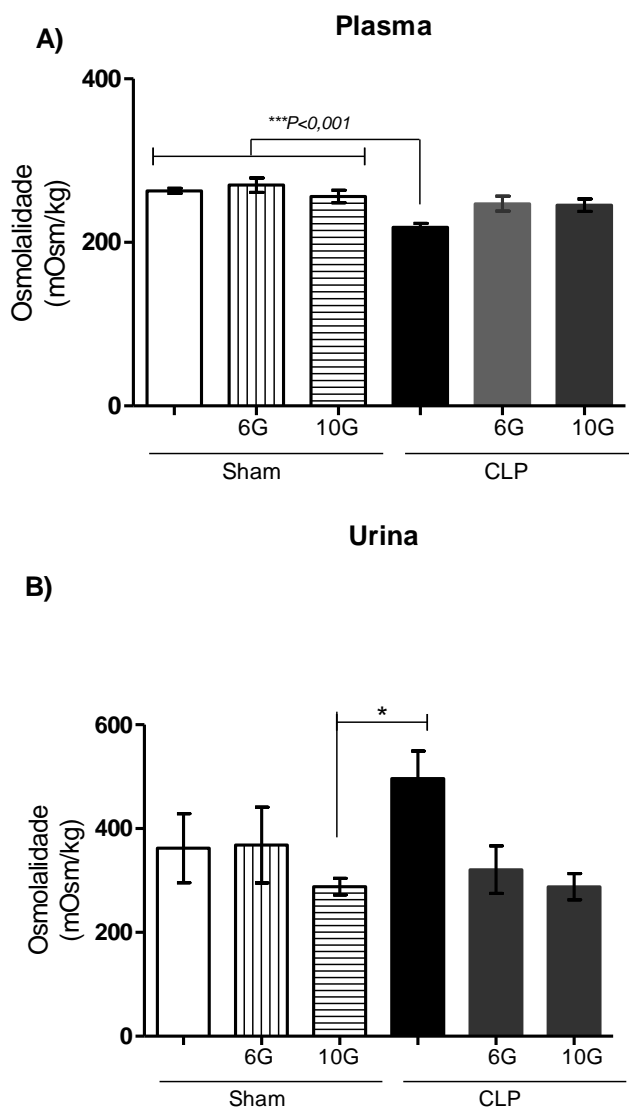
5.6 PERFIL DO DANO OXIDATIVO

5.6.1 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA)

5.6.1.1 Determinação dos valores MDA urinário em animais induzidos a septicemia pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.

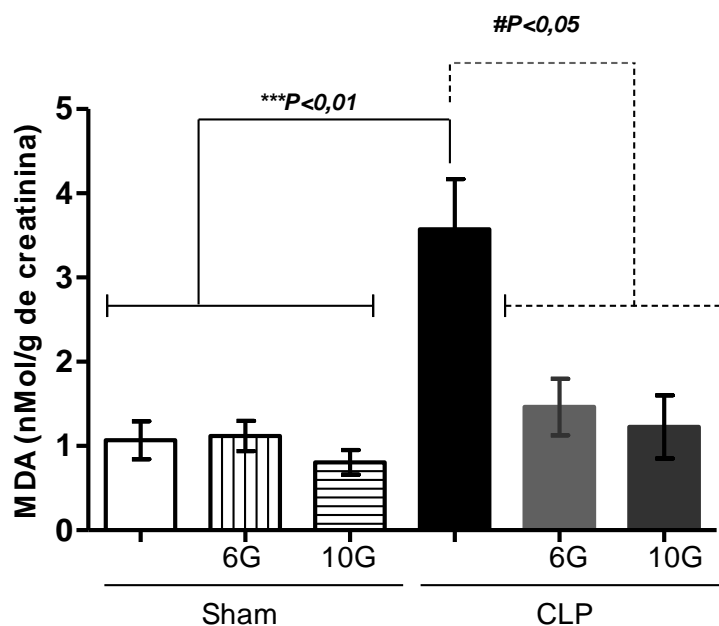
O dano oxidativo é um dos principais eventos responsáveis pela diminuição de funcionalidade renal. O malondialdeído (MDA) é um dos principais marcadores utilizados para caracterizar a participação do estresse oxidativo. Conforme exposto na figura 34 os níveis de MDA aumentaram de forma significativa nos animais do grupo CLP ($3,5\pm 0,5$ nMol/g de creatinina) quando comparado ao grupo Sham ($1,0\pm 0,2$ nMol/g de creatinina), Sham-6G ($1,1\pm 0,1$ nMol/g de creatinina) e Sham-10G ($0,80\pm 0,14$ nMol/g de creatinina), ($P<0,05$). Não se encontrou diferença estatística entre os grupos controles. O tratamento com [6]-gingerol reduziu os valores de MDA urinários significativamente em relação ao grupo CLP, grupo CLP+6G ($1,4\pm 0,3$ nMol/g de creatinina), ($P<0,05$). O grupo CLP+10G também foi efetivo em diminuir os valores de MDA, grupo CLP+10G ($1,2\pm 0,37$ nMol/g de creatinina) (**Figura 34**).

Figura 33- Efeito do [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre os valores osmolares plasmáticos e urinários em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos valores osmolares plasmáticos (A) e urinários (B) em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n=7-8). Grupo: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. *** $P < 0,001$ vs CLP, * $P < 0,05$ vs CLP.

Figura 34- [6]-gingerol e [10]-gingerol atenuam os níveis de MDA urinários em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.



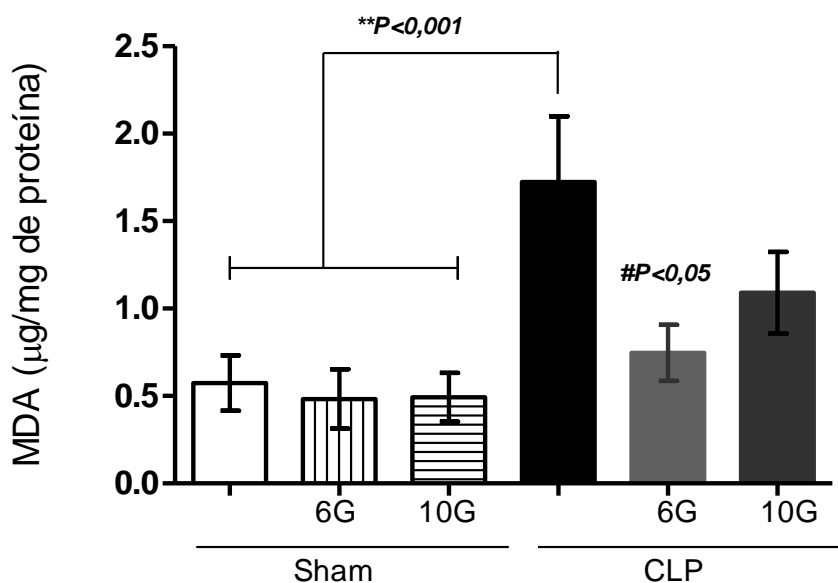
Os valores representam a média±erro padrão dos níveis de MDA urinários durante 24 h de animais induzidos ao método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n =7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. *** $P < 0,01$ vs CLP, # $P < 0,05$ vs CLP.

5.6.1.2 Determinação dos níveis MDA renais em animais induzidos a septicemia pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol

Conforme demonstrado na figura 35, o grupo CLP ($1,725 \pm 0,3 \mu\text{g/g prot.}$) induziu um aumento significativo nos valores de MDA no tecido renal, isto quando comparado ao grupo Sham ($0,5739 \pm 0,1 \mu\text{g/mg prot.}$), Sham-6G ($0,4829 \pm 0,1 \mu\text{g/mg prot.}$), Sham-10G ($0,4920 \pm 0,1 \mu\text{g/g prot.}$).

Ambos os compostos [6]-gingerol reduziu consideravelmente os níveis de MDA no tecido renal, CLP+6G ($0,7462 \pm 0,1 \mu\text{g/mg prot.}$). Por outro lado, o composto [10]-gingerol diminuiu os níveis de MDA, porém não de forma significativa, CLP+10G ($1,091 \pm 0,2 \mu\text{g/mg prot.}$), em relação ao grupo CLP, (**Figura 35**).

Figura 35- [6]-gingerol suprime a peroxidação lipídica no tecido renal de animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.



Os valores representam a média±erro padrão dos níveis de MDA no tecido renal de animais induzidos ao método CLP e subsequentemente, tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n =7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $***P < 0,001$ vs CLP, $\#P < 0,05$ vs CLP.

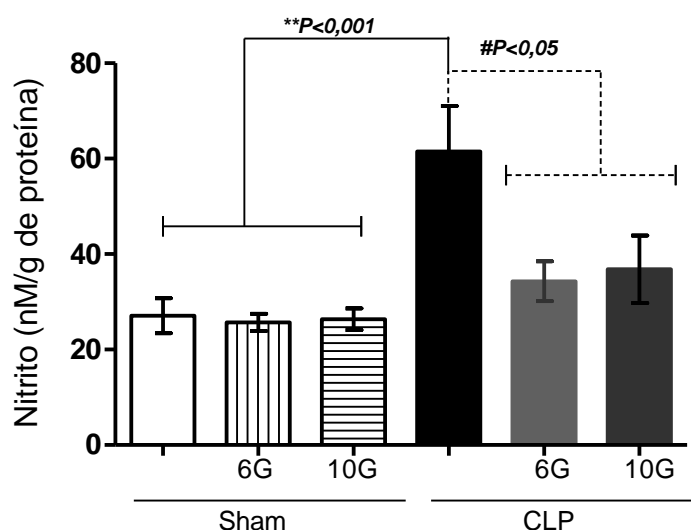
5.7 PARTICIPAÇÃO DO OXIDO NITRICO

5.7.1 Determinação dos valores de nitrito em rim de animais induzidos a septicemia pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol

Como exposto na figura 36 os animais induzidos a sepsse tiveram valores elevados de nitrito observado nos grupo CLP ($61,50 \pm 9,5$ nM/g de prot.), quando comparado aos grupos Sham ($27,09 \pm 3,6$ nM/g de proteína), Sham-6G ($25,70 \pm 1,8$ nM/g de prot.) e Sham-10G ($25,13 \pm 2,2$ nM/g de prot.), ($P < 0,05$).

O grupo CLP+6G reduziu de forma significativa os valores de nitrito no tecido renal ($36,65 \pm 4,1$ nM/g de prot.). Isto também foi notado para o grupo CLP+10G ($38,98 \pm 7,9$ nM/g de prot.), ($P < 0,05$). Não se observou diferença estatística entre os grupos controles Shams (**Figura 36**).

Figura 36- [6]-gingerol e [10]-gingerol bloqueiam os níveis de nitrito renal em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.



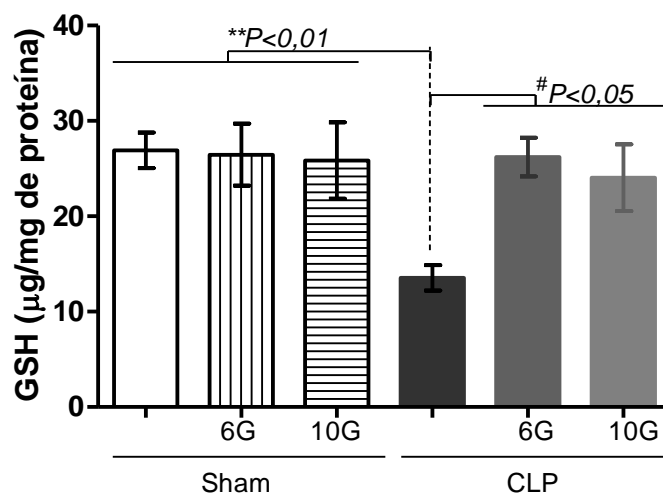
Valores representam a média \pm erro padrão dos níveis de nitrito no tecido renal de animais induzidos pelo método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n = 7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $**P < 0,001$ vs CLP, $\#P < 0,05$ vs CLP.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.8.1 Determinação da atividade da glutatona reduzida em rim de animais induzidos a septicemia pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol

De acordo com a figura 37, os animais do grupo CLP manifestaram redução significativa na atividade da glutatona reduzida ($13,55 \pm 1,3$ μ /g de prot.) quando comparado aos grupos Sham ($26,92 \pm 1,8$ μ /g de prot.), Sham-6G ($26,46 \pm 3,2$ μ /g de tecido) e Sham-10G ($25,86 \pm 3,9$ μ /g de prot.), ($P < 0,05$). Os compostos polifenólicos [6]-gingerol (CLP+6G: $26,22 \pm 2$ μ /g de prot.) e [10]-gingerol (CLP+10G: $24,06 \pm 3,5$ μ /g de prot.) foram eficientes em manter a atividade da GSH frente ao grupo CLP ($P < 0,05$).

Figura 37- [6]-gingerol e [10]-gingerol preservaram a atividade da GSH renal em animais induzidos ao dano renal pelo método CLP.

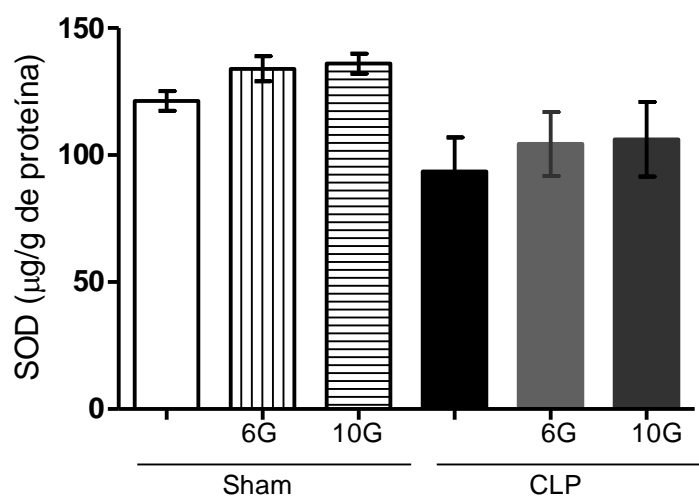


Valores representam a média \pm erro padrão da atividade da GSH no tecido renal de animais induzidos pelo método CLP e subsequentemente, tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n = 7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. $**P < 0,01$ vs CLP, $\#P < 0,05$ vs CLP.

5.8.2 Indicação da atividade da superóxido dismutase (SOD) em rim de animais induzidos a septicemia pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol

Foi verificada a participação da atividade da enzima superóxido dismutase no dano renal e, conforme a **figura 38**, não foi observada diferença entre a atividade dessa enzima no grupo Sham ($121,3 \pm 3,8$ µg/g de prot.) quando comparado ao grupo CLP ($93,61 \pm 13,3$ µg/g de prot). No entanto, evidenciou-se uma redução considerável nos animais CLP quando comparados aos grupos Sham-6G ($134,0 \pm 4,896$ µg/g de prot.) e sham-10G ($136,0 \pm 3,8$ µg/g de prot.). Os compostos fenólicos [6]-gingerol e [10]-gingerol não otimizaram a função dessa enzima (CLP+6G: $104,4 \pm 12,5$ µg/g de prot.; CLP+10G $106,2 \pm 14,6$ µg/g de prot.), ($P > 0,05$).

Figura 38- Polinfecção, [6]-gingerol e [10]-gingerol não modificam a atividade da SOD renal em animais induzidos a falha renal.



Valores representam a média±erro padrão da atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido renal de animais induzidos pelo método CLP e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. (n = 7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

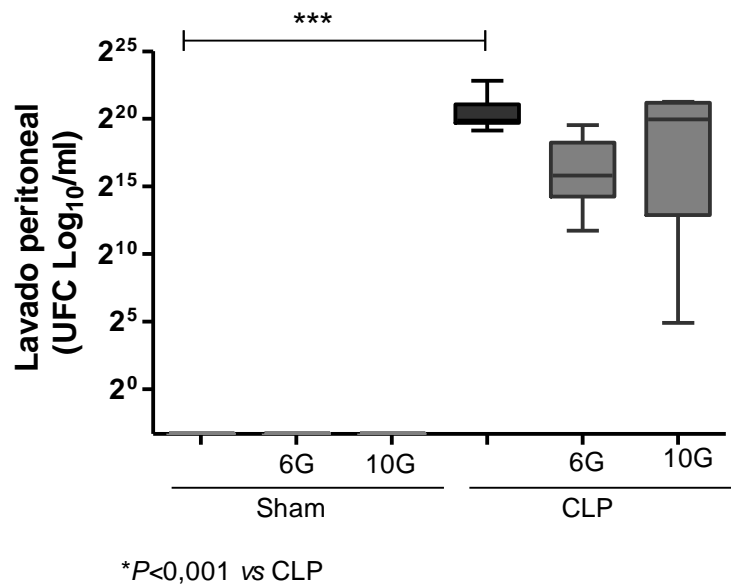
5.9 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO

5.9.1 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em animais induzidos a septicemia (CLP) e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.

No intuito de verificar a presença do processo infeccioso, realizou-se a quantificação da presença de bactérias nos grupos experimentais. Como expresso na figura 39, os animais dos grupos Sham, Sham-6G e sham-10G não manifestaram presença de bactérias no lavado peritoneal. Já o grupo CLP apresentou valores medianos elevados de UFC no lavado peritoneal quando comparado aos grupos controles citados anteriormente. Estes valores não se diferenciaram do grupo CLP+6G, e nem do grupo CLP+10G (**Figura 39**).

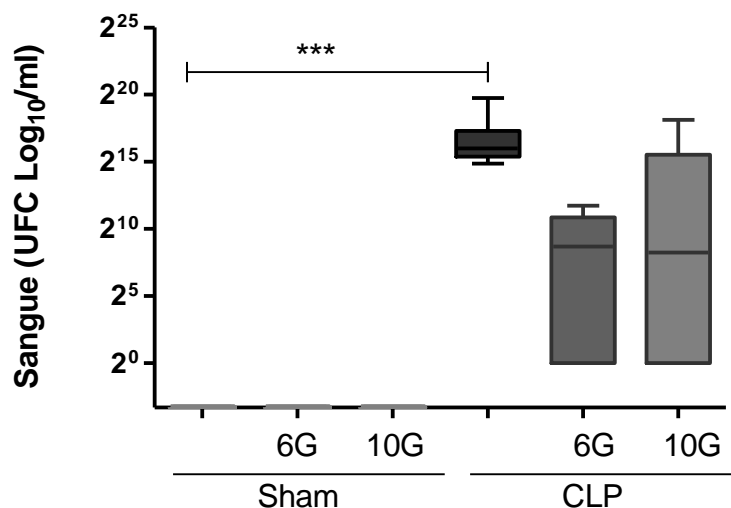
De acordo com a figura 40, os grupos Sham, Sham-6G e Sham-10G, assim como no lavado peritoneal, não apresentaram qualquer presença de UFC. O grupo CLP (6500 UFC/ml) apresentou novamente valores medianos elevados da presença de UFC quando comparada aos grupos controles, ($P < 0,05$) no sangue. O grupo CLP+6G e CLP+10G continuaram a manifestar valores altos de UFC no sangue dos animais sépticos tratados (**Figura 40**).

Figura 39- Unidades formadoras de colônia no lavado peritoneal durante o dano induzido pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Valores representam a média ± erro padrão da quantificação de UFC no lavado peritoneal e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol (n=7-8), Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. ***P<0,05 vs CLP.

Figura 40- Unidades formadoras de colônia no lavado durante o dano induzido pelo método CLP e tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.



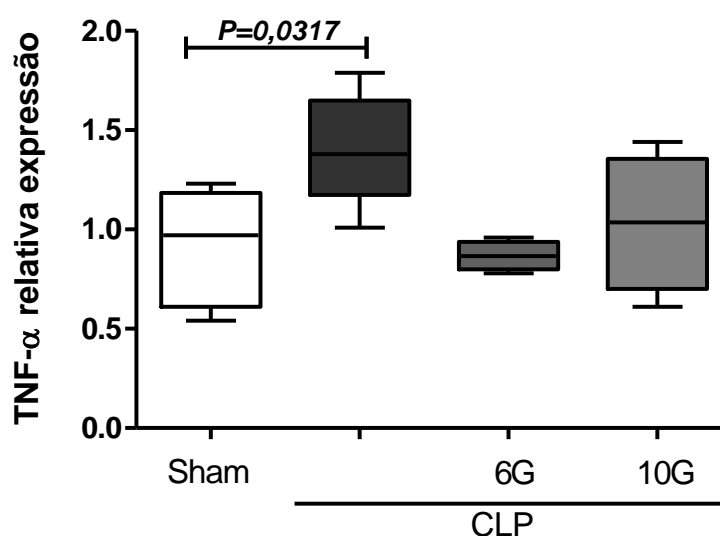
Valores representam a média ± erro padrão da quantificação de UFC no sangue e subsequentemente tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol i.p. 24hs (n =7-8). Grupos: Sham, Sham-6G, Sham-10G, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. *P<0,01 vs CLP.

5.10 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E MEDIAÇÃO PRECOSE DO DANO RENAL.

5.10.1 Avaliação da transcrição gênica de TNF- α no tecido renal de ratos induzidos com CLP e tratados com 6-gingerol e 10-gingerol.

De acordo com a figura 41 os animais do grupo CLP (1,38 transcrição relativa) obteve aumento significativo na transcrição gênica de TNF- α em relação ao grupo sham (0,970 transcrição relativa). Desta forma, indicando a promoção do aumento da resposta pró-inflamatória no tecido renal pela infecção polimicrobiana. Não foram observadas alterações estatísticas entre o grupo sham frente aos grupos CLP+6G (0,8650 transcrição relativa) e CLP+10G (1,035 transcrição relativa) e, assim, demonstrando o bloqueio do efeito inflamatório dos compostos fenólicos [6]- e [10]-gingerol indicado pela transcrição de TNF- α ($P < 0,05$) (**Figura 41**).

Figura 41 – [6]-gingerol e [10]-gingerol bloqueiam a transcrição gênica de TNF- α no tecido renal de ratos falha renal por CLP.

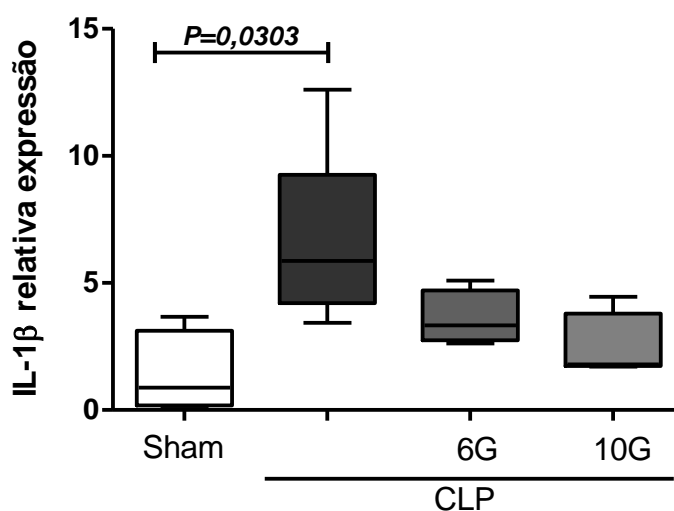


Os valores da figura representam a mediana da transcrição gênica de TNF- α no tecido renal. Grupos: Sham, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por teste de Mann Whitney. $P=0,0317$ vs CLP.

5.10.2 Avaliação da transcrição genica IL-1 β no tecido renal de ratos induzidos com CLP, tratados com 6-gingerol e 10-gingerol.

Por meio da figura 42, foi observado que os animais induzidos a septicemia indicado no grupo CLP (4,930 transcrição relativa) apresentou um acréscimo relevante significativo na transcrição gênica de IL-1 β diante do grupo sham (1,460 transcrição relativa). Reforçando o comprometimento renal desencadeado pelo processo CLP. Não foi observada, assim como reportado no resultado anterior diferença estatística entre o grupo Sham diante dos grupos CLP+6G (3,330) e CLP+10G (1,790 transcrição relativa) demonstrando atenuação a partir dos tratamentos com ambos gingeróis ($P < 0,05$) (Figura42).

Figura 42- [6]-gingerol e [10]-gingerol atenua a transcrição gênica de IL-1 β no tecido renal de ratos falha renal por CLP.



Os valores da figura representam a mediana da transcrição gênica de IL-1 β no tecido renal. Grupos: Sham, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. $P < 0,05$ vs sham.

5.10.3 Avaliação da transcrição gênica de INF- γ e TGF- β 1 no tecido renal de ratos induzidos por CLP e tratados com 6-gingerol e 10-gingerol.

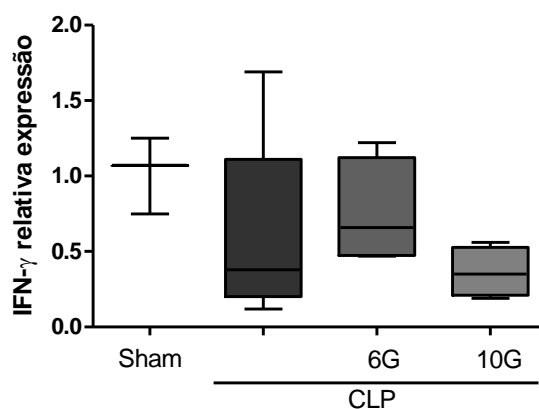
No intuito de explorar a participação de outros mediadores inflamatórios na patogênese da sepse induzida, verificamos a expressão relativa de INF- γ no tecido renal. Conforme a figura 43-A não ocorreu alteração significativa na relativa expressão desta citocina. No entanto, conforme representado na figura 43 B, observou-se um aumento relevante dos níveis de RNAm de TGF- β 1 no grupo induzido a sepse polimicrobiana,

CLP (59,45 relativa transcrição) quando este foi comparado ao grupo controle sham (1,200 relativa transcrição), ($P < 0,05$) (**Figura 43-B**).

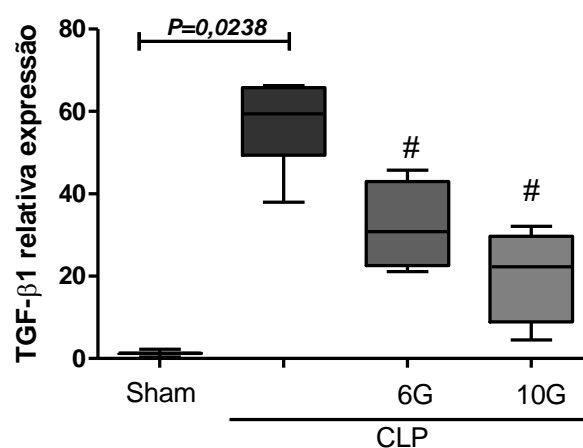
No entanto, ao inserir o tratamento nos grupos infectados por sepse polimicrobiana, evidenciou-se uma redução relevante na expressão gênica dessa citocina nos grupos CLP+6G (30,83 relativa transcrição) como também no grupo CLP+10-G (22,32 relativa transcrição) quando comparados ao grupo CLP. Em adição, não existiu diferença estatística entre ambos os grupos e o grupo controle sham, ($P > 0,05$) (**Figura 43-B**).

Figura 43 – Papel dos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre a transcrição gênica de $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TGF-}\beta 1$ no tecido renal de ratos com falha renal por CLP.

A)



B)

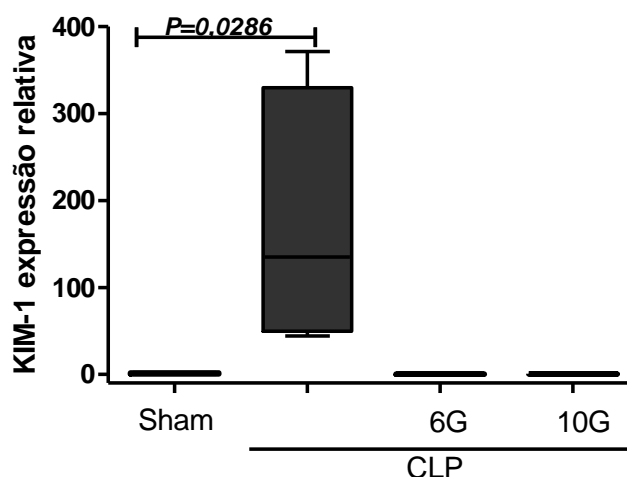


Os valores da figura representam a mediana da transcrição gênica de $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TGF-}\beta 1$ no tecido renal. Grupos: Sham, CLP, CLP+6G e CLP+10G. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. $P = 0,0238$ vs CT, $\#P < 0,05$ vs CLP.

5.10.4 Análise da transcrição gênica de molécula de injúria renal-1 (KIM-1) no tecido renal de ratos induzidos com CLP, tratados com 6-gingerol e 10-gingerol.

Conforme a figura 44 os animais sépticos relacionados ao grupo CLP (65,58 transcrição relativa) tiveram um aumento expressivo de KIM-1 comparado ao controle (1,120 transcrição relativa). Cofirmando um perfil forte de injúria às células renais após indução da infecção polimicrobiana. Não foram observadas alterações estatísticas entre o grupo sham em relação aos grupos CLP+6G (0,3500 transcrição relativa) e CLP+10G (0,5050 transcrição relativa) e assim, demonstrando o bloqueio da injúria pelos compostos fenólicos [6]- e [10]-gingerol na disrupção renal séptica ($P < 0,05$) (Figura44).

Figura 44 – [6]-gingerol e [10]-gingerol bloqueia a transcrição gênica de KIM-1 no tecido renal de ratos induzidos a falha renal por CLP.



Os valores da figura representam a mediana da transcrição gênica de KIM-1 no tecido renal. Sham, CLP, CLP+ 6G e CLP+ 10. A análise estatística foi feita por teste studente Mann Whitney. $P < 0,05$ vs Sham.

5.11 Perfil metabolômico urinário por RMN de ^1H .

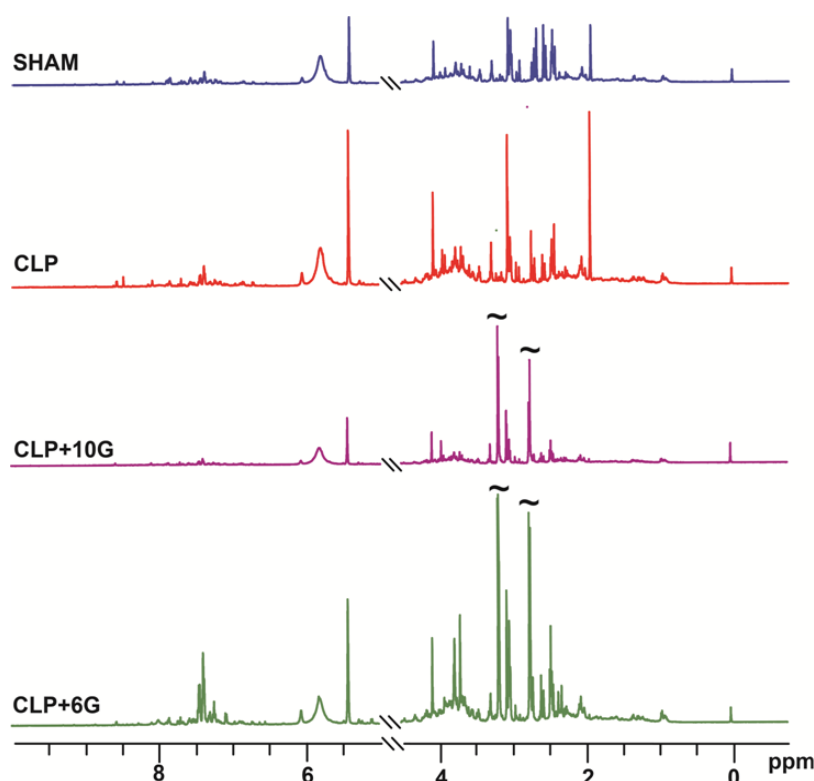
A análise dos espectros de hidrogênio da urina revelou a existência de diferenças nos perfis metabólicos entre as amostras investigadas, quando os perfis espectrais de grupos CLP tratados com gingeróis foram comparados com os do grupo CLP e grupo de controle (sham) (Figura 45). Com o objetivo de melhor visualizar as diferenças entre os grupos experimentais, foi realizada análise multivariada (PCA) dos espectros de

RMN de ^1H , o que permitiu observar o agrupamento das amostras conforme demonstrado nos gráficos de scores e *loadings* de PCA (Figura 46-A e -B).

As duas primeiras componentes principais explicaram 69,09% da variância total com PC1 representando 54,77% da variabilidade total e PC2 descrevendo um adicional de 14,32%. De acordo com os escores traçados com estes dois componentes, observou-se uma discriminação bem definida de três grupos. O primeiro foi constituído por amostras do grupo sham que ocupam o lado negativo de PC1 e lado positivo de PC2, enquanto que o segundo grupo, constituído por amostras de grupo induzido por CLP, foi observado na região negativa de PC1 e PC2. Finalmente, os grupos de amostras tratadas com 6-gingerol e 10-gingerol foram encontrados na região positiva de PC1 e dispersos ao longo de PC2 (46-C).

A avaliação do gráfico de *loadings* PC1 e PC2 permitiu a determinação de compostos com maior impacto na variância dos dados. As identidades de metabólitos responsáveis pela formação dos grupos foram listadas na Figura 46, juntamente com os respectivos *buckets*.

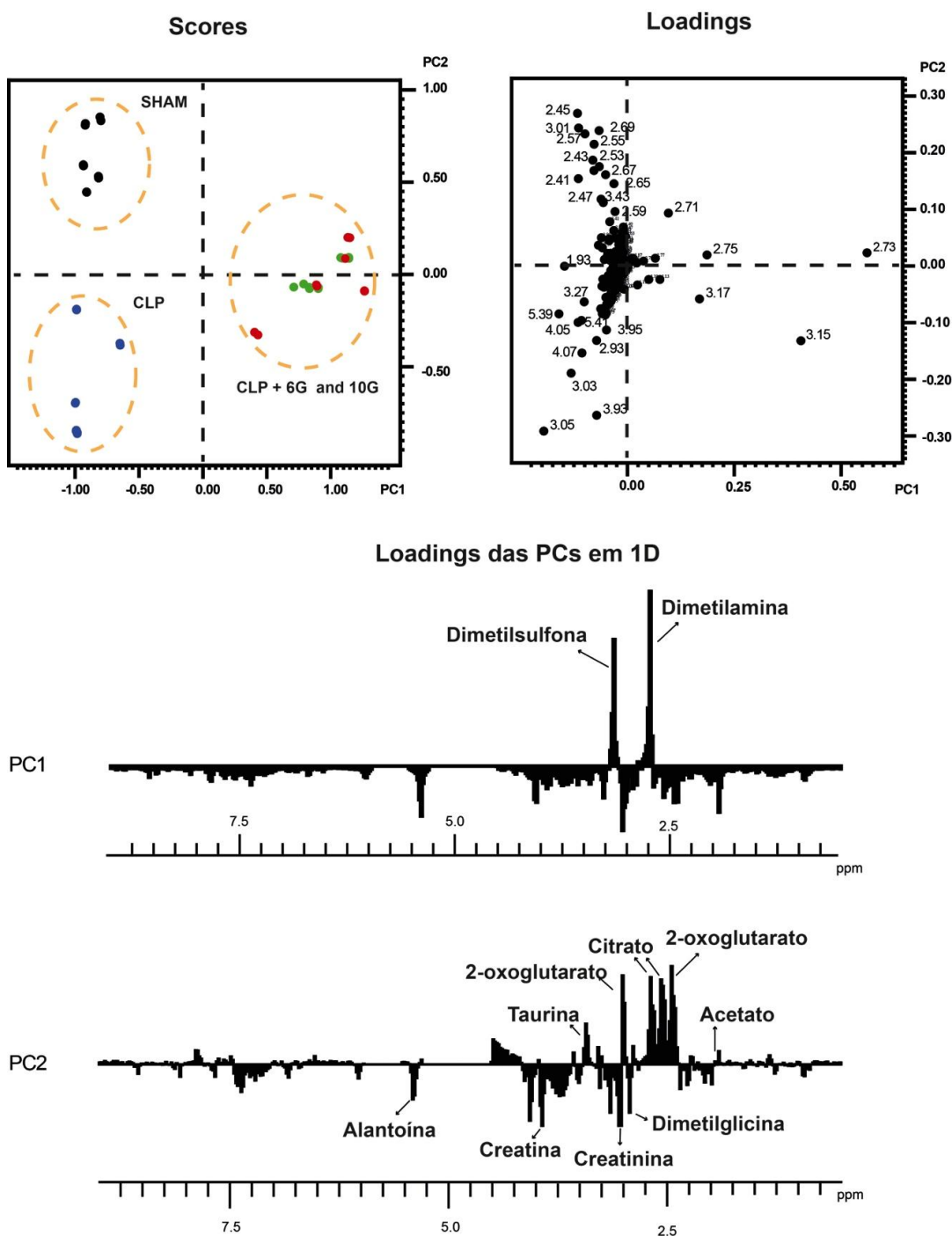
Figura 45- Perfis espectrais de RMN de ^1H de urinas dos animais sépticos e tratados com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Espectros de RMN de ^1H obtidos das amostras de urina de animais pertencentes ao grupo de controle (sham), grupo induzido por CLP (CLP) e grupos tratados com gingerol (CLP + 6G e CLP + 10G).

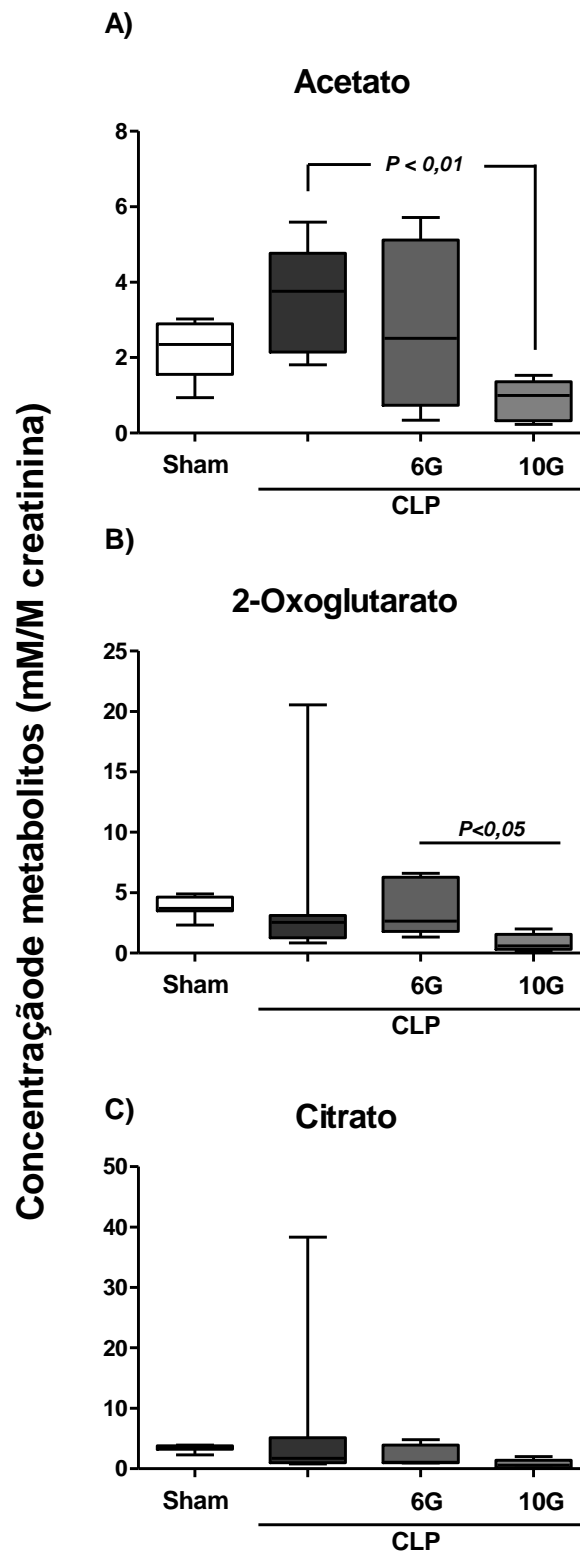
De acordo com os gráficos de *loadings*, os compostos 2-oxogluturato, acetato, citrato e taurina foram responsáveis pelo agrupamento de amostras do grupo sham. Creatina, dimetilglicina (DMG) e alantoína influenciaram a discriminação de amostras de CLP. Os *buckets* associados aos sinais de dimetilamina (DMA) e dimetil sulfona (DMS) foram responsáveis pela discriminação de amostras dos grupos formados por CLP+6G e CLP+10G. Devido à relevância desses compostos no processo investigado, além da avaliação por PCA, os metabólitos foram quantificados por RMN (**Figura 47, 48, 49**). O processamento estatístico indicou um aumento nos valores de creatina, alantoína, dimetilglicina nos animais sépticos quando comparados ao controle sham ($P < 0,05$). O composto 10-gingerol reduziu os valores de taurina, alantoína, creatina, dimetilglicina e acetato em relação apenas ao grupo injúria renal por CLP ($P < 0,05$). Por outro lado, o tratamento com o [6]-gingerol aumentou a presença DMA e DMS na urina de animais CLP em relação ao grupo Sham e ao grupo modelo sepse ($P < 0,05$).

Figura 46- Análise multivariada da discriminação e agrupamentos dos metabólitos por PCA de amostras de animais sépticos com LRA tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Gráficos de escores (A) e *loadings* (B) de PC1 versus PC2 utilizando os espectros de RMN de ^1H da urina de animais pertencentes ao grupo de controle (em preto), grupo induzido por CLP (em azul) e grupos tratados com gingerol (CLP+6G e CLP+10G) (em verde e vermelho).

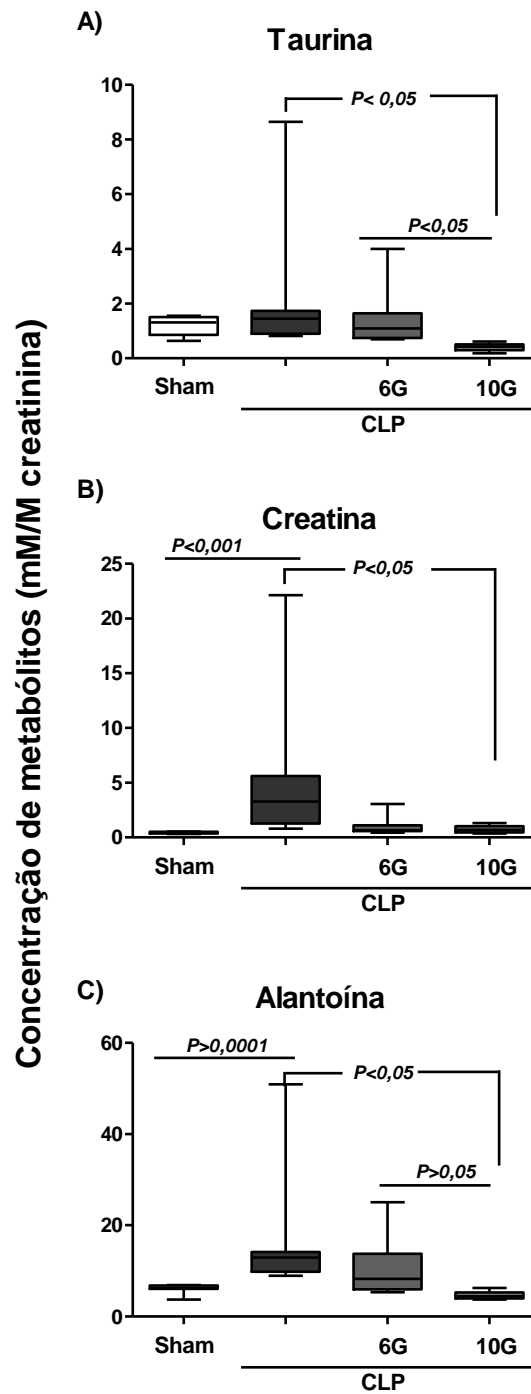
Figura 47- Determinação dos principais metabólitos envolvidos na via do ácido cítrico (TCA) marcados na urina de animais CLP, e nos tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Metabolitos do TCA identificados dentre os grupos avaliados (expressos como mM/M creatinina) responsáveis pela discriminação das amostras avaliadas por RMN (gráfico *Box plot*). Diferença

estatística representada no gráfico após aplicação do teste Kruskal Wallis. $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

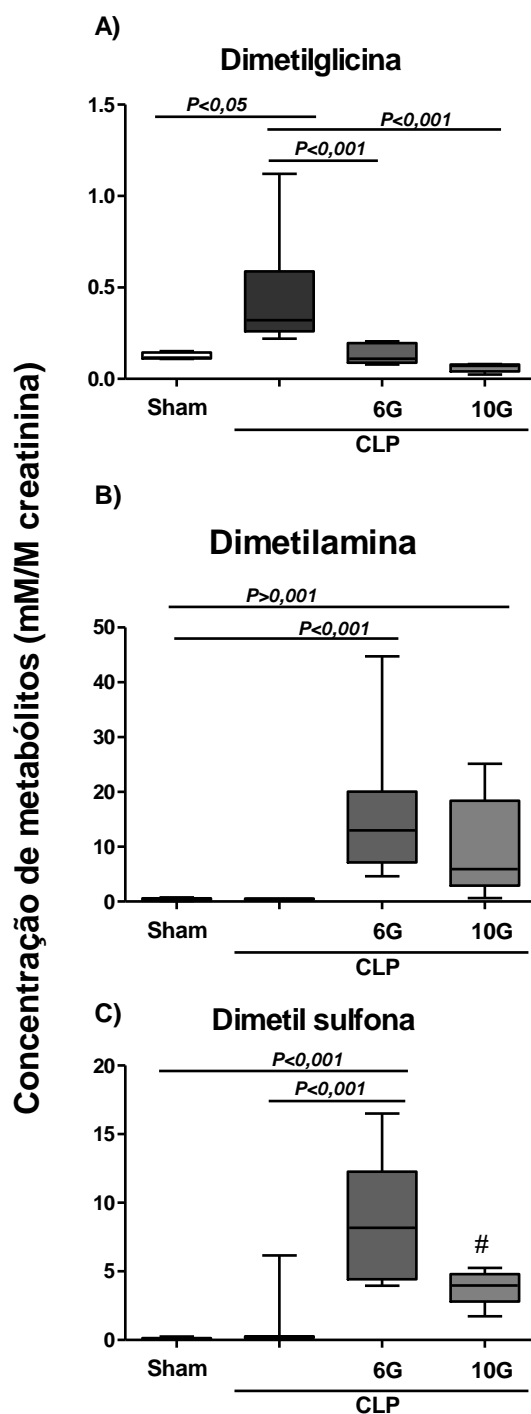
Figura 48- Análise dos metabólitos envolvidos na via da glutamina e metabolismo muscular identificados na urina de animais CLP, e nos tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Metabólitos nitrogenados envolvidos no metabolismo proteico e aminoácido nos grupos avaliados (expressos como mM/M creatinina) responsáveis pela discriminação das amostras avaliadas por RMN

(gráfico *Box plot*). Diferença estatística representada no gráfico após aplicação do teste Kruskal Wallis. $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

Figura 49- Identificação dos metabólitos envolvidos na via da metilamina e metabolismo da colina na urina de animais CLP, e nos tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Metabólitos envolvidos no metabolismo da colina e da metilamina nos grupos avaliados (expressos como mM/M creatinina). Responsáveis pela discriminação das amostras avaliadas por RMN (gráfico *Box plot*).

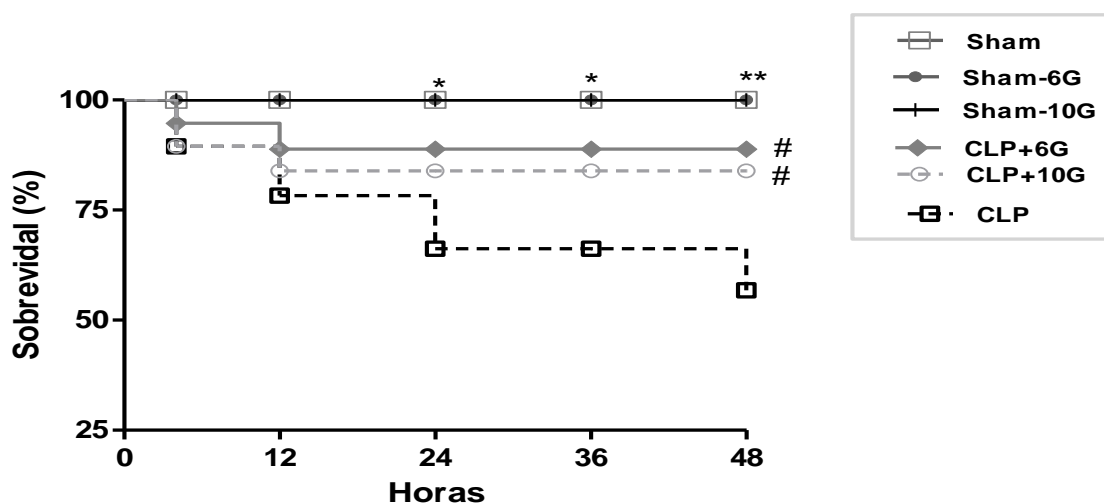
Diferença estatística representada no gráfico após aplicação do teste Kruskal Wallis. $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

5.11. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE SOBREVIDA.

5.11.1 Avaliação da sobrevida dos animais induzidos ao dano renal (CLP) tratados com [6]-gingerol e [10]-gingerol.

A **figura 50** reporta os valores de sobrevida dos grupos experimentais, o resultado demonstra que os grupos Sham, Sham-6G e Sham-10G mantiveram 100% de sobrevida durante o protocolo experimental. Porém, os animais do grupo CLP tiveram redução significativa na sobrevida com os valores de 66,24 % e 56,78 % nas 24 e 48 h, respectivamente, após o processo cirúrgico ($P < 0,01$). O tratamento com [6]-gingerol elevou de forma significativa a sobrevida dos animais (88,82%) quando comparado ao grupo CLP ($P < 0,05$), conforme observado grupo CLP+6G. Os animais do grupo CLP+10G tiveram valores de sobrevida de 83,8 % nas 48hs do período experimental, também se diferenciando de forma considerável do grupo CLP ($P < 0,05$).

Figura 50- [6]-gingerol e [10]-gingerol aumentam a sobrevida de animais com falha renal após submissão ao modelo CLP.



Os valores estão expressos em percentagem de sobrevida nos tempos indicados até 48 h após a indução por CLP. Foi utilizado Anova seguido do pós-teste Bonferroni's. ** $P < 0,01$ vs CLP, * $P < 0,01$ vs CLP e # $P < 0,05$ vs CLP.

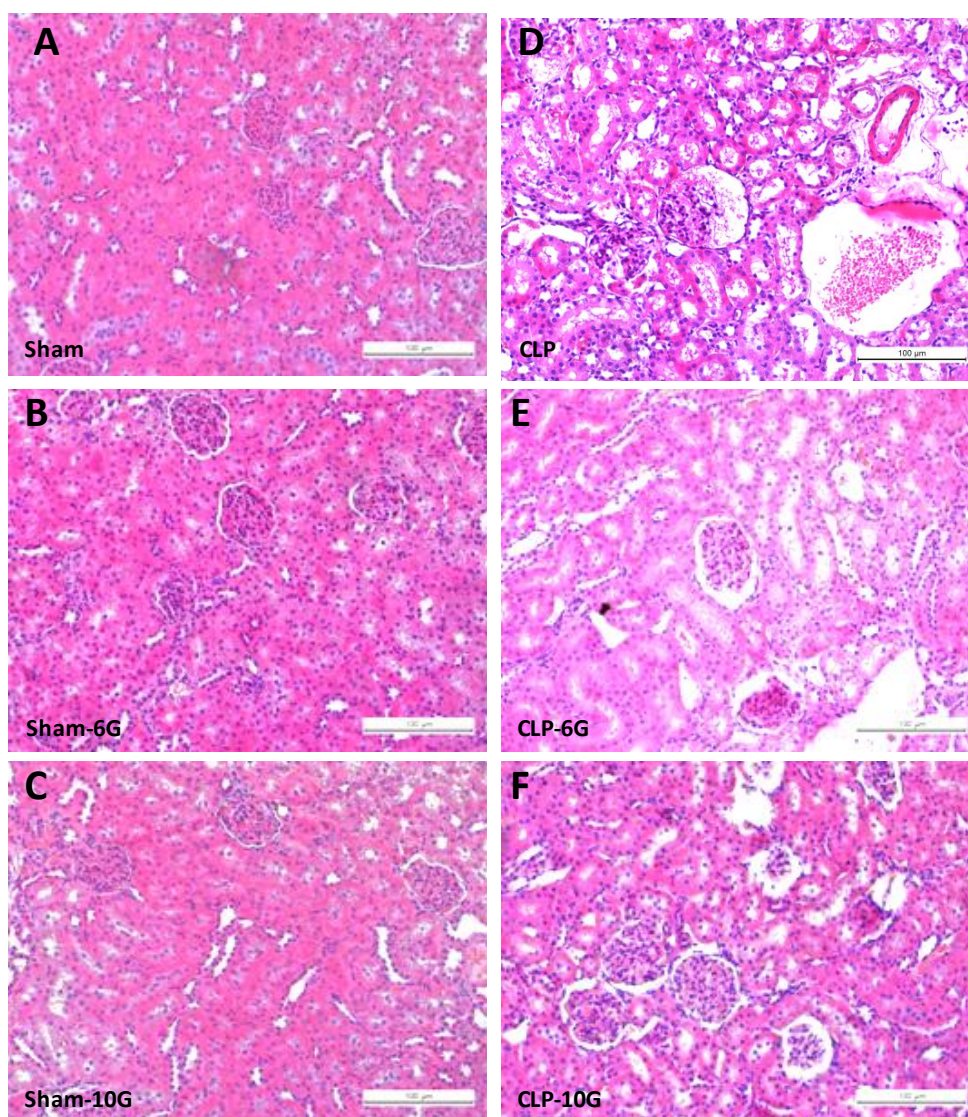
5.12 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

5.12.1 Efeito dos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol sobre os achados histopatológicos no dano renal desencadeado pelo modelo polimicrobiano de sepse.

A análise histopatológica foi realizada com os tecidos renais obtidos a partir dos grupos induzidos ao dano renal por CLP e tratados subsequente com os compostos [6]- e [10]-gingerol na dose de 25 mg/Kg. Conforme expresso nas figuras 51 (51-A, -B e -C, respectivamente) referente aos animais dos grupos controles (Sham, sham-6G e sham-10G, respectivamente), não observou-se quaisquer alterações na arquitetura dos órgãos examinados. Não houve qualquer indício de citotoxicidade, degeneração tubular e nem participação de células e infiltrado inflamatório.

Foi observada uma evolução das alterações morfológicas durante a instalação do dano renal após 48h da indução da sepse, alterações estas consideradas como leves. No grupo CLP, não se identificou alterações arquiteturais. No entanto, durante a análise qualitativa foi observado em alguns animais deste grupo, indícios de injúria ao epitélio tubular, embora caracterizada como leve. Além disso, foi notada uma moderada ocorrência de retração glomerular, infiltrado celular e vacuolização. O somatório desses achados estando relacionado com quadro de NTA. Os tratamentos com os compostos fenólicos [6]-gingerol e [10]-gingerol obteve papel relevante em reduzir o número de manifestações observadas no grupo CLP, em torno de metade dos animais analisados, desta forma, indicando um efeito protetor sobre os órgãos avaliados, **figura 51**.

Figura 51- Imagens representativas do efeito dos compostos [6]- e [10]-gingerol sobre as alterações histológicas no dano renal induzido pelo método CLP de sepse.



Fotomiografia dos tecidos renais processados pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) dos grupos experimentais. As figuras expressam a morfologia dos tecidos representativos dos seguintes grupos: A (Sham) (falsa cirurgia+Tween80-2%; v.o.), B [Sham-6G] (falsa cirurgia+[6]-gingerol 25mg/Kg), C [Sham-10G] (falsa cirurgia+[10]-gingerol 25mg/Kg.), D [CLP] (cirurgia CLP +Tween80-2%), E [CLP +6G] (cirurgia CLP + [6]-gingerol 25mg/Kg) e F [CLP +10G] (cirurgia CLP + [10]-gingerol 25mg/Kg).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos dos compostos [6]- e [10]-gingerol, isolados do extrato do *Zingiber Officinale* sobre os parâmetros renais alterados por meio do modelo polimicrobiano (CLP) de sepse. O processo cirúrgico induziu uma sepse subletal nos animais, caracterizada por infecção sistêmica, redução da taxa de sobrevivência, além de modificações na função e na expressão dos biomarcadores renais. Achados similares são observados em acordo a outros estudos (YASUDA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012, PORTELLA et al., 2013).

A partir da caracterização do modelo, foi notável o papel protetor dos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol frente às alterações desencadeadas pelo processo infeccioso sobre a função renal, tais como a recuperação do fluxo renal, manutenção do RFG, redução dos compostos nitrogenados plasmáticos (ureia e creatinina) e dos níveis de proteínas urinárias, redução da lipoperóxidação e do estresse oxidativo, além da melhora da resposta imune-inflamatória.

Vários estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do *Z. Officinale* frente às diversas disordens e problemas relacionados à saúde, tanto em abordagens pré-clínicas como em estudos clínicos (NADERI et al., 2015; MISAWA et al., 2015; KASHEFI, et al., 2015). No contexto das injúrias renais, metodologias *in vivo* vêm demonstrado que o extrato desta planta possui ações benéficas sobre deterioração da função renal causada por processo isquêmico, dano renal provocada por substância citotóxica (tetracloreto de carbono), por nefropatia diabética e mioglobínúria (UZ et al., 2009; HAMED, et al., 2012; TZENG et al., 2013; EL-KOTT et al., 2015).

Clinicamente, a lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome caracterizada por uma diminuição rápida (horas ou dias) da função renal, com acumulação de produtos nitrogenados e resíduos resultantes do metabolismo celular, diminuição da produção de urina (nem sempre presente), aumento nas concentrações de potássio, fosfato e desequilíbrio ácido/básico (BELLOMO, et al., 2012). Os modelos de LRAs em animais são de extrema importância como objeto de estudo, visto que os mesmos buscam investigar e caracterizar os aspectos relacionados à identificação, evolução e mecanismos associados ao dano (SINGH et al., 2012, RAMESH e RANGANATHAN 2014). Tais modelos têm sido desenvolvidos para mimetizar as condições clínicas e as características da progressão, proporcionando condições para desenvolvimento de terapias mais eficazes e, assim, contribuir para melhor conduta da problemática (SINGH

et al., 2012, RAMESH e RANGANATHAN 2014). O modelo utilizado no presente estudo foi eficaz em relação ao seu propósito. Durante sua padronização induziu um quadro de infecção considerável, caracterizada pelo aumento das unidades formadoras de colônias, associada com alterações significativas nos valores plasmáticos e urinários dos biomarcadores renais (creatinina, ureia e PU:CRU). Efeitos similares e em concordância com outros estudos de LRA por CLP (SOUZA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012).

No tocante da LRA, ressalta-se que o modelo CLP é considerado extremamente valioso para o entendimento da fisiopatologia da injúria renal desenvolvida durante a progressão da sepse (DOI et al 2009, SINGH et al., 2012). Este modelo mimetiza as características clínicas encontradas durante o evento séptico humano propiciando as fases hemodinâmicas e metabólicas notadas no desenvolvimento desta fisiopatologia (BURAS et al., 2005; SINGH et al., 2012). Outros estudos citam que o modelo CLP é considerado padrão ouro para a investigação da sepse, por apresentar algumas vantagens em relação aos outros modelos (ex. LPS). Atualmente é muito utilizado por sua facilidade e reprodutibilidade (BURAS et al., 2005).

No presente estudo foi observada uma redução no peso corpóreo dos animais após a indução cirúrgica. Trabalhos prévios mencionam que em modelo experimental, os animais que sobrevivem ao procedimento cirúrgico CLP têm uma redução significativa no peso corporal durante os primeiros 5 dias (OSUCHOWSKI et al., 2007). Esta diminuição é resultado do estresse metabólico imposto ao animal, através do procedimento cirúrgico inicial, seguida pela subsequente infecção (ISKANDER et al., 2013). Por outro lado, é observado que nos animais sobreviventes, na fase crônica da sepse, a recuperação gradual do peso corporal ocorre ao longo do tempo (OSUCHOWSKI et al., 2007).

O presente estudo evidenciou que os animais do grupo CLP, obtiveram redução de peso corporal. Sugere-se que este fenômeno pode ser associado à presença de diarreia observada nos animais do referido grupo. A manifestação de diarreia durante o desenvolvimento do processo infeccioso é utilizado como escores clínicos para a classificação do dano (ALVES-FILHO et al., 2010). O quadro diarreico é uma das manifestações prevalentes durante a evolução da septicemia, estando associada com perda de peso, hipotermia e modificações no perfil hematócrito (WANG et al., 2004; BARRERA et al., 2011). A perda de líquidos por meio do extravazamento fecal pode ter contribuído para redução do peso dos animais. Ao proporcionar uma melhora global

sobre o dano, um dos eventos positivos do composto [6]-gingerol foi uma efetiva melhora no peso corpóreo dos animais. O mesmo não foi notado para o [10]-gingerol. Em adição, outros trabalhos também têm demonstrado que o composto [6]-gingerol e o extrato do *Z. Oficinalle* possuem efeitos moduladores sobre os parâmetros funcionais em modelos de disfunções metabólicas (UEKI et al., 2008; TEZENG et al., 2013; ELSHATER et al., 2009).

O evento séptico tem efeitos profundos sobre o endotélio renal, resultando em isquemia e desregulação microvascular e, desta forma, contribuindo para progressão das lesões, caracterizadas por diminuição do fluxo sanguíneo microvascular e formação de edema (SHARFUDDIN e MOLITORIS 2012). A presença de edema está relacionada com o aumento de volume e peso global do rim, levando à fase de extensão das injúrias renais (POLAT et al., 2006; SHARFUDDIN e MOLITORIS 2012). No presente estudo o peso renal não se alterou entre os grupos. Estudos recentes têm sugerido que as moléculas derivadas do extrato do *Z. Officinale* detêm poucos efeitos colaterais e tóxicos, com uso seguro e, neste cenário, seu uso vem sendo validado como um suplemento nefroprotetor (KAFESHANI, 2015; IMANI et al., 2015). Os dados deste trabalho indicam que os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol não desencadearam qualquer alteração morfofuncional nos animais saudáveis, isto observado em todas as variáveis analisadas. Assim, indicando-as como seguras para a referida dose testada na abordagem pré-clínica.

Dentre as ferramentas atuais usadas para avaliar a função renal, as dosagens bioquímicas são as mais comumente utilizadas (SIROTA et al., 2011; PAKULA et al., 2015). A dosagem de creatinina plasmática, por si só, é utilizada no âmbito hospitalar como um marcador valioso para análise das alterações renais. Um aumento transitório da creatinina plasmática, geralmente associada a uma prova de transporte tubular, são testes bioquímicos úteis e amplamente utilizados na prática clínica (SIROTA et al., 2011; NEJAT et al., 2015). No presente estudo, os valores de creatinina plasmática foram aumentados de forma significativos nos animais sépticos. Este achado está de acordo com outros estudos, nos quais o processo CLP desencadeou aumento relevante nos valores séricos de creatinina (HOLTHOFF et al., 2012, HU et al., 2014). A elevação dos valores séricos de creatinina está associada com o aumento de ureia sérica, que é outro biomarcador nitrogenado, extensamente utilizado na clínica para avaliar o perfil de função renal (COLDEWEY et al., 2013).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram uma retenção considerável, tanto de ureia quanto de creatinina plasmática, indicando assim comprometimento renal e ineficácia renal em manter a homeostase adequada das escórias e de metabólitos. Os achados para creatinina e ureia estão de acordo com outros estudos prévios, indicando uremia (elevação sistêmica de creatinina e ureia) e subsequente falha renal dos animais (HOCHERL et al., 2010; HSIAO et al., 2012; COLDEWEY et al., 2013). Com a administração do [6]-gingerol e [10]-gingerol, observou-se uma melhora sobre a retenção nos níveis plasmáticos de creatinina e ureia. O [6]-gingerol quando administrado em animais com lesão renal por cisplatina, reduziu o aumento destes metabólitos ocasionado por nefrotoxicidade tubular (KHUAD et al., 2006). Estudo de Rodrigues e colaboradores (2014) demonstraram também por meio da utilização de uma fração enriquecida com os compostos [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol, melhora do manejo renal de creatinina e ureia com redução dos valores plasmáticos destes metabólitos em modelo LRA. Ressalta-se que o extrato do *Z. Oficinalle* com os compostos fenólicos aqui testados também melhorou a retenção dos compostos nitrogenados quando a função renal foi desafiada em nefrotoxicidade por tetracloreto de carbono (HAMED et al., 2012) e diante à necrose tubular aguda (NTA) por evento isquêmico (UZ et al., 2009). Esse achado é reforçado por El-kott et al., (2010).

A Taxa ou Ritmo de Filtração Glomerular (TFG, RFG) é a soma de todas as taxas individuais de filtração de cada néfron funcionante. Assim, uma estimativa da TFG fornece um indicativo global do funcionamento renal (DELANAYE et al., 2012). Qualquer diminuição na TFG implica em doença renal progressiva, ou um processo reversível causando diminuição da função dos nefros (por exemplo: desidratação grave), sendo o CL_{CR} um dos métodos mais comuns utilizados para estimar a TFG (NANKIVELL et al., 2001, BOYACIOGLU et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

Em ambiente clínico, a mensuração do CL_{CR} é extremamente útil para pacientes com uma creatinina basal baixa. Nesse sentido, estudo indica que CL_{CR} aferido em quatro horas foi melhor do que a creatinina plasmática para monitorar a função renal em pacientes em situação crítica (PICKERING et al., 2012). Os dados do presente estudo evidenciaram que os animais CLP reduziram consideravelmente o CL_{CR} . Já é conhecido que a situação crítica de septicemia reduz o RFG (SEIJA et al., 2012). Foi evidenciado que o tratamento com os compostos fenólicos [6]-gingerol e [10]-gingerol foram

eficientes em manter a TFG nos animais infectados. Isto corrobora com o observado anteriormente para o [6]-gingerol diante à nefrotoxicidade (KHUAD et al., 2006). Rodrigues et al., (2014) também demonstrou esse papel protetor quando testou extrato enriquecido de gengerois. Além disso, outros estudos utilizando o extrato desta planta demonstraram efeito protetor sobre as alterações renais desencadeadas pelo modelo de isquemia e reperfusão renal (UZ et al., 2009).

Adicionalmente, cita-se que o extrato do gengibre também foi capaz de manter os parâmetros de TFG em modelo de dano renal por nefropatia diabética (TEZENG et al., 2013). Os compostos fenólicos estudados aqui têm sido citados em vários estudos como sendo os principais compostos responsáveis pelos efeitos biológicos e farmacológicos do *Z. Offinale*, tendo como mais abundante o [6]-gingerol, que possui farmacocinética caracterizada em ratos (NAORA et al., 1992; ZICK et al., 2008). Estes compostos possuem, entre outros, propriedades anti-inflamatória e antioxidante (RODRIGUES et al., 2014; KAFESHANI, 2015). Estes efeitos têm sido demonstrados não somente sobre a função renal, mas em vários órgãos em modelos de lesão (KAFESHANI, 2015). Ao reduzir a participação das EROs e dos compostos nitroativos no tecido renal, os compostos gengerois preservam as disfunções glomerulares e tubulares e, desta forma, conservando a TFG (KHUAD et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014).

Durante o desenvolvimento da sepse, nota-se uma considerável proteinúria (LINTON et al., 1984). Esse aumento de proteínas na urina está relacionado com acréscimo de acidez, além da manifestação da participação efetiva de neutrófilos durante o dano (HUBER-LANG et al., 2001). A presença de proteínas na urina associada com o decréscimo da TFG é indicativa de comprometimento renal e um possível indicativo para evolução de doença renal crônica (DELANAYE et al., 2012; HERAS et al., 2013).

Esse fenômeno foi observado no presente estudo, no qual relevou uma significativa presença de proteínas de urina. Também foi evidenciado que os compostos fenólicos [6]- e [10]-gingerol reduziram de forma considerável essa proteína urinária. Avaliando o efeito do extrato do gengibre em modelo de nefrotoxicidade por nefropatia diabética em ratos, modelo clássico de proteinúria, encontra-se uma redução na presença de proteínas na urina (TEZENG et al., 2013). Estudo prévio a este observou

que a fração gingerol foi eficiente em reduzir os níveis de proteinúria em modelo de dano renal por aminoglicosídeo (RODRIGUES et al., 2014).

Anormalidades de fluidos e eletrólitos em pacientes críticos pode levar a consequências fatais. Desta forma, para fornecer uma gestão otimizada, a intervenção médica deve estar bem informada sobre a homeostase de fluidos (LEE et al., 2010).

O curso clínico da LRA tem sido subdividido em quatro fases distintas de identificação: fase inicial, fase de oligúria, fase de poliúria e fase de recuperação funcional. O dano renal por CLP causa efeitos deletérios sobre a produção de urina. Frequentemente é visto uma síndrome oligúrica e queda na filtração glomerular, geralmente ocorrendo em horas após a manifestação da infecção. Em pacientes com sepse, oligúria sustentada ou acidose metabólica severa, sobrecarga de volume refratário e desordem eletrolítica grave podem ser as razões suficientes para iniciar a terapia renal substitutiva (WHITE, et al., 2015). Vários estudos têm demonstrado redução da produção de urina em animais sépticos por CLP (SEIJA et al., 2012; HUBER-LANG et al., 2001, RODRIGUES et al., 2012).

A compreensão da diminuição do fluxo urinário e do volume total de urina durante a infecção pode ser entendida a partir de análises realizadas por BOFFA e ARENDSHORST (2005), os quais reportaram que na fase inicial da sepse a vasoconstrição renal leva a uma redução TFG e LRA em ratos anestesiados. Essa diminuição do fluxo sanguíneo renal resulta de um aumento na resistência vascular renal (RVR). Esta vasoconstrição renal é tida como precoce e acompanhada por uma baixa pressão arterial média (PAM), que persiste de 1 a 14 horas de observação após administração de LPS, envolvendo principalmente a vasculatura pré-glomerular e queda do fluxo renal e do volume de urina (BOFFA et al., 2004; BOFFA e ARENDSHORST, 2005).

No presente estudo foi observada uma diminuição significativa no fluxo urinário e no volume de urina durante as 48hs após a indução do processo infeccioso. Esse achado corrobora com estudos prévios (SEIJA et al., 2012; HUBER-LANG et al., 2001, RODRIGUES et al., 2012). Nos estudos referidos, o modelo CLP desencadeou redução da produção de urina e oligúria nos animais infectados. Estudo Silva Neto (2012), demonstrou em modelo *in vitro* de rim isolado que o [6]-gingerol aumentou o fluxo

urinário e natriurese, possivelmente por ativação de receptores celulares. Não dispomos até o momento de estudos que demonstram o papel do [10]-gingerol nesse parâmetro renal.

A reabsorção iônica de Na^+ pelos transportadores na membrana da borda em escova do túbulo proximal renal é considerada como uma função capital do rim, já que o transporte de outros íons e de solutos necessita diretamente ou indiretamente da reabsorção de Na^+ (EATOON, 2006; MCDONOUGH et al., 2009). Estes dependem da integridade estrutural da membrana e da disponibilidade de energia advinda dos ATPs fornecido pelas vias metabólicas (EATOON, 2006). É imperativo que alterações nestas vias, causadas por agressão tóxica, isquêmicas e hemodinâmicas durante a doença renal determinem modificações na taxa e na função dos transportes tubulares (KHUNDMIRI et al., 2004; BANDAY et al., 2008).

A determinação da fração de excreção de sódio (FENa^+) é um índice urinário bem conhecido e frequentemente utilizado para a análise das LRAs. Esta variável apresenta-se útil para distinguir entre a LRA funcional (pré-renal) e a estrutural (necrose tubular aguda - NTA). Classicamente, valores iguais ou menores que 1% indicam função tubular preservada (MACIEL et al., 2014).

O modelo septicemia ocasiona elevação nas FENa^+ e, desta forma, se relaciona com complicações sobre os mecanismos fisiológicos de absorção e excreção deste íon. Esse achado está em concordância com outros estudos, já que Seija e colaboradores (2012) demonstraram que o modelo de múltipla infecção CLP em ratos desencadeou aumentos significativos nos percentuais de excreção de Na^+ . O mesmo achado foi observado no trabalho de Rodrigues et al., (2012) e Hsiao et al., (2012).

Não existem estudos na literatura especificando como os compostos gingeróis atuam melhorando a fisiologia da função tubular. No entanto, estudo realizado por Silva Neto (2012), demonstrou em sistema de rim isolado que o [6]-gingerol modificou os fatores determinantes da filtração glomerular e, secundário a este evento, observou um aumento do fluxo urinário e dos transportes para Na^+ , K^+ e Cl^- . Este achado sugere que este composto pode contribuir para manter uma melhor função tubular. Além disso, Rodrigues et al., (2014), reportaram que uma fração enriquecida de gingeróis melhorou o manejo renal para Na^+ . O tratamento oral com esta fração enriquecida contendo [6]-

gingerol e [10]-gingerol, reduziu consideravelmente a $FENa^+$ aumentada por aminoglicosídeo. Recentemente, foi demonstrado que a ação protetiva do [6]-gingerol seria associada a sua ação antioxidante e anti-apoptótica em túbulo renal (HEGAZY et al., 2016; RODRIGUES et al., 2014).

Adicionalmente, o presente estudo demonstrou que o modelo polimicrobiano CLP aumentou os valores para FEK^+ . Este índice está relacionado com a gravidade, a progressão e a duração da injúria renal, confirmando o resultado de diminuições da TFG, previamente ao aumento de creatinina sérica ou da ativação da aldosterona (em uma tentativa de manter a homeostase do potássio) (MACIEL et al., 2014). No entanto, segundo estudo de Rodrigues et al., (2014) a fração enriquecida de gengerois também obteve efeito positivo em relação ao manejo de K^+ , melhorando este parâmetro alterado durante NTA por tratamento por aminoglicosídeo. Nesse sentido, sugere-se que o efeito protetor dos gengerois sobre o epitélio dos túbulos renais mantém a presença adequada e funcionalidade dos mecanismos de transporte tubulares.

A sepse causa efeitos deletérios sobre a função de transporte iônico renal. Já é conhecido por meio de modelo animal que ocorre aumento da excreção de cloreto associada com diminuição da pressão arterial e do RFG, e que o processo infeccioso causa infraregulação na expressão dos transportadores de cloreto específicos do tecido renal CIC-K1 e CIC-K2 (SCHMIDT et al., 2007). No presente estudo foi observado uma elevação da excreção de cloreto, semelhante ao observado para a $FENa^+$. Esse achado corrobora com o estudo de Schmidt et al., (2007), que encontrou uma expressão reduzida do transporte de cloreto e dos canais responsáveis por essa função no túbulo renal.

No presente estudo o composto fenólico [6]-gingerol melhorou esse parâmetro da função renal dos animais CLP. Os compostos gengerois também melhoraram a função tubular de animais com necrose tubular aguda por aminoglicosídeo (RODRIGUES et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado que o composto [6]-gingerol reduziu a morte de células tubulares (SASHA et al., 2016), além disso, é tido que o efeito antiinflamatório dessas moléculas gera proteção da função renal (ARYAEIAN et al., 2015). Sugere-se que ao evitar as manifestações desses eventos, as moléculas fenólicas do gengibre contribuam para a não disrupção do sistema de transporte renal.

O modelo polimicrobiano de sepse induz alterações nos parâmetros osmolares. Estudo de Rodrigues et al., (2012), apresentou alta osmolalidade urinária nos animais com injúria renal por CLP. O mesmo efeito foi observado no estudo de SEIJA et al., (2012). No presente estudo não foram encontradas alterações nos valores de *clearance* osmolar de ambos os grupos, como também com o *clearance* de água livre nos animais CLP. O aumento da osmolalidade urinária de animais sépticos se dá pela maior excreção de ureia urinária e outros compostos não absorvidos (RODRIGUES et al., 2012, SEIJA et al., 2012).

Consideravelmente, os valores de ácido úrico encontram-se reduzidos em animais induzidos à falha renal através da indução cirúrgica pelo método CLP (HOLLY et al., 2006). Interessantemente, em um estudo recente utilizando o mesmo modelo do presente trabalho, o tratamento com ácido úrico melhorou consideravelmente o dano oxidativo causado pelo peróxido nítrico e, assim, sugeriu-se que o ácido úrico fosse um neutralizador desta espécie reativa. A inibição do ONOO^- pelo pré-tratamento com ácido úrico foi associada com melhor ação de neutrófilos, resultando em diminuição de presença de bactérias na circulação, e proteínas tais como ICAM-1, MCP-1, TNF- α e MPO (TORRES et al., 2007). No presente estudo, no grupo CLP ocorreu uma redução dos valores de ácido úrico, o que pode estar associado ao aumento dessa espécie reativa. Os grupos tratados com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol tiveram valores maiores de ácido úrico sérico, podendo ter apresentado uma possível ação protetora diante o dano oxidativo.

Um considerável número de estudos vem demonstrando que a excessiva produção de EROs, juntamente com a redução dos sistemas de defesas antioxidantes seria responsável por desempenhar papel importante na patogênese da sepse (HSING et al., 2011; LOWES et al., 2013; ERBAS et al., 2013).

Um dos mecanismos importantes durante o dano renal induzido pela sepse através da peritonite (CLP) é o aumento transitório do estresse oxidativo e da resposta pró-inflamatória (DOI et al., 2009; LINGARAJU et al., 2015). Os modelos animais sugerem que as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) contribuem para a lesão epitelial tubular durante a sepse (LINGARAJU et al., 2015). Em especial, o anion superóxido gerado em componentes celulares contribui

para o aumento do estresse oxidativo durante os quadros de septicemia (DOI et al., 2009; LINGARAJU et al., 2015).

Além disso, trabalho recente demonstrou comprometimento e uma disfunção mitocondrial nos complexo I, II, III. Este dano se relaciona diretamente com a redução da produção de ATP no tecido renal e, assim, favorecendo o estresse oxidativo e diminuição da sobrevivência (PATIL et al., 2014).

A peroxidação lipídica é uma manifestação comum na injúria renal por CLP. Segundo estudos de Jao et al., (2005), Erbas et al., (2013) e Yao et al., 2015 os níveis séricos de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica se elevou rapidamente durante as 18h pós indução e, além disso, se correlacionou com o acréscimo plasmático dos marcadores clínicos da função renal (ureia e creatinina), sinalizando assim para o dano oxidativo e disfunção celular.

No presente trabalho os valores de MDA, tanto na urina como no tecido renal aumentaram de forma significativa nos animais com falha renal quando comparado aos animais controles. Este achado está em concordância com outros estudos (LIU et al., 2014; TANER et al., 2014; SHARMA et al., 2014). Os tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol melhoraram a lipoperoxidação observada no grupo CLP e, desta forma, confirmando um efeito nefroprotetor. O [6]-gingerol foi também eficiente em reduzir a elevação de MDA renal causada pelo tratamento com cisplatina em animais (KUHAD et al., 2006). Os compostos gingeróis presentes em fração enriquecida, nos quais incluíam o [6]-gingerol e o [10]-gingerol, também apresentaram efeito antioxidante quando testados frente à nefrotoxicidade aguda desencadeada por aminoglicosídeos (RODRIGUES et al., 2014).

Nossos achados para os valores de MDA corroboram com estudos de UZ (2009), o qual demonstrou a eficácia do tratamento do extrato do gengibre, via dieta, diante das alterações oxidativas e elevado índices de MDA em modelo pré-clínico de LRA por isquemia e reperfusão. O *Zingiber Officinale* teve a habilidade de reverter a elevação dos valores de MDA no tecido renal induzido experimentalmente (YOUSIF et al., 2015). Além disso, o extrato desta planta teve a habilidade de melhorar a resposta antioxidante renal deprimida pelo tratamento com metrotexato, reduzindo neste modelo os níveis de MDA de forma significativa (KUTRY, 2015). Por si só o [6]-gingerol

apresentou efeito nefroprotetor via propriedade antioxidante e antiapoptótico em células renais que sofreram nefrotoxicidade (HEGAZY et al., 2016).

O óxido nítrico (ON) é tido como um regulador da resposta imune e da inflamação e, assim, considerado como um fator pró-inflamatório em uma variedade de situações patológicas. Neste contexto, a inflamação na condição clínica de pacientes com peritonite é acompanhada por deficiência de arginina, disfunção imune, e excesso de ON (SORIANO et al., 2011; HSIAO et al., 2012; LÉON et al., 2015). Ressalta-se que a combinação do ON com o ânio superóxido produz espontaneamente o peroxinitrito, que se aproxima de taxas compatíveis ao limite de difusão celular. A formação desta espécie reativa tem sido notada na sepse e no choque circulatório e, como resultante deste evento, encontra-se oxidação de membranas lipídicas bem como de hidroxilação de anéis aromáticos e nitração (SORIANO et al., 2011). Estudo de Seija et al., (2012) demonstrou em modelo animal a importância do peróxido nítrico nos mecanismos associados ao controle da função renal durante a indução da injúria renal por sepse através do método CLP. Este estudo apresentou que a manifestação de sepse estava associada com uma superegulação da enzima iNOS, fonte da produção de ON, além de redução da presença da SOD, uma enzima importante para defesa antioxidante.

Vários estudos com modelos animais vêm demonstrando que o estresse nitroativo, elevados valores de nitrito (ONx), têm importante participação no dano renal desencadeado pelo processo de septicemia (WU et al., 2007; WANG et al., 2009; SEELY et al., 2010). Geralmente, este acréscimo de ONx está relacionado com a diminuição do fluxo renal (WANG et al., 2009; SEELY et al., 2010). Em nosso estudo a indução cirúrgica induziu significativa elevação de nitrito no tecido renal, o que pode ter contribuído para o deterioramento das taxas de função renal. Este achado está de acordo com outros estudos (ZHAO et al., 2015; LEE et al., 2015). No entanto, a intervenção com os compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol melhorou este parâmetro. Corroborando com esse achado, estudos prévios ao nosso demonstrou que o [6]-gingerol tem efetividade em melhorar os distúrbios nos valores de nitrito desencadeados por tratamento com quimioterápico (KUHAD et al., 2006). Mais recentemente Rodrigues et al., (2014) demonstrou que os compostos fenólicos da fração enriquecida de gengibre, manifestou efeito nefroprotetor sobre a função renal acometida pelos efeitos deletéricos causados por gentamicina, que desencadeava estresse oxidativo celular dependente da presença de nitrito no tecido renal. Outros estudos, utilizando o extrato do Zingiber

oficinalle, também demonstraram um efeito protetor das moléculas contidas nesta planta frente à elevação de nitrito durante o dano renal tubular por isquemia (UZ et al., 2009). Além disso, o composto [6]-gingerol obteve efeito benéfico em reduzir a expressão de iNOS em modelo de infecção por LPS (CHOI et al., 2013). Em especial, o [6]-gingerol desempenhou efeito modulador benéfico sobre a elevação de citocinas pró-inflamatórias em modelo de infecção por LPS (TRIPATHI, et al., 2006). Não dispúnhamos na literatura, até o presente momento, do efeito específico do [10]-gingerol frente a este parâmetro.

O extrato do gengibre melhorou o perfil antioxidante da célula renal deteriorada pelo tratamento severo com álcool, preservando a atividade das principais enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo (SOD, GSH, xantina oxidase) (SHANMUGAM et al., 2010)

A glutatona reduzida, GSH (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células, sendo o tiol (-SH) não proteico mais abundante no meio intracelular. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a diante de lesões resultantes da exposição de vários agentes danosos (PERANDIN et al., 2015). Esta molécula é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula e tem, como ação, participar das reações redox celulares (LEITE 2003; SANTANGELO et al., 2004).

Níveis reduzidos de GSH podem estar diretamente relacionados com o aumento de EROS, peroxidação lipídica e presença de radicais hidroxilas (LEITE, 2003; LOWES et al., 2013). Durante o curso das lesões renais ocorrem depleções significativas na quantidade de GSH e, desta forma, percebe-se o papel relevante desta enzima ao fornecer proteção a função renal (LOWES et al., 2013).

Em nosso estudo, um dos mecanismos sugeridos para a presença de dano renal pelo processo polimicrobiano foi a redução da resposta antioxidante, evidenciada pela redução significativa da atividade da GSH. Nosso achado está em concordância com outros trabalhos (PASKALOGLU et al., 2004; SENER et al., 2005; ZHANG et al., 2014), que evidenciaram que o comprometimento renal por polinfecção estava relacionado com redução significativa dos valores de GSH no tecido renal de animais.

Em compensação, nosso resultado confirmou o efeito protetor da atividade antioxidante dos compostos fenólicos [6]-gingerol e [10]-gingerol, pois os mesmos favoreceram a manutenção dos níveis de GSH nos animais CLP. Alguns trabalhos evidenciaram esta relação, demonstrando que os compostos fenólicos do gengibre detem de efeito nefroprotetor por ação antioxidante (KAFESHANI et al., 2015; KUTRY et al., 2015). Especificamente, o [6]-gingerol demonstrou preservar a atividade da GSH em modelo de nefrotoxicidade por antineoplásico (KUHAD et al., 2006). Nosso grupo demonstrou previamente que um extrato enriquecido de gengibre foi hábil em reverter o dano oxidativo por indução de nefrotocidade por aminoglicosídeo (RODRIGUES et al., 2014). O extrato do *Z. Oficinalle*, contendo os compostos fenólicos aqui estudados, também obteve efeito benéfico em melhorar a atividade de GSH em modelo de dano renal por inqumia/reperfusão (UZ et al., 2009) e significativa proteção desse tiol em modelo de injúria renal por administração de tetracloreto de carbono (HAMED et al., 2012).

Em adição, extratos do *Z. Oficinalle* foram testados em trabalhos que visavam estudar a nefrotoxicidade de substâncias químicas tais como o chumbo e alumínio. Tais extratos apresentaram eficiência em manter a função antioxidante renal, reduzindo os níveis de lipoperoxidação e mantendo as atividades de GSH e SOD e Catalase (OSAMA et al., 2014). Este conjunto de relatos, somados aos nossos dados prévios e aos resultados do presente estudo confirmam a manifestação de proteção e efeito antioxidante dos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol.

A aferição do crescimento de bactérias no lavado peritoneal e no sangue é amplamente utilizado em estudos de infecção polimicrobiana por CLP (LEE et al., 2007). Este procedimento é realizado no intuito de confirmar se os efeitos deletérios observados na função renal é dependente e relacionada com o padrão de infecção (WU et al., 2007; DOI et al., 2008). No presente estudo evidenciamos uma elevada presença de bactérias no lavado peritoneal e no sangue dos animais CLP. Este achado está de acordo com outros estudos experimentais que obtiveram elevados níveis de infecção (Unidades formadoras de colônia) associado à disfunção renal (LEE et al., 2007; DOI et al., 2008; YUN et al., 2009).

Alguns estudos vêm demonstrando efeito antimicrobiano do *Z. Oficinalle* frente algumas bactérias (GUPTA e RAVISHANKAR, 2004; ISLAM, et al., 2014).

Estudo *in vivo*, demonstrou que o extrato do gengibre exibiu efeito modulador de proteção diante o dano desencadeado por LPS, inibindo a resposta mediada por citocinas e pelo fator de crescimento NF- κ B (CHOI et al., 2013). Outro estudo apresentou que o [6]-gingerol foi hábil em reduzir o dano causado por LPS em líquido peritoneal, melhorando todo o aspecto da resposta inflamatória estimulado por esse agente (TRIPATHI, et al., 2007).

Mesmo não observando efeito redutor de UFC pelo [10]-gingerol, estudo previo ao nosso, verificou que [10]-gingerol isolado a partir do rizoma do gengibre possui potente atividade antibacteriana *in vitro* contra bactérias anaeróbica associada a periodontite (PARK et al., 2008). Além disso, o [10]-gingerol mostrou-se eficaz, com efeito sinérgico com aminoglicosídeo frente a bactérias multiresistente à vancomicina (NAGOSHI et al., 2006).

Durante a evolução do quadro clínico da sepse ocorre a ativação da resposta inflamatória, que é caracterizada pelo envolvimento de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e HMGB1, além de outros mediadores inflamatórios (SCHULTE et al., 2013; LUO et al., 2014; LI et al., 2016). A supra-expressão destes mediadores pode conduzir a uma gama de efeitos deletérios a diversos órgãos. Dentre estas citocinas, o TNF- α se expressa de forma precoce e tem papel relevante para o agravamento da patogênese da sepse, severamente contribuindo para o choque endotóxico gerado por diferentes tipos células, especialmente macrófagos, células endoteliais e neutrófilos em resposta à infecção ou inflamação (LI et al., 2016; YILDIRIM et al., 2016).

No presente trabalho, observou-se um aumento da transcrição gênica de TNF- α e IL-1 β nos animais induzidos à septicemia experimental. Este achado, foi confirmado previamente em outros estudos, tanto em modelo animal de choque séptico como estudos estudos com pacientes sépticos (SCHULTE et al., 2013; LEELAHAVANICHKUL et al., 2015; LIU et al., 2016). Após a liberação de TNF- α e IL-1 para a circulação sistêmica, os seus picos começam a ser identificados a partir de 60-90 min (SCHULTE et al., 2013). eNo presente trabalho observou-se uma maior expressão relativa dessas citocinas nas 48 h pós indução do dano. Uma vez liberado, TNF- α e IL-1 β atuam promovendo a ativação e diferenciação dos macrófagos e prolongando suas sobrevividas. Todos estes efeitos aumentam as respostas pró-

inflamatórias durante a sepse, ativando outras citocinas (IL-6 e IL-8) (ALVES-FILHO et al., 2010; SCHULTE et al., 2013). Em células endoteliais, o TNF- α aumenta a expressão de moléculas de adesão, tais como molécula de adesão intercelular (ICAM) - 1 e a molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1 e quimiocinas (ALVES-FILHO et al., 2010; SCHULTE et al., 2013).

O aumento da expressão relativa de TNF- α e IL-1 β no tecido renal foi diminuída pelos compostos [6]-gingerol e [10]-gingerol. Previamente, estudo de Rodrigues et al., (2014) demonstrou que os compostos gingeróis melhoram a função renal, ao reduzir a expressão aumentada de citocinas, tais como o TNF- α e IL- β , além de IL-2 e INF- γ em modelo de necrose tubular aguda por antibiótico. São escassos os estudos demonstrando os efeitos diretos dos compostos fenólicos aqui estudados em modelos de insuficiência renal aguda. No entanto, é conhecido que o extrato do gengibre reduz a expressão renal de TNF- α e IL- β 1 em modelo de lesão renal por ingestão crônica de frutose (YANG ET AL., 2014). Em modelo in vitro, o [6]-gingerol reduziu a expressão de TNF- α , NF- κ B e iNOS ativados por LPS (LEE et al., 2009). Em outro estudo o composto [6]-gingerol demonstrou efeito antinflamatório ao reduzir a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-12 e NF κ B a partir da indução de macrófagos de animais após o tratamento com LPS (TRIPATHI et al., 2007). Os relatos para atividade antinflamatória do [10]-gingerol são insuficientes, necessitando-se de mais trabalho com essa linha de investigação. O presente estudo é o primeiro a relatar a ação antinflamatória para o composto [10]-gingerol no contexto da sepse experimental.

Como citado anteriormente, a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) precoce é caracterizada por uma produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios (estado hiper-inflamatório). Esta resposta precoce é então suprimida progressivamente com o desenvolvimento da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS). A fase intermediária, na qual ocorre SIRS e CARS simultaneamente é descrita como MARS, onde ocorre a síndrome da resposta mista e uma desordem imunológica no quadro séptico (OSUCHOWSKI et al., 2016). Ambas as flutuações, em relação a expressão de citocina ocorrem de forma sistêmica e podem estar relacionadas as expressões em órgãos e sistemas (ANTONELLI et al., 1999). No presente estudo, a elevação dos níveis de RNAm pra TGF- β 1 pode ser um indicativo no qual o modelo estudado esteja inserido em uma fase de MARS, já que esta citocina tem perfil antinflamatório. Além disso, a expressão de TGF- β 1 ocorreu na mesma escala temporal

na qual os níveis de TNF- α e IL-1 β encontravam-se aumentados. No entanto, estas definições em sua totalidade não são tão específicas e claras, embora inegavelmente útil na clínica e ambiente de pesquisa, elas exigem uma verificação experimental em maior profundidade antes de poderem ser aceitas como um retrato fiel das flutuações imunes complexas encontradas na sepse (OSUCHOWSKI et al., 2016).

Alguns estudos demonstraram que o [6]-gingerol e o extrato do gengibre tem a habilidade de diminuir a expressão de TGF- β 1 em diferentes órgãos (KAMATO et al., 2013; YANG et al., 2014). A redução da expressão relativa das principais citocinas pró-inflamatória e normalização da resposta imunológica são tidos como os efeitos pelos quais o [6]-gingerol e [10]-gingerol possam exercer ação protetora sobre a função renal.

O diagnóstico precoce das nefropatias tem sido um dos objetivos principais da conduta clínica (MARSCHNER et al., 2015). Os biomarcadores tradicionais de diagnóstico, tais como creatinina, ureia e eletrólitos só se alteram com a perda considerável de um percentual da taxa de filtração glomerular. Nesse contexto, inúmeros estudos têm apresentado a molécula de injúria renal 1 (KIM-1) como marcador precoce e fidedigno de injúria renal advinda das mais variadas etiologias, especialmente o dano celular causado por injúria isquêmica e nefrotóxica (MARTENSSON et al., 2012; MARSCHNER et al., 2015). Este marcador é uma proteína transmembranar que aumenta sua expressão de forma específica nas células tubulares proximais quando expostas a insultos danosos (TU et al., 2014). Esta molécula se expressa mais rápido e de maneira mais específica do que outros marcadores tidos como biomarcadores precoces de injúria renal, tais como NGAL, MCP-1, IL-18 (LIANGOS et al., 2009, DEVARAJAN et al., 2011). Recentemente, tem se sugerido o KIM-1 como molécula chave para o diagnóstico e acompanhamento da injúria renal desencadeada pela sepse (TU et al., 2015). O presente estudo apresentou um supra expressão de RNAm de KIM-1 nas 48H após a indução da injúria por CLP. Sugerimo aqui que a sepse induzida neste trabalho desencadeou um cenário de hipoperfusão glomerular, além de uma provável redução do fluxo de oferta de sangue e oxigênio às células tubulares levando-as a isquemia e, desta forma, induzindo a elevada expressão de KIM-1.

A LHD é uma enzima chave da via glicolítica, tem ação importante para a conversão de piruvato à lactato. Esta enzima pode ser encontrada na maioria dos tecidos e os seus valores encontram-se elevados em uma gama de patologias, sobretudo em doenças cardíacas, musculares, hepáticas e durante a septicemia (PATHAK et al., 2010; DRAGICA et al., 2013).

No presente estudo, a sepsse experimental elevou a atividade da LDH nos animais CLP. Este resultado está de acordo com Rodrigues e colaboradores (2012) no qual demonstrou que o modelo CLP causava elevação na marcação da função de LDH plasmática. Em adição, Portella et al., (2013), também apresentou valores elevados de LDH em modelo pré-clínico de sepsse. Ambos os tratamentos com [6]-gingerol e [10]-gingerol foram hábeis em reduzir a atividade da LDH observada nos animais CLP. Em distúrbios por nefropatia diabética, compostos do gengibre reduziram consideravelmente a atividade desta enzima (ELSHATER et al., 2009). Além disso, o trabalho de ZENG e colaboradores (2015) reportou que o [6]-gingerol especificamente reduziu a atividade da LDH.

A aferição dos níveis de lactato sérico é aceita como marcador prognóstico e método de avaliação da perfusão tecidual, tanto em estudos retrospectivos como prospectivos realizados em pacientes com suspeita de infecção. Por vez, sua medida inicial é muitas vezes utilizada como triagem e usada como o gatilho para iniciar as condutas de reanimação durante septicemia independente do número de disfunções orgânicas (RANZANI et al., 2013). Adicionalmente, estudo recente reporta que a hiperlactemia está relacionada com oxigenação tecidual inadequada, aumento da via glicolítica e com implicações importantes para a morbidade e mortalidade dos pacientes críticos (BAKKER et al., 2013). A elevação de lactato em pacientes sépticos está associada com o desequilíbrio das vias metabólicas e estresse celular desregulado (BAKKER et al., 2013).

No presente trabalho, o modelo polimicrobiano de sepsse conduziu a um expressivo aumento nos valores de lactato quando comparados aos animais controles indicando, assim, alterações metabólicas nestes animais. Os compostos fenólicos [6]-gingerol e [10]-gingerol reduziram tal aumento, porém não de forma estatística. De forma geral, alguns estudos mostram que o composto [6]-gingerol melhora o metabolismo celular (UEKI et al., 2008; KIM et al., 2009; CHEN et al., 2013). Além

disso, estudos sugerem que estes compostos podem reduzir a participação dos mediadores inflamatórios e de processos oxidativos, como também da apoptose celular e, assim, melhorar a condição biológica de órgãos e sistemas celulares, em especial a função renal (CHEN et al., 2013; KAFESHANI et al., 2015). Ressalta-se que os rins, através de suas funções, são órgãos considerados essenciais para o controle do metabolismo celular e do equilíbrio ácido-básico (EATOON, 2006). Como citado anteriormente, alguns trabalhos mostraram que os compostos gingeróis ([6]-gingerol e [10]-gingerol), como também o extrato do gengibre foram eficazes em manter a função renal, quando esta foi desafiada a processos isquêmicos e a nefrotoxicidade por fármacos nefrotóxicos (UZ et al., 2009; AJITH et al., 2007; KHUAD 2006, RODRIGUES 2014), e assim, contribuíram para a melhora global dos parâmetros metabólicos *in vivo*.

A insuficiência renal do presente modelo ocorreu em conjunto com o colapso metabólico nos animais sépticos. Nesta condição, a hiperlactatemia é um indicativo de pouca oxigenação tecidual associada à perturbação metabólica, frequentemente descrita nessa síndrome (BAKKER et al., 2013). É bem documentado que aumento da atividade da LDH é um denotativo do comprometimento do metabolismo celular, frequentemente utilizado para monitorar a lesão renal secundária a sepse (RODRIGUES et al., 2012, PORTELLA et al., 2013).

Tem sido relatado que durante a evolução da patogênese da sepse a disrupção metabólica é complexa e envolve diversas vias (LIANG et al., 2015; GARCIA-SIMON et al., 2015). No entanto, no cenário ao qual a sepse desencadeia comprometimento renal ainda é mal compreendida. Recentemente, os ensaios utilizando a abordagem metabolômica baseada em espectrometria por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) têm proporcionado a identificação de uma variedade de metabólitos favoráveis para o diagnóstico dos distúrbios metabólicos na sepse pré-clínica (LIANG et al., 2016; KALIM et al., 2016; GARCIA-SIMON et al., 2015) e clínica (MICKIEWICZ et al., 2015). Nesse sentido, este estudo é o primeiro a usar a tecnologia da RMN de ^1H para a caracterização de metabólitos urinários durante a falha renal induzida pelo método CLP. Aqui identificamos os pontos-chave entre as complexas vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas, tanto nos animais sépticos com injúria renal, como nos seus tratamentos com os fenóis [6]-e [10]-gingerol.

Em adição, é cada vez mais unânime o emprego do estudo metabolômico por RMN em pacientes sépticos, classificando-o como de suma importância para o entendimento da evolução e os aspectos nutricionais e tratamento pontual (ENGLERT, et al., 2016). A análise por RMN de ^1H espectroscopia de biofluidos proporciona uma ferramenta potencial para compreender processos bioquímicos associados a doenças (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011).

Após a análise pelo método dos componentes principais (PCA) dos dados obtidos com a RMN encontraram mudanças consideráveis entre a discriminação de metabólitos entre os grupos. Indicando pontos chave para os aspectos da patogênese da fisiopatologia da sepse e sua progressão. Nossos achados expandiram o painel de metabólitos relacionados com vias metabólicas na sepse pré-clínica descritos em outros estudos. Ressalta-se que até o momento os estudos que utilizaram o método CLP para avaliação da disfunção metabólica, não aferiram e nem associaram o estágio patológico a função renal e suas modulações (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011; LIANG et al., 2016, LIN et al., 2009). O presente modelo faz essa ligação particular entre infecção, injúria renal após polinfecção e abordagem metabólica durante a sepse.

As disfunções de múltiplos órgãos frequentemente notadas no quadro clínico séptico estão correlacionadas com aumentos na produção tecidual de IL-1 β , IL-6, IL-10 (LI et al., 2015). Nesta fase patogênica a configuração metabólica sistêmica é alterada, acompanhada de forma concomitante por perfil metabólico desregulado (LI et al., 2015; IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011). Essas flutuações metabólicas foram observadas em estudos que correlacionaram o perfil metabolômico sistêmico e a disfunção de órgãos (função pulmonar e do baço) em modelo animal (LI et al., 2015; IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011).

O estresse oxidativo e o processo inflamatório foram fortemente associados às variações metabólicas no modelo de infecção por LPS sem manifestação de injúria renal confirmada (LI et al., 2015). Por meio de análise multivariada, identificamos perturbação das vias metabólicas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, identificando metabólitos tais como a creatina e a alantoína, que se apresentaram aumentados de forma mais consistente no grupo CLP. É fato que o estresse séptico desencadeado pela infecção polimicrobiana provoca uma desordem no metabolismo com alteração sugestiva do metabolismo protéico, que pode ser apoiado através da

identificação do metabólito creatina. Além de forte alteração via glicolítica, suportada pelo aumento da atividade da LDH e aumento do lactato sérico (LI et al., 2015; IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011).

Recentemente, Li e colaboradores (2017) demonstraram por meio de abordagem por RMN, em modelo murino, que a infecção por LPS conduz a considerável alteração renal por meio da via celular de NF- κ B e MAPK, decaimento da atividade antioxidante e estresse oxidativo, fatores estes associados com fenótipo metabólico alterado, tanto no plasma e no próprio tecido renal. Este estudo corrobora com os achados do presente estudo relacionado aos aumentos de creatina e acetato no grupo sepse/LRA, além de reportar que a injúria renal por LPS estava associada a menor participação da glutatona e inflamação renal (LI et al., 2017). Nesse aspecto, também tem sido demonstrado que existe diferença entre os perfis de metabólitos induzido apenas por um fator etiológico de infecção (ex: *staphylococcus aureus*) quando comparado à polinfecção (CLP) em modelo de sepse (LIN et al., 2016), resultando em biomarcadores e metabólitos específicos. Por outro lado, inúmeros estudos têm priorizado a avaliação das complicações sépticas pela abordagem da infecção polimicrobiana (LIN et al., 2009, IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011, WHELAN et al., 2014, APAYA et al., 2015, HARA et al., 2015, WEI et al., 2016). Em sua grande maioria, o uso da polinfecção como objeto de estudo é optado por melhor caracterizar os distúrbios metabólicos no evento séptico, além de estar fortemente associada à falha de múltiplos órgãos que é comumente observado na clínica (LIN et al., 2009, IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011, WHELAN et al., 2014, APAYA et al., 2015, HARA et al., 2015).

Ressalta-se que é crescente os estudos pré-clínicos concentrados na identificação de biomarcadores e a caracterização do comportamento metabólico durante a sepse (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011, WEI et al., 2016), fato este também observado no aspecto clínico, com notório uso da abordagem metabólica voltada à investigação das alterações metabólicas na sepse e no shock (SERKOVA et al., 2014, MICKIEWICZ et al., 2014, MICKIEWICZ et al., 2015, SU et al., 2015, LIU et al., 2016). Em adição, similar ao presente estudo, alguns prévios modelos experimentais têm visado, além da identificação dos metabólitos envolvidos na fisiopatologia da sepse, a intervenção com

substâncias dotadas de capacidade para modular a resposta inflamatória e processo oxidativo séptico (WHELAN et al., 2014, APAYA et al., 2015, LIANG, 2016).

De forma particular, os animais do grupo CLP manifestaram maior excreção urinária de DMG, metabólito este relacionado ao metabolismo da colina e metilamina. Ainda são escassos os estudos caracterizando o perfil de participação deste na síndrome séptica. Em contrapartida, abordagem pré-clínica recente indentificou este metabólito em infecção por *micobacterium* e *subsp. paratuberculosis* (DE BUCK et al., 2014), além disso, é sugerido que a participação da DMG esteja envolvida no metabolismo hepático e renal da glicina durante a infecção por bactérias gram negativas e gram positiva. (HOERR et al., 2012). A alantoína é um produto de degradação em estágio final do catabolismo da purina produzido por peroxidação de ácido úrico e degradação de proteína. Recentemente, estudo mostrou que o aumento das concentrações plasmáticas de alantoína estava associado à diminuição da função renal em pacientes com síndrome de resposta inflamatória sistêmica (TSALIK et al., 2014). [6]-gingerol e [10]-gingerol modulou o perfil metabólico dos animais CLP favorecendo a normalizando os valores dos metabólitos creatina, alantoína e DMG.

Relatamos uma maior excreção urinária de dimetilamina (DMA) e dimetilsulfona (DMS) após o uso dos compostos [6]- e [10]-gingerol testados nos animais CLP. Estes metabólitos têm sido relacionados com doenças inflamatórias (MICKIEWICZ et al., 2015), tal como a doença inflamatória intestinal, assim como também parecem ter um papel importante na patogênese da infecção sistêmica (DE BUCK et al., 2014). Níveis maiores de DMA foram detectados em pacientes com choque sépticos não sobreviventes em comparação aos sobreviventes, indicando assim que este metabólito está envolvido de forma crítica na fisiopatologia da sepse, podendo ser um indicativo da gravidade associada ao insulto infeccioso (MICKIEWICZ et al., 2015).

Já a DMS é um composto orgânico contendo enxofre que ocorre naturalmente em seres humanos e em outros organismos. É um metabólito co-participante de uma série de doenças inflamatórias, como artrite, alergias e certas infecções parasitárias (KIM et al., 2009). Por outro lado alguns trabalhos têm indicado forte efeito anti-inflamatório desse metabólito. O tratamento com DMS suprimiu a supraexpressão de NF- κ B, dos níveis aumentados de ON e os fatores relacionados ao dano por LPS (KIM

et al., 2009). Sugerimos que a melhora da função renal pelos compostos gingeróis favoreceu para a maior excreção de DMA e DMS, envolvida no metabolismo sistêmico do processo séptico. Ambos os metabólitos participam do metabolismo da colina/metilamina e da metionina, respectivamente. Em conjunto, nossa abordagem metabolômica relatou a implicação no metabolismo de aminoácidos, purina, glutatona e via glicolítica envolvidas no presente modelo animal. De fato, tratamentos com [6]-[10]-gingerol parecem modular as vias metionina e metilamina em ratos sépticos. A figura 52 resume as vias envolvidas e suas interligações, como também a biomarcação dos metabólitos discutidos aqui.

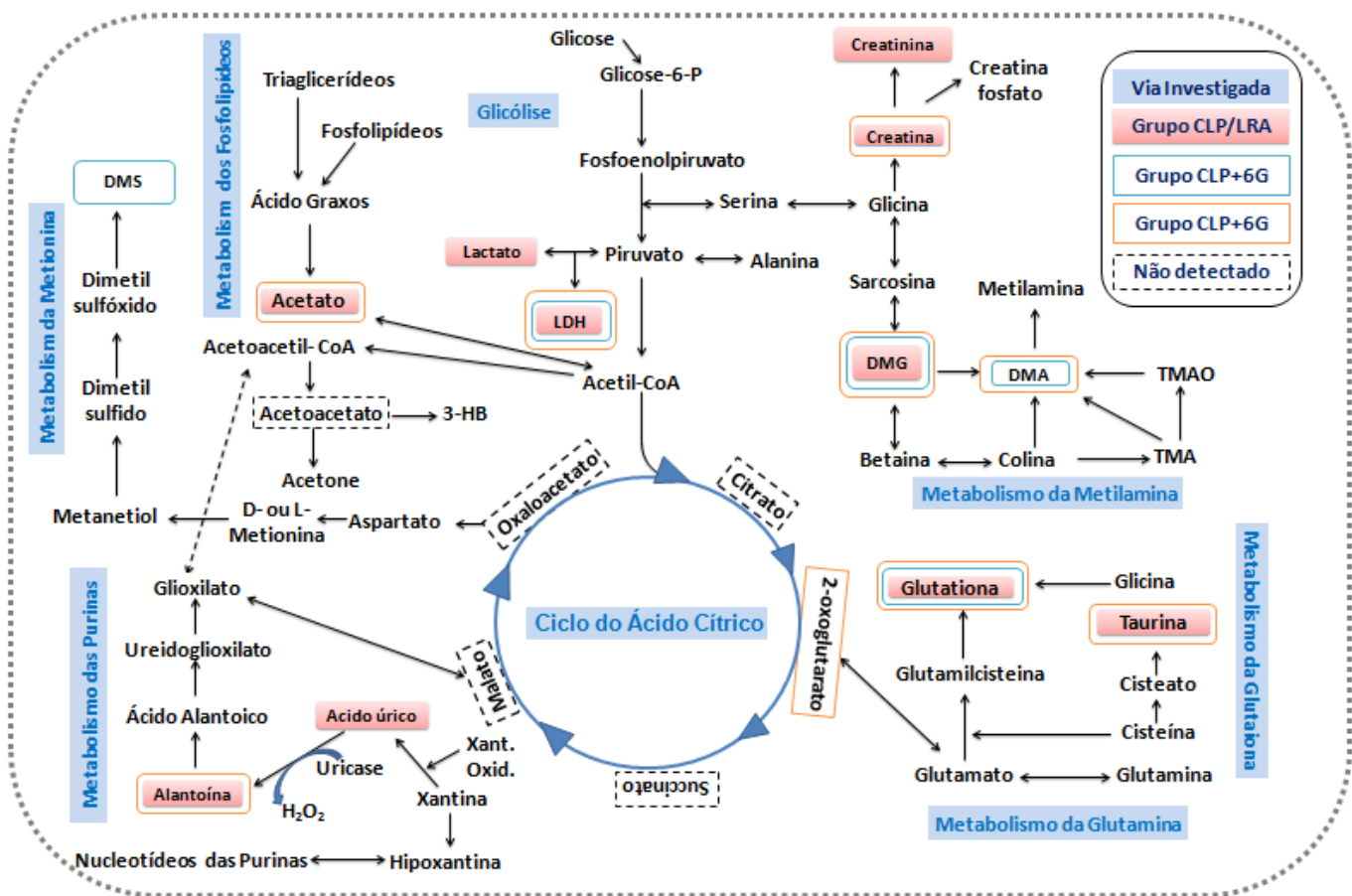
Foi observada uma redução significativa nas curvas de sobrevivência dos animais CLP no presente trabalho, o processo infeccioso causa significativa diminuição da sobrevivência, manifestado de forma precoce (WU et al., 2007; YASUDA et al., 2006, CAMPOS et al., 2011). O tratamento com os compostos [6]- e [10]-gingerol elevou a sobrevivência dos animais infectados. Ressalta-se que até o momento não existem estudos demonstrando o papel de ambos os compostos em melhorar a sobrevivência de forma semelhante ao nosso, desta forma, o efeito aqui observado reforça que estas moléculas podem desempenhar efeitos celulares importantes em sistemas orgânicos.

Alguns trabalhos tem demonstrado que a indução do processo infeccioso pelo método CLP desencadeia alterações morfológicas no tecido renal de animais, tais a lesão tubular proeminente, caracterizada por alterações no revestimento de células epiteliais (desorganização das células epiteliais e desnudação da porção da membrana tubular), na região apical e vaculose tubular e desorganização da borda apical (PORTELLA et al., 2013). Estes achados estão em concordância com os achados do nosso estudo. Os compostos testados reduziram em mais da metade essas observações notadas no grupo CLP. Estudos prévios demonstram que os compostos gingeróis melhoram a morfologia renal (RODRIGUES et al., 2014).

Especificamente, o [6]-gingerol tem a habilidade de conservar a organização da estrutura celular renal, observado nos modelos de lesão renal por fármacos nefrotóxicos (KUHAD et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014; HEGAZY et al., 2016). Como também, através de estudo histopatológico o [6]-gingerol melhorou o perfil de escores associados ao dano tecidual renal em modelo de necrose tubular aguda (HEGAZY et al., 2016). O extrato do gengibre também melhorou os aspectos e os escores morfológicos

de rins alterados por farmaco nefrotóxico (NASRI et al., 2013). Todos os mecanismos associados à proteção renal aqui demonstrados e apresentados na literatura médica relacionados ao *Zingiber Officinale* e dos compostos derivados do seu extrato são associados e dependentes de suas propriedades antioxidantes e antiinflamatória (RODRIGUES et al., 2014, KUHAD et al., 2006; HAMED et al., 2012; TRIPATHI et al., 2007; SHANMUGAM et al., 2010).

Figura 52- Sumário das biomarcações relacionadas com as vias investigadas em conjunto pela abordagem por RMN de ¹H e os demais métodos, caracterizando as suas interligações.



Fonte: Autor.

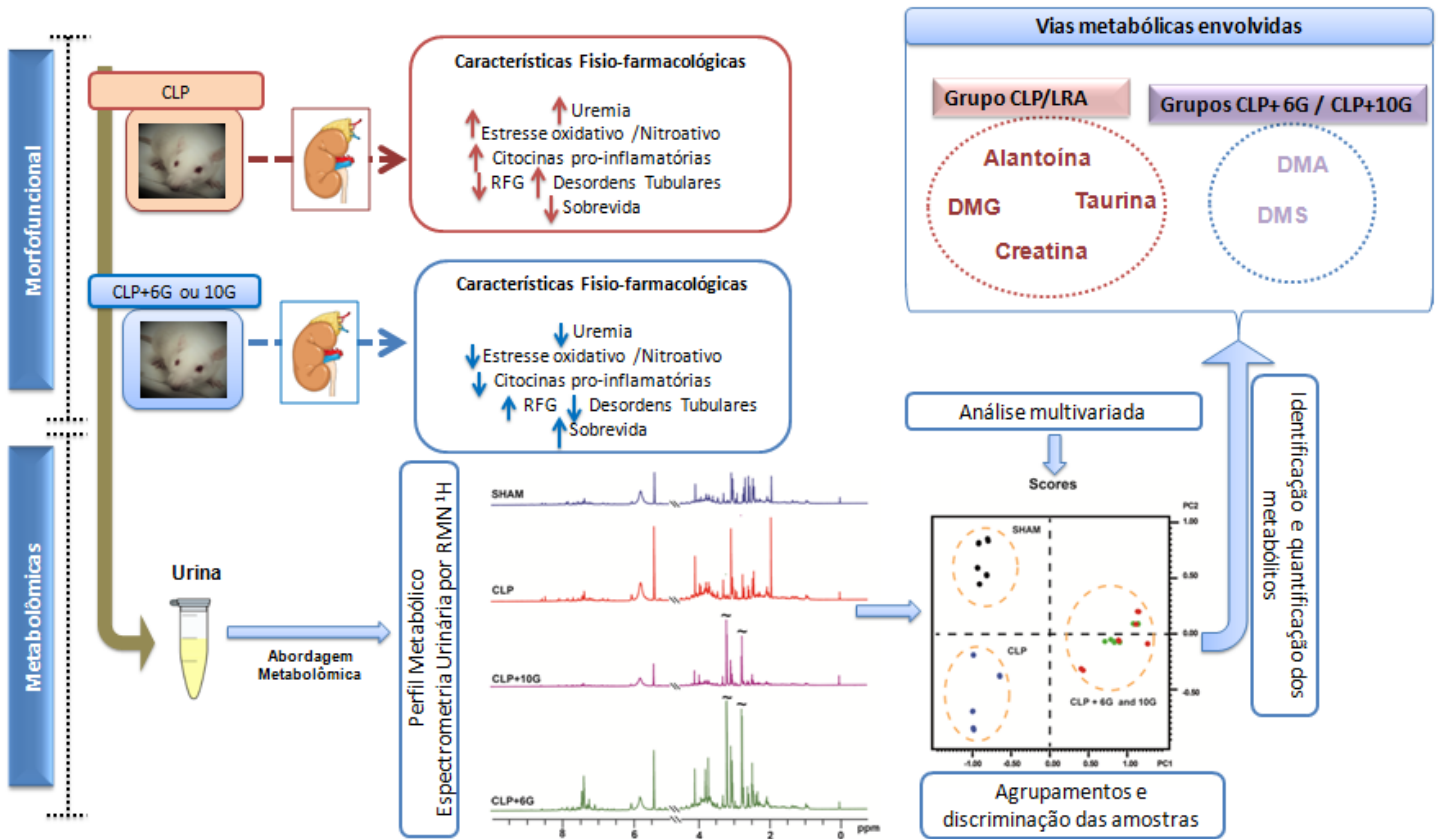
Nota: A figura indica a biomarcação dos metabólitos e suas respectivas vias bioquímicas. Metabólitos em vermelho estão relacionados à sepse com lesão renal, metabólitos ciclados em azul indicam alterações para o grupo CLP+6G e metabólitos ciclados em amarelo indicam alterações evidenciadas no grupo CLP+10G. As alterações (aumentos ou reduções), estão indicados na sessão de resultados. Dimetil sulfona (DMS), dimetilamina (DMA), dimetilglicina (DMG), 3-hidroxiobutirato (3-HB), Trimetilamina (TMA), óxido de trimetilamina (TMAO).

7 CONCLUSÕES

Conclui-se a partir dos dados obtidos no presente estudo que o modelo polimicrobiano de sepse gera modificações significativas na sobrevida e nos parâmetros bioquímicos e funcionais da atividade renal, sendo um modelo satisfatório para a investigação de mediadores e possíveis inibidores envolvidos na falha renal aguda.

Além disso, os resultados confirmam as ações benéficas dos compostos [6]-e [10]-gingerol ao atenuar as alterações renais reportadas através da avaliação bioquímica, da redução do estresse oxidativo e do bloqueio do processo pró-inflamatório induzido pelo processo CLP. Em adição, a desordem metabólica na sepse/LRA foi correlacionada às alterações envolvendo principalmente o metabolismo proteico e de purinas e, além do que, os achados indicam que os tratamentos com [6]- e [10]-gingerol aumentam a participação de DMA e DMS quantificada nas urinas de animais sépticos, assim sugerindo esses metabólitos como possíveis biomarcadores associadas com infecção e falha renal durante a sepse. Suger-se investigações futuras para aferição dos efeitos hemodinâmicos renais desencadeados pelos compostos [6]- e [10]-gingerol, como também sua propriedade antibacteriana, além da expansão da avaliação metabólica por meio de dosagens plasmáticas e o emprego de espectrometria de massas, a fim de possibilitar melhor entendimento e os mecanismos observados neste estudo.

Figura 53- Modelo hipotético com o resumo dos principais achados associado à proteção renal pelas moléculas [6]-gingerol e [10]-gingerol.



Fonte: Autor.

Nota: A figura reporta as principais alterações desencadeadas pelo processo polinfecioso e efeitos encontrados para as substâncias [6]- e [10]-gingerol diante as modificações funcionais renais causadas durante a falha renal séptica. A mesma imagem apresenta a integração de dos os principais achados obtidos a partir dos métodos aplicados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABROTT D.; HADLER C.; ARANI A.; CLOVICK U.; PINCHES M.; FURLONG S. T. Characterization of renal biomarkers for use in clinical trials: biomarker evaluation in healthy volunteers. **Drug design development and therapy**, v.8, p. 227-237, 2014.

AHUI, M.L.B.; CHAMPY, P.; RAMADAN, A. Ginger prevents Th2-mediated immune responses in a mouse model of airway inflammation. **International immunopharmacology**, v.8, p.1626-1632, 2008.

AJITH, T. A.; NIVITHA, V.; USHA, U. Zingiber officinale Roscoe alone and in combination with a-tocopherol protect the kidney against cisplatin-induced acute renal failure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 921–927, 2007.

ALI, B. H. et al. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food and chemical toxicology**, v. 46, p. 409-20, 2008.

ALQASOUMI, I.A. Ameliorative effect of [10]-gingerol on drug induced hepatotoxicity in albino rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, Vol. 6, p. 1548-1555, 9 March, 2012.

ALVES-FILHO, J. C.; FREITAS, A.; SOUTO, F. O.; SPILLER, F.; PAULA-NETO, H.; SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 4018-23, 2009.

ALVES-FILHO, J. C.; SÔNEGO, F.; SOUTO, F. O.; FREITAS, A.; VERRI, W. A. Jr.; AUXILIADORA-MARTINS, M.; BASILE-FILHO A.; MCKENZIE, N. A.; XU D.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v. 16, p. 708-12, 2010.

ANGELI, P.; TONON, M.; PILUTTI, C.; MORANDO, F.; PIANO, S. Sepsis-induced acute kidney injury in patients with cirrhosis. **Hepatology International**, v.10, p.115–123, 2016.

ANGUS, D.C.; POLL, T.V.D. Severe Sepsis and Septic Shock . **The New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 840-851, 2013.

ANGUS, D.C.; SEYMOUR, C.W.; COOPERSMITH, C.M.; DEUTSCHMAN, C.S.; KLOMPAS, M.; LEVY, M.M.; MARTIN, G.S.; OSBORN, T.M.; RHEE, C.; WATSON, R.S. A Framework for the Development and Interpretation of Different Sepsis Definitions and Clinical Criteria. **Critical Care Medicine** V. 44, p. 113-121, 2016.

APAYA, M.K.; LIN, C.; CHIOU, C.; YANG, C.; TING, C.; SHYUR, L. Simvastatin and a Plant Galactolipid Protect Animals from Septic Shock by Regulating Oxylin Mediator Dynamics through the MAPK-cPLA2 Signaling Pathway. **Molecular Medicine**. v.21, p. 988–1001, 2015.

ARYAEIAN, N.; TAVAKKOLI, H. Ginger and its Effects on Inflammatory Diseases. **Advances in food technology and nutritional sciences**, v.1, p.-97-100, 2015.

ANTONELLI, M. Sepsis and septic shock: pro-inflammatory or anti-inflammatory state? **Journal Chemotherapy**, v.1, p.536-40, 1999.

BADRELDIN, H A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 409-420. 2008.

BAKKER, J.; NIJSTEN M. W. N.; JANSEN, T. C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. **Annals of Intensive Care**, v. 3, p. 2-8, 2013.

BANDAY, A. A.; FAROOQ, N.; PRIYAMVADA, S.; YUSUFI, A. N. K.; KHAN, F. Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. **Life sciences**, v. 82, p. 450-9, 2008.

BARRERA, G.; LANDONI V.; MARTIRE-GRECO, D.; CHIARELLA, P.; MEISS, R.; GÓMEZ, S.A.; ALVES-ROSA, F.; REARTE, B.; ISTURIZ, M.; PALERMO, M.S.; FERNÁNDEZ, G.C. Model of Polymicrobial Peritonitis That Induces the Proinflammatory and Immunosuppressive Phases of Sepsis. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 1280–1288, 2011.

BATEMAN, R. M.; JAGGER, J. E.; SHARPE, M. D.; ELLSWORTH, M. E.; MEHTA, S.; C. G. ELLIS. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. **American Journal Physiol Heart Circulatory Physiol**, v. 280, p. 2848–2856, 2001.

BEAL, B. H. Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Dissertação mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

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

BELLOMO. R. Acute Renal Failure. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.32, p. 639-650, 2011.

BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Simposio Medicina intensiva**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 18-26, 2001.

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. **Phytotherapy Research**, v.29, p. 1707–1713, 2015.

BERMEJO-MARTIN, J.F.; ANDALUZ-OJEDA, D.; ALMANSA, R.; GANDÍA, F.; GÓMEZ-HERRERAS, J.I.; GOMEZ-SANCHEZ, E.; HEREDIA-RODRÍGUEZ, M.; EIROS, J.M.; KELVIN, D.J.; TAMAYO, E. Defining immunological dysfunction in

sepsis: A requisite tool for precision medicine. **Journal of Infection**, v. 72, p.525-523, 2016.

BHADADE, R.R.; SOUZA, R.; HARDE, M.J.; SRIDHAR, B. Microalbuminuria: A biomarker of sepsis and efficacy of treatment in patients admitted to a medical intensive care unit of a tertiary referral center. **Journal of the Japanese Society of Intensive Care Medicine**, v. 60, p.145-150, 2014.

BLACK, C.D.; HERRING, M.P.; HURLEY, D.J.; O'CONNOR, P.J. Ginger (*Zingiber officinale*) reduces muscle pain caused by eccentric exercise. **The Journal of Pain**, v.11, p. 894-903, 2010.

BOFFA, J.; ARENDSHORST, W. J. Maintenance of Renal Vascular Reactivity Contributes to Acute Renal Failure during Endotoxemic Shock. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, p. 117–124, 2005.

BOFFA, J.J.; JUST, A.; COFFMAN, T.M.; ARENDSHORST, W.J. Thromboxane receptor mediates renal vasoconstriction and contributes to acute renal failure in endotoxemic mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.15, p. 2358-65, 2004.

BOYACIOGLU, M.; TURGUT, H.; AKGULLU, C.; ERYILMAZ, U.; KUM, C.; ONBASILI, O. A. The Effect of L-Carnitine on Oxidative Stress Responses of Experimental Contrast-Induced Nephropathy in Rats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, p. 1-8, 2014.

BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p.248-254,1976.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 854-865, 2005.

CAMPOS, R.; SHIMIZU, M. H. M.; VOLPINI, R. A.; DE BRAGANÇA, A. C.; ANDRADE, L.; LOPES, F. D. T. Q. S.; OLIVO, C.; DANIELE CANALE, D.; SEGURO, A. C. N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. **The American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, p. 640-650, 2012.

CAWCUTT, K.A.; PETERS, S.G. Severe sepsis and septic shock: clinical overview and update on management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, p. 1572-1578, 2014.

CHAKRABORTY, D.; MUKHERJEE, A.; SIKDAR, S.; PAUL, A.; GHOSH, S.; KHUDA-BUKHSH, A.R. [6]-gingerol isolated from ginger attenuates arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signaling in mice. **Toxicology Letters**, v. 210, p. 34–43, 2012.

CHANG, K.; KUO, C.; 6-Gingerol modulates proinflammatory responses in dextran sodium sulfate (DSS)-treated Caco-2 cells and experimental colitis in mice through

adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation. **Food Funct**, v.6, p. 3334–334, 2015.

CHEN, Y.; ZHUANG, X.; XU, Z.; LU, L.; GUO, H.; WU, W.; LIAO, X. Higenamine Combined with [6]-gingerol Suppresses Doxorubicin-Triggered Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes via Upregulation of PI3K/Akt Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-14, 2013.

CHOI, Y.Y.; KIM, M.; HONG, J.; KIM, S. YANG, W. Dried Ginger (*Zingiber officinalis*) Inhibits Inflammation in a Lipopolysaccharide-Induced Mouse Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, p. 1-9, 2013.

CHUNG, W.; JUNGA, Y.; SURHE, Y.; LEE, S. Antioxidative and antitumor promoting effects of [6]-paradol and its homologs. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v.496: p.199–206, 2001.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p.885-891, 2002.

COLDEWEY, S. M.; KHAN, A. I.; KAPOOR, A.; COLLINO, M.; ROGAZZO, M.; BRINES, M. CERAMI, A.; HALL, P.; SHEAFF, M.; KIESWICH, J. E.; YAQOUB, M. M.; PATEL, N. S. A.; THIEMERMANN, C. Erythropoietin attenuates acute kidney dysfunction in murine experimental sepsis by activation of the b-common receptor. **Kidney International**, v. 84, p. 482–490, 2013.

COSTA, J. C; NETO, O. M. Insuficiência renal aguda. **Simpósio: Urgência e emergência nefrológicas**, v. 36, 307-324, São Paulo, 2003.

CRACIUN, F.L.; ISKANDER, K.N.; CHISWICK, E.L.; STEPIEN, D.M.; HENDERSON, J.M.; REMICK, D.G. Early murine polymicrobial sepsis predominantly causes renal injury. **Shock**, v. 41, p. 97-103, 2014.

CROMPHAUT, V. S.J.; VANHOREBEEK, I.; BERGHE, V.G. Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.14, p.1887-99, 2008.

DABAGUE, I. C. M.; DESCHAMPS, C.; MÓGOR, A.F.; SCHEER, A.P.; CÔCCO, L. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.79-84, 2011.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P.O. Systemic inflammatory response syndrome. **British Journal of Surgery**, v. 84, p.920-35, 1997.

DAWISKIBA, T.; DEJA, S.; MULAK, A.; ZĄBEK, A.; JAWIEŃ, E.; PAWEŁKA, D.; BANASIK, M.; MASTALERZ-MIGAS, A.; BALCERZAK, W.; KALISZEWSKI, K.; SKÓRA, J.; BARĆ, P.; KORTA, K.; PORMAŃCZUK, K.; SZYBER, P.; LITARSKI, A.; MŁYNARZ, P. Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**, v. 7, n. 20, e. 1, p. 163-74, 2014.

DE BUCK J.; SHAYKHUTDINOV, R.; BARKEMA, H.W.; VOGEL, H.J. Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. **PLoS One**, v. 5, n. 9, e.11, 2014.

DEJAGER, L.; PINHEIRO. I.; DEJONCKHEERE, E.; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Cell press**, v. 19, p. 198-208, 2011.

DELANAYE, P.; SCHAEFFNER, E.; EBERT, N.; CAVALIER, E.; MARIAT, C.; KRZESINSKI, J.; MORANNE, O. Normal reference values for glomerular filtration rate: what do we really know? **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, p. 2662-2672, 2012.

DELLINGER RP, LEVY MM, RHODES A, ANNANE D, GERLACH H, OPAL SM, SEVRANSKY JE, SPRUNG CL, DOUGLAS IS, JAESCHKE R, OSBORN TM, NUNNALLY ME, TOWNSEND SR, REINHART K, KLEINPELL RM, ANGUS DC, DEUTSCHMAN CS, MACHADO FR, RUBENFELD GD, WEBB SA, BEALE RJ, VINCENT JL, MORENO R. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, v.41, p.580-637, 2013.

DEVARAJAN, P. Biomarkers for the Early Detection of Acute Kidney Injury. **Current Opinion in Pediatrics**. v. 23, p.194-200, 2011.

DOI, K.; HU, X.; YUEN, P. S. T.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YASUDA, H.; KIM, S. M.; SCHNERMANN, J.; JONASSEN, T.; FRØKJÆR, J.; NIELSEN, S.; STAR, R. A.; AP214, an analogue of α -melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. **Kidney International**, v. 73, p. 1266-1274, 2008.

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S. T.; STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 2868-2878, 2009.

DOI, K.; YUEN, P. S. T.; EISNER, C.; HU, X.; LEELAHAVANICHKUL, A.; SCHNERMANN, J.; STAR, R. A. Reduced Production of Creatinine Limits Its Use as Marker of Kidney Injury in Sepsis. **Journal of the American Society Nephrology**, v.20, p. 1217–1221, 2009.

DUONG, S.; CONDOTTA, S.A.; RAI, D.; MARTIN, M.D.; GRIFFITH, T.S.; BADOVINAC, V.P. Polymicrobial sepsis alters antigen-dependent and -independent memory CD8 T cell functions. **The Journal of Immunology**.192, p.618-25, 2014.

DUGASANI, S. PICHIKAC, M.R., NADARAJAH, V.D., BALIJEPALLIC, M.K., TANDRAA, S., KORLAKUNTA, J. N. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-Gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 515-20, 2010.

EATOON, D.C.; POOLER, J. P. **Fisiologia Renal de Vander**, 6ª Ed. 2006.

EL-KOTT, A.F.; AL-BAKRY, K.A.; ELTANTAWY, W.A. Preventive and Curative Effects of *Zingiber officinale* Extract against Histopathological and Ki-67

- Immunohistochemical Changes of Glycerol-Induced Acute Renal Failure in Rat. **Journal of Medical Sciences**, v.15, p. 25-31, 2015.
- ELSHATER, A.A.; SALMAN, M.M.A.; MOUSSA, M.M.A. Effect of Ginger Extract Consumption on levels of blood Glucose, Lipid Profile and Kidney Functions in Alloxan Induced-Diabetic Rats. Egyptian **Academic Journal of Biological Sciences**, v. 2, p. 153-162, 2009.
- ENGLERT, J. A.; ROGERS, A. J. Metabolism, Metabolomics, and Nutritional Support of Patients with Sepsis. **Clin Chest Med**, v. 37, e. 2, p. 321-31, 2016.
- ERBAS, O.; ERGENOGLU, A. M.; AKDEMIR, A.; YENIEL, A. O. Z. R.; TASKIRAN, D. Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. **Journal of surgical research**, v. 83, p. 313-320, 2013.
- FANG, H.; JIANG, W.; CHENG, J.; LU, Y.; LIU, A.; KAN, L.; DAHMEN, U. Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- FILGUEIRAS, J.R. L. R. F.; MARTINS, J. O.; SEREZANI, C. H.; CAPELOZZI, V. L.; MONTES, M. B. A.; JANCAR, S. Sepsis-Induced Acute Lung Injury (ALI) Is Milder in Diabetic Rats and Correlates with Impaired NFkB Activation. **Plos One**, v. 7, p. 1-9, 2012.
- FLEISCHMANN, CN, SCHERAG, A.; ADHIKARI, N. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis e current estimates and limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2015.
- FLOHÉ, S.B.; AGRAWAL, H.; SCHMITZ, D.; GERTZ, M.; FLOHÉ, S.; SCHADE, U. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, p. 473-481, 2006.
- FORTIN, C.F.; MCDONALD, P.P. FULOP, T.; LESUR, O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (no): an intricate affair. **Shock**, v. 33, p. 344-352, 2010.
- FUNK, J.L.; FRYE, J.B.; OYARZO, J.N.; TIMMERMANN, B.M. ARTHRITIS, R. Comparative Effects of Two Gingerol-Containing Zingiber officinale Extracts on Experimental. **Journal of Natural Products**, V. 72, p. 403-407, 2009.
- GARCIA-SIMON, M.; MORALES, J.M.; MODESTO-ALAPONT, V.; GONZALEZ-MARRACHELLI, V.; VENTO-REHUES, R.; JORDA-MIÑANA, A.; BLANQUER-OLIVAS, J.; MONLEON, D. Prognosis Biomarkers of Severe Sepsis and Septic Shock by 1H NMR Urine Metabolomics in the Intensive Care Unit. **PLoS One**. 2015, v.10: p.0140993, 2015.

GAY, N. J.; SYMMONS, M.F; GANGLOFF, M.; BRYAN, C.E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. **Nature**, v.14, p. 546-558, 2014.

GOMEZ, H.; INCE, C.; BACKER, D.; PICKKERS, P.; PAYEN, D.; HOTCHKISS, J.; KELLUM, J. A. A Unified Theory of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: Inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury. **Shock**, v. 41, p. 3-11, 2014.

GONÇALVES, T. B.; BRAGA, M. A.; DE OLIVEIRA, F. F.; SANTIAGO, G. M.; CARVALHO, C. B.; BRITO E CABRAL, P.; DE MELO SANTIAGO, T.; SOUSA, J. S.; BARROS, E. B.; DO NASCIMENTO, R. F.; NAGAO-DIAS, A. T. Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*. **Phytomedicine**, v. 19, p. 962-8, 2012.

GREEN, L. C.; TANNENBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in Parkinson's disease using the model of the 6-hydroxydopamine and MPTP. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.899, p.262-273, 2000.

GUPTA, S.; RAVISHANKAR, S. A Comparison of the Antimicrobial Activity of Garlic, Ginger, Carrot, and Turmeric Pastes Against *Escherichia coli* O157:H7 in **Laboratory Buffer and Ground Beef**. v. 2, p. 330-340, 2005.

HAMED, M. A.; ALI, S. A.; EL-RIGAL, N. S. Therapeutic Potential of Ginger against Renal Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

HAN, L.K.; GONG, X.J.; KAWANO, S.; SAITO, M.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Antiobesity actions of *Zingiber officinale* Roscoe. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v.125, p. 213-217. 2005.

HANIADKA, R.; RAJEEV, A.G.; PALATTY, P.L.; ARORA, R.; BALIGA, M.S. *Zingiber officinale* (ginger) as an anti-emetic in cancer chemotherapy: a review. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 18, p. 440-4, 2012.

HARA, N.; CHIJIWA, M.; YARA, M.; ISHIDA, Y.; OGIWARA, Y.; INAZU, M.; KURODA, M.; KARLSSON, M.; SJOVALL, F.; ELMÉR, E.; UCHINO H. Metabolomic Analyses of Brain Tissue in Sepsis Induced by Cecal Ligation Reveal Specific Redox Alterations--Protective Effects of the Oxygen Radical Scavenger Edaravone. **Shock**, v.44, p. 578-84, 2015.

HARRIS, D.G.; MCCRONE, M.P.;KOO, G.K.; WELTZ, A.S.; CHIU, W.C.; SCALEA, T.M.; DIAZ, J.J. LISSAUER, M.E.Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill surgical patients. **Journal of Critical Care**, v.30, p. 102–106, 2015.

HEEMSKERK, S.; PICKKERS,P.; BOUW, M. P.W.J.M. DRAISMA, A.; HOEVEN,J.G.V.; PETERS, W.H.M., SMITS, P.; RUSSEL, F.G.M.; MASEREEUW, R. Upregulation of Renal Inducible Nitric Oxide Synthase during Human Endotoxemia

- and Sepsis Is Associated with Proximal Tubule Injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrolog**, v.1, p. 853-862, 2006.
- HEGAZY, A.M.; MOSAED, M.M.; ELSHAFFEY, S.H.; BAYOMY, N.A. 6-gingerol ameliorates gentamicin induced renal cortex oxidative stress and apoptosis in adult male albino rats. **Tissue Cell**, v.48, p.208-16, 2016.
- HERAS, M.; GARCÍA-COSMES, P.; FERNÁNDEZ-REYES, M. J.; SÁNCHEZ, R. Natural progression of renal function in the elderly: analysis of poor prognosis factors associated with chronic kidney disease. **Nefrologia**, v. 33, p. 462-469, 2013.
- HERNANDES, M.; D'AVILA, J.C.; TREVELIN, S.C.; REIS, P.A.; KINJO, E.R.; LOPES, L.R.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; CUNHA, F.Q.; BRITTO L.R.; BOZZA, F.A. JOURNS K. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. **Journal Neuroinflammation**, v. 36, p.1-12, 2014.
- HO, S.C.; CHANG, K.S.; LIN, C.C.; Anti-neuroinflammatory capacity of fresh Ginger is attributed mainly to 10-Gingerol. **Food chemistry**, v.141, p. 3183-3191, 2013.
- HOLLY, M.K.; DEAR, J.W.; HU, X.; SCHECHTER, A.N.; GLADWIN, M.T.; HEWITT, S.M.; YUEN, P.S. STAR, R.A. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. **Kidney International**, v.70: p.496-506, 2006.
- HOCHERL, K.; SCHMIDT, C.; KURT, B.; BUCHER, M. Inhibition of NF-κB ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 298, p. 196–204, 2010.
- HOERR, V.; ZBYTNUIK, L.; LEGER, C.; TAM, P.P.; KUBES, P.; VOGEL, H.J. Gram-negative and Gram-positive bacterial infections give rise to a different metabolic response in a mouse model. **Journal of Proteome Research**, v. 1, n. 11, e. 6, p. 3231-45, 2012
- HOLTHOFF, J. H.; WANG, Z.; SEELY, K. A.; GOKDEN, N.; MAYEUX, P. R. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. **Kidney International**, v. 81, p. 370-378, 2012.
- HOSTE, E.A.; BAGSHAW, S.M.; BELLOMO, R.; CELY, C.M.; COLMAN, R.; CRUZ, D.N.; EDIPIDIS, K.; FORNI, L.G.; GOMERSALL, C.D.; GOVIL, D.; HONORÉ, P.M.; JOANNES-BOYAU, O.; JOANNIDIS, M.; KORHONEN, A.M.; LAVRENTIEVA, A.; MEHTA, R.L.; PALEVSKY, P.; ROESSLER, E.; RONCO, C.; UCHINO, S.; VAZQUEZ, J.A.; VIDAL, A.E.; WEBB, S.; KELLUM J.A. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. **Intensive Care Medicine**, v.41, p. 1411–1423, 2015.
- HSIAO, C.; LEE, C.; TSAO, L.; LO, H. The Dose-Dependent Immunoregulatory Effects of the Nitric Oxide Synthase Inhibitor NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester in Rats with Sub-Acute Peritonitis. **Plos One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

HSING, C.; CHOU, W.; WANG, J.; CHEN, H.; YEH, C. Propofol increases bone morphogenetic protein-7 and decreases oxidative stress in sepsis-induced acute kidney injury. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, p. 1162–1172, 2011.

HU, Y.; PAI, M.; YEH, C.; HOU, Y.; YEH, S. Glutamine administration ameliorates sepsis-induced kidney injury by downregulating the high-mobility group box protein-1 mediated pathway in mice. **American Journal of Physiol Renal Physiol**, v. 302, p. 150-158, 2011.

HUBER-LANG, M.; SARMA, V. J.; LU, K. T.; MCGUIRE, S. T.; PADGAONKAR, V. A.; GUO, R. F.; YOUNKIN, E. M.; KUNKEL, R. G.; DING, J.; ERICKSON, R.; CURNUTTE, J. T.; WARD, P. A. Role of C5a in Multiorgan Failure During Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1193-1199, 2001.

HUMPHREYS, B. D.; SOIFFER, R.J.; MAGEE, C.C. Renal Failure Associated with Cancer and Its Treatment: An Update. **American Society of Nephrology**, v. 16, p.151–161, 2005.

IMANI, H.; TABIBI, H.2.; NAJAFI, I.; ATABAK, S.; HEDAYATI, M.; RAHMANI, L. Effects of ginger on serum glucose, advanced glycation end products, and inflammation in peritoneal dialysis patients. **Nutrition**, v.3, p.703-707, 2015.

ISKANDER, N.K.; OSUCHOWSKI, M.F.; REMICK, D.G. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. **Physiological Reviews**, v.93, 1247-1288, 2013.

ISLAM, K.; ROWSNI, A.A.; KHAN, M.; KABIR, S. Antimicrobial activity of ginger (*zingiber officinale*) extracts against food-borne pathogenic bacteria. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v.3, p. 867 – 871, 2014.

IZQUIERDO-GARCÍA, J. L.; NIN, N.; RUÍZ-CABELLO, J.; ROJAS, Y.; DE PAULA, M.; LÓPEZ-CUENCA, S.; MORALES, L.; MARTÍNEZ-CARO, L.; FERNÁNDEZ-SEGOVIANO, P.; ESTEBAN, A.; LORENTE, J. A metabolomic approach for diagnosis of experimental sepsis. **Intensive Care Med**, v. 37, e.12, p. 2023-32, 2011.

JAO, H.; LIN, Y.; TSAI, L.; WANG, C.; LIU, H.; HSU, C. Early expression of heme oxygenase-1 in leukocytes correlates negatively with oxidative stress and predicts hepatic and renal dysfunction at late stage of sepsis. **Shock**, v. 23, p. 464-469, 2005.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular Mechanisms in Sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 22, p. 63-72, 2007.

JIANG, H. **Modern tools to study traditional medicinal plants: Ginger and turmeric**. Dissertation. -- The University of Arizona, 2005.

JUNG, H.W.; YOON, C.H.; PARK, K.M.; HAN, H.S.; PARK, Y.K.; Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPSstimulated BV2 microglial cells via the NF-kappa B pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1190-1197, 2009.

KAFESHANI, M. Ginger, micro-inflammation and kidney disease. **Journal of Renal Endocrinology**, v. 4, p.1-2, 2015.

KALIM, S.; RHEE, E.P. An overview of renal metabolomics. **Kidney International**. v.91: p.61-69. 2017

KASSIM, M.; MANSOR, M.; KAMALDEN, T. A.; SHARIFFUDDIN, I. I.; HASAN, M. S.; ONG, G.; SEKARAN, S. D.; SUHAIMI, A.; AL-ABD, N.; YUSOFF, K. M. Caffeic acid phenethyl ester (cape): scavenger of Peroxynitrite in vitro and in sepsis models. **Shock**, v. 42, p. 154-160, 2014.

KELLUM, J. A. Acute kidney injury. **Critical Care Medicine**, v.36, p.141-145, 2008.

KELLUM, J.A., LIU, K.D.L.; MEHTA, R.L.; PANNU, N. Acute kidney injury: an increasing global concern. **The Lancet**, v. 6736, p.1-10, 2013.

KHUNDMIRI, S.J.; ASGHAR, M.; KHAN, F.; SALIM, S.; YUSUFI, A.N. Effect of ischemia and reperfusion on enzymes of carbohydrate metabolism in rat kidney. **Journal of Nephrology**, v. 17, p. 377-83, 2004.

KIM, E.C.; M.I.M, J.; KIM, T.Y.; L.E.S, S.J.; YANG, H.O.; H.A.N, S.; KWON, Y.G. [6]-gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 335, p. 300-8, 2005.

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. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, e. 4, p. 651-6, 2009.

KOCA, U.; OLGUNER, Ç. G.; ERGÜR, B U.; ALTEKIN, E.; TAGDÖLEN, A.; DURU, S.; GIRGIN, P.; GÜNDÜZ, K.; CILAKERMJCJLJ, S.; GÜZELDAL, S.; AKKU, M. The Effects of Dexmedetomidine on Secondary Acute Lung and Kidney Injuries in the Rat Model of Intra-Abdominal Sepsis. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

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, A.; SINGH, N.P. Antimicrobial dosing in critically ill patients with sepsis-induced acute kidney injury. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v.19, p.99-108, 2015.

KUTRY, M.S. Ginger and Honeybee Modulates MTX-induced Oxidative Stress in Kidney of Rats. **European Journal of Medicinal Plants**, 5, p. 53-65, 2015.

LAMEIRE, N. H.; BAGGA, N.; CRUZ, D.; MAESENEER, J.; ENDRE, Z.; KELLUM, J.A., LIU, K.D.L.; MEHTA, R.L.; PANNU, N. Acute kidney injury: an increasing global concern. **The Lancet**, v. 6736, p.1-10, 2013.

LANTZ, R. C.; CHENA, G. J. ; SARIHANA, M.; SOLYOMB, M.; JOLADB, S. D.;

LEE, H. T.; EMALA, C. W.; JOO, J. D.; KIM, M. Isoflurane improves survival and protects against renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. **Shock**, v. 27, p. 373-379, 2007.

LAKSHMI, B. V. S.; SUDHAKAR, M. Protective effect of Zingiber Officinale on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **International journal of pharmacology**, p.1-5, 2010.

LEE, H. T.; KIM, M.; JOO, J. D.; GALLOS, G.; CHEN, J.; EMALA, C. W. A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, p. 959–969, 2006.

LEE, J. W.; Fluid and Electrolyte Disturbances in Critically Ill Patients. **Electrolyte Blood Press**, v. 8, p. 72-81, 2010.

LEE, S.; HSU, J.; LI, C.; CHEN, K.; LIU, C. Protective Effect of Leaf Essential Oil from Cinnamomum osmophloeum Kanehira on Endotoxin-Induced Intestinal Injury in Mice Associated with Suppressed Local Expression of Molecules in the Signaling Pathways of TLR4 and NLRP3. **Plos one**, v.10, p. 1-17, 2015.

LEELAHAVANICHKUL, A.; SOMPARN, P.; PANICH, T.; CHANCHAROENTHANA, W. Serum miRNA-122 in acute liver injury induced by kidney injury and sepsis in CD-1 mouse models. **Hepatology Research**; 45: 1341–135. 2015.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 2, p.1-14, 2003.

LÉON, K.; PICHAVANT-RAFINI, K.; OLLIVIER, H.; L'HER, E. Effect of Induced Mild Hypothermia on Acid-Base Balance During Experimental Acute Sepsis in Rats. **Therapeutic hypothermia and temperature management**, v. 5, p. 170-177, 2015.

LI, N.; XIE, H.; LI, L.; WANG, J.; FANG, M.; YANG, N.; LIN, H. Effects of Honokiol on Sepsis-Induced Acute Kidney Injury in an Experimental Model of Sepsis in Rats. **Inflammation**, v. 37, p. 1191-1199, 2014.

LI, P., LIAO S.T.; WANG, J.S.; ZHANG, Q.; XU, D.Q.; LV Y.; YANG, M.H.; KONG, L.Y. Protection by Huang-Lian-Jie-Du decoction and its constituent herbs of lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. **FEBS Open Bio**. v.11, p.221-236, 2017.

LI, P.; LI, S.; WANG, J.; XU, D.; ZHANG, Q.; YANG, M.; KONG, L. NMR metabolic profiling of lipopolysaccharide induced mice sepsis and the treatment effects of berberine. **RSC Advances**, v. 6, p. 47474–47485, 2016.

LI, X.H.; MCGRATH KC; 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 Clinic Pharmacol Toxicol**, v.110, p. 238-244, 2011.

- LI, Y.; TRAN V. H.; DUKE, C. C.; ROUFOGALIS, D. Preventive and Protective Properties of *Zingiber officinale* (Ginger) in Diabetes Mellitus, Diabetic complications, and Associated Lipid and Other Metabolic Disorders: A Brief Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012: p.1-10, 2012.
- LIANG, Q.; LIU, H.; XING, H.; JIANG, Y.; ZHANG, A. Urinary UPLC-MS metabolomics dissecting the underlying mechanisms of Huaxian capsule protects against sepsis. **RSC Advances**, v. 6, p. 40436–40441, 2016.
- LIANG, Q.; LIU, H.; ZHANG, T.; JIANG, Y.; XING, H.; ZHANG, A. Potential urine biomarkers from a high throughput metabolomics study of severe sepsis in a large Asian cohort. **RSC Advances**, v. 5, p. 102204–102209, 2015.
- LIANGOS, O.; TIGHIOUART, H.; PERIANAYAGAM, M.C.; KOLYADA, A.; HAN, K.K.; WALD, K.; BONVENTRE, J.V.; JABER, B.L. Comparative Analysis of Urinary Biomarkers for Early Detection of Acute Kidney Injury Following Cardiopulmonary Bypass. **Biomarkers**, v. 14, p. 423–431, 2009.
- LIMA, A. Ginger (*zingiber officinale roscoe*), bioactive properties And its possible effect on type 2 diabetes: a review study. **Revista Saúde em Foco**, v. 1, p. 15-25, 2014.
- LIN, Z. Y.; XU, P. B.; YAN, S. K.; MENG, H. B.; YANG, G. J.; DAI, W. X.; LIU, X. R.; LI, J. B.; DENG, X. M.; ZHANG, W. D. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by (1) H NMR and pattern recognition. **NMR Biomedicine**, v. 22, e. 6, p. 601-8, 2009.
- LIN, Z.; LIU, X.; SUN, L.; LI, J.; HU, Z.; XIE, H.; ZU, X.; DENG, X.; ZHANG, W. Comparison of sepsis rats induced by caecal ligation puncture or *Staphylococcus aureus* using a LC-QTOF-MS metabolomics approach. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 86-93, 2016.
- LINGARAJU, M. C.; PATHAK, N. N.; BEGUM, J.; BALAGANUR, V.; RAMACHANDRA, H. D.; BHAT, R. A.; RAM, M.; SINGH, V.; KANDASAMY, K.; KUMAR, D.; KUMAR, D.; TANDAN, S. K. Betulinic acid attenuates renal oxidative stress and inflammation in experimental model of murine polymicrobial sepsis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 12-21, 2015.
- LINTON, A. L.; WALKER, J. F.; LINDSAY, R. M.; SIBBALD, W. J. Acute renal failure and tubular damage due to sepsis in an animal model. **European Dialysis and Transplant Association**, v. 21, p. 837-842, 1984.
- LIU, W.; DONG, X.; SUN, Y.; LIU, Z. A novel fluid resuscitation protocol: provide more protection on acute kidney injury during septic shock in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.7, p. 919-926, 2014.
- LIU, X.; WANG, N.; WEI, G.; FAN, S.; LU Y.; ZHU, Y.; CHEN, Q.; HUANG, M.; ZHOU, H.; ZHENG, J. Consistency and pathophysiological characterization of a rat polymicrobial sepsis model via the improved cecal ligation and puncture surgery. **International Immunopharmacology**, v. 32, p. 66–75, 2016.
- LOWES, D.A.; WEBSTER, N.R.; MURPHY, M.P.; GALLEY, H.F. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial

function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v. 110, p. 472–80, 2013.

LUO, C.J.; ZHANG, F.J.; ZHANG, L.; GENG, Y.Q. Mesenchymal stem cells ameliorate sepsis-associated acute kidney injury in mice. **SHOCK**, v. 41, p. 123Y129, 2014

LUPP, C.; BAASNER, S.; INCE; NOCKEN, F.; STOVER, J.F.; WESTPHAL, M.; Differentiated control of deranged nitric oxide metabolism: a therapeutic option in sepsis? **Critical Care**, v.17, p.1-8, 2013.

MCDONOUGH, A.A. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. **American Journal of Physiology**, v. 298, p. 851–861, 2010.

MACIEL, A.T.; PARK, M.; MACEDO, E. Fractional excretion of potassium in the course of acute kidney injury in critically ill patients: potential monitoring tool? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**.v.26, p.143-147.2014.

MCDONOUGH, A.A. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.298, p.R851–R861, 2010.

MAGHSOUDI A, S.; GOL A, A.; DABIRI. S.; JAVADI, A. Preventive Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) Pretreatment on Renal Ischemia-Reperfusion in Rats. **Europerg Surgical Research**, v.10, p. 45-51, 2011.

MAIER, S.; TRAEGER, T.; ENTLEUTNER, M.; WESTERHOLT, A.; KLEIST, B.; HÜSER, N.; HOLZMANN, B.; STIER, A.; PFEFFER, K.; HEIDECHE, C. D. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock**, v. 21, p. 505-511, 2004.

MARSHALL, J.C. Why have clinical trials in sepsis failed?. **Trends Mol Med**, v. 20, n. 4, p.195-203, 2014

MARTENSSON, J.; BELLOMO R. Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. **Critical care clinics** v. 31, p. 649–660, 2015.

MATSUDA, A.; WANG, Z.; TAKAHASHI, S.; TOKUDA, T.; MIURA, N.; HASEGAWA, J. Upregulation of mRNA of retinoid binding protein and fatty acid binding protein by cholesterol enriched-diet and effect of Ginger on lipid metabolism. **Life sciences**, v. 84, p. 903- 907, 2009.

MAYR, F.B.; YENDE, S.; ANGUS, D.C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, p. 4–11, 2014.

MICKIEWICZ, B.; TAM, P.; JENNE, C.N.; LEGER, C.; WONG, J.; WINSTON, B.W.; DOIG, C.; KUBES, P.; VOGEL, H.J.; ALBERTA SEPSIS NETWORK. Integration of metabolic and inflammatory mediator profiles as a potential prognostic

approach for septic shock in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 15, n. 19, e.11, 2015.

MICKIEWICZ B1, DUGGAN GE, WINSTON BW, DOIG C, KUBES P, VOGEL HJ; ALBERTA SEPSIS NETWORK. Metabolic profiling of serum samples by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock. **Critical Care Medicine**, v.42, p.1140-9. 2014.

MISAWA, K.; HASHIZUME, K.; YAMAMOTO, M.; MINEGISHI, Y.; HASE, T.; SHIMOTOYODOM, A.; Ginger extract prevents high-fat diet-induced obesity in mice via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor δ pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 1058–1067, 2015.

MISHRA, R. K.; KUMAR, A.; KUMARET, A. Pharmacological Activity of Zingiber Officinale. International journal of pharmaceutical and chemical. **Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1073-1078, 2012.

MORERA, E.; PETROCELLIS.; D.; MORERA, L.; A, MORIELLO, A.S.; NALLI, L.I.; MARZOC, D.I. V.; ORTAR, G. Synthesis and biological evaluation of [6]-gingerol analogues as transient receptor potential channel TRPV1 and TRPA1 modulators. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, p. 1674-7, 2012.

MORRIS, M.C.; GILLIAM, E.A.; LI, L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. **Frontiers in Immunology**. v. 6, p. 1-8, 2015.

NADERI, Z.; MOZAFFARI-KHOSRAVI, H.; DEHGHAN, A.; NADJARZADEH, A.; HUSEINI, H.F. Effect of ginger powder supplementation on nitric oxide and C-reactive protein in elderly knee osteoarthritis patients: A 12-week double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p.1-5, 2015.

NAGOSHI, C.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KARIYAMA, R.; TSUCHIYAS, T. Synergistic effect of [10]-gingerol and aminoglycosides against vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, p. 443-7, 2006.

NAKAGAWA, N. K.; JUKEMURA, J.; AIKAWA, P.; NOGUEIRA, R. A.; POLI-DE-FIGUEIREDO, F. L.; SANNOMIYA, P. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control. **Clinics**. v. 63, p. 321-326, 2007.

NANKIVELL, B. J. Creatinine clearance and the assessment of renal function. **Australian Prescriber**, v. 24, p. 1-17, 2001.

NAORA, K.; DING, G.; HAYASHIBARA, M.; KATAGIRI, Y.; KANO, Y.; IWAMOTO, K. Pharmacokinetics of [6]-gingerol after intravenous administration in rats with acute renal or hepatic failure. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p.1295–1298, 1992.

NASRI, H.; NEMATBAKHS, M. Preventive and Curative Effects of Ginger Extract Against Histopathologic Changes of Gentamicin-Induced Tubular Toxicity in Rats.

Journal of Preventive, v. 4, p.315-321, 2012.

NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E. The Pathophysiology of Septic Shock. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 23, p. 41-66, 2011.

NEJAT, M.; PICKERING, J. W.; DEVARAJAN, P.; BONVENTRE, J. V.; EDELSTEIN, C. L.; WALKER, R. J.; ENDRE, Z. H. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. **Kidney International**, v. 81, p. 1254-1262, 2012.

NUNES, T. F.; BRUNETTA, D. M.; LEAL, C.M; PISI, P.C.B.; RORIZ-FILHO, J.S.; BRUNETTA, D.M; LEAL, C.M; PISI, P.C.B.; RORIZ-FILHO, J.S. Insuficiência renal aguda. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.43, p. 272-82, 2010.

OJEWOLE, J. A. O. Analgesic, Antiinflammatory and Hypoglycaemic Effects of Ethanol Extract of *Zingiber officinale* (Roscoe) Rhizomes (Zingiberaceae) in Mice and Rats. **Phytotherapy research**, v. 772, p. 764-772, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-8, 1979.

OSAMA, A.; FATMA, A.; MOHAMED, E.; HUDA, S. Studies on the protective effects of ginger extract and in combination with ascorbic acid against aluminum toxicity induced hematological disorders, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. **Annals of veterinary and animal science**, p.137-150, 2014.

OSUCHOWSKI, M. F.; WELCH, K.; YANG, H.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Chronic Sepsis Mortality Characterized by an Individualized Inflammatory Response. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 623-630, 2007.

OTSUKI, S.; QIAN, W.; ISHIHARA, A.; KABE, T. Elucidation of dimethylsulfone metabolism in rat using a ³⁵S radioisotope tracer method. **Nutrition Research**, v. 22, p. 313–322, 2002.

PAKULA, A.; RUBY A.; SKINNER, FACS. Acute Kidney Injury in the Critically Ill Patient: A Current Review of the Literature. **Journal of Intensive Care Medicine**. 2015, , p.1-6, 2015.

PALHARIN, L. H.; FIGUEIREDO NETO, Di C.; CAMARGO, L. M. P.; BOSQUÊ, G. G. estudo sobre gengibre na medicina popular. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.14, 2008.

PARK, M.; BAE, J.; LEE, D. Antibacterial Activity of [10]-gingerol and [12]-Gingerol isolated from Ginger Rhizome Against Periodontal Bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 22 p. 1446–1449, 2008.

PATHAK, E.; MAYEUX, P.R. In Vitro Model of Sepsis-Induced Renal Epithelial Reactive Nitrogen Species Generation. **Toxicological sciences**, v. 115, p. 475–481, 2010.

PASKALOGLU, K.; SENER, G.; KAPUCU, C.; AYANOGLU-DÜLGER, G. Melatonin treatment protects against sepsis-induced functional and Biochemical changes in rat ileum and urinary bladder. **Life Sciences**, v. 74, p. 1093–1104, 2004.

PATIL, N. K.; PARAJULI, N.; MACMILLAN-CROW, L. A.; MAYEUX, P. R. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese Superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant Mitigates injury. **American Journal of Physiol Renal Physiol**, v. 306, p. 734-743, 2014.

PEDRO, T.C.S.; MORCILLO, A.M.; BARACA, E.C.E. Etiologia e fatores prognósticos da sepse em crianças e adolescentes admitidos em terapia intensiva. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v.27, p. 240-246 2015.

PERANDIN, D.; MAIOLI, M. A.; SANTOS, P. R. S.; PEREIRA, F. T. V.; MINGATTO, F. E. Proteção do dano oxidativo hepático induzido por ferro pelo extrato aquoso da planta *Plectranthus barbatus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 9-17, 2015.

PICKERING, J. W.; FRAMPTON, C. M.; WALKER, R. J.; SHAW, G. M.; ENDRE, Z. H. Four hour creatinine clearance is better than plasma creatinine for monitoring renal function in critically ill patients. **Critical Care**, v. 16, p. 1-12, 2012.

POLAT, A.; PARLAKPINARB, H.; TASDEMIRB, S.; COLAKC, C.; VARDID, N.; UCARD, M.; EMREA, M.H. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. **Acta histochemica**, v. 108, p. 365-371, 2006.

PORTELLA, V.G. Desenvolvimento da insuficiência renal promovida pela sepse induzida pelo modelo clp (cecal ligation and puncture): avaliação morfológica e de parâmetros renais e inflamatórios. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte. 2009.

PORTELLA, V. G.; SILVA-FILHO, J. L.; LANDGRAF, S. S.; DE RICO, T. B.; VIEIRA, M. A.; TAKIYA, C. M.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G.; CANETTI, C.; PINHEIRO, A. A.; BENJAMIM, C. F.; CARUSO-NEVES, C. Sepsis-surviving mice are more susceptible to a secondary kidney insult. **Critical Care Medicine**, v. 41, p. 1056-1068, 2013.

PUNEET, P.; YAP, C.T.; WONG, L.; YULIN, L.; KOH, D.R.; MOOCHHALA, S.; PFEILSCHIFTER, J.; HUWILER, A.; MELENDEZ, A.J. SphK1 Regulates Proinflammatory Responses Associated with Endotoxin and Polymicrobial Sepsis. **Science**, v. 328, p. 1290-1294, 2010.

RAMADAN, G.; EL-MENSHAWY, O. Protective effects of Ginger turmeric rhizomes mixture on joint inflammation, atherogenesis, kidney dysfunction and other complications in a rat model of human rheumatoid arthritis. **International journal of rheumatic**, v.16, p.219-29, 2013.

RAMESH, G.; RANGANATHAN, P. Mouse Models and Methods for Studying Human Disease, Acute Kidney Injury (AKI). **Methods in Molecular Biology**, v. 1194, p. 421-436, 2014.

RANZANI, O. T.; MONTEIRO, M. B.; FERREIRA, E. M.; SANTOS, S. R.; MACHADO, F. R.; NORITOMI, D. T. Reclasificando o espectro de pacientes sépticos com o uso do lactato: sepse grave, choque crítico, choque vasoplégico e choque disóxico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, p. 270-278, 2013.

REWA, O.; BAGSHAW, S.M. Acute kidney injury—epidemiology, outcomes and economics. **Nature reviews- nephrology**. v. 10, p.193-207, 2014.

ROGERS, A.J.; MCGEACHIE, M.; BARON, R.M.; GAZOURIAN, L.; HASPEL, J.A.; NAKAHIRA, K.; FREDENBURGH, L.E.; HUNNINGHAKE, G.M.; RABY, B.A.; MATTHAY, M.A.; OTERO, R.M.; FOWLER, V.G.; RIVERS, E.P.; WOODS, C.W.; KINGSMORE, S.; LANGLEY, R.J.; CHOI, A.M. Metabolomic derangements are associated with mortality in critically ill adult patients. **PLoS One**, v. 30, n. 9, e. 1, 2014.

RODRIGUES, C. E.; SANCHES, T. R.; VOLPINI, R. A.; MARIA H. M. SHIMIZU, M. H. M.; KURIKI, P. S.; CAMARA, N. O. S.; SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. Effects of Continuous Erythropoietin Receptor Activator in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury and Multi-Organ Dysfunction. **Plos One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

RODRIGUES, F.A.P. Efeitos da fração zoeb4 contendo o [6]-, [8]- e [10]-gingerol isolados do gengibre (*Zingiber officinale roscoe*) na nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará-UFC., Fortaleza, CE, 2013.

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, W. F.; MIGUEL, C. B.; NAPIMOGA, M. H.; OLIVEIRA, C. J. F.; LAZO-CHICA, J. E. Establishing Standards for Studying Renal Function in Mice through Measurements of Body Size-Adjusted Creatinine and Urea Levels. **Bio Med Research International**. v. 2014, p. 1-8, 2014.

SALES- JÚNIOR, J. A. L. S.; DAVID, C. M.; HATUM, R.; SOUZA, P. C. S. P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C. T. S.; FRIEDMAN, G.; DA SILVA, O. B.; DIAS, M. A.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; LUIZ, R. R. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. RBTI - **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, p. 9-17, 2006.

SANTOS, F.N.; WATANABE, M.; VASCO3, C.F.; FONSECA, C.D.; VATTIMO, M.F.F. Antioxidant protection of statins in acute kidney injury induced by Sepsis. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 48, p.820-6, 2014.

SARIC, J.; LI, J.V.; SWANN, J.R.; UTZINGER, J.; CALVERT, G.; NICHOLSON, J.K.; DIRNHOFER, S.; DALLMAN, M.J.; BICTASH, M.; HOLMES E. Integrated cytokine and metabolic analysis of pathological responses to parasite exposure in rodents. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 9, e. 5, p. 2255-64, 2010.

SARKAR, P.; MAHMUD, A. K.; MAHMUD, K. GINGEROL MIGHT BE A SWORD TO DEFEAT COLON CANCER. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2. p. 816-827, 2011.

SAVVA, A.; ROGER, T. Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-16, 2013.

SCHMERLER, D.; NEUGEBAUER, S.; LUDEWIG, K.; BREMER-STRECK, S.; BRUNKHORST, F. M.; KIEHNTOPF, M. Targeted metabolomics for discrimination of systemic inflammatory disorders in critically ill patients. **The Journal of Lipid Research**, v. 53, e. 7, p. 1369-75, 2012.

SCHMIDT, C.; HÖCHERL, K.; SCHWEDA, F.; BUCHER. Proinflammatory cytokines cause down-regulation of renal chloride entry pathways during sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 35, p. 2110-2119, 2007.

SCHRIER, R. W.; POOLE, W.W.B.; MITRASCIENCE, A. Acute renal failure : definitions , diagnosis, pathogenesis , and therapy. **Science in medicine**, v. 114, n. 1, p. 5-14, 2004.

SCHWERTNER, H.A.; RIOS, H.R. High-performance liquid chromatographic analysis of 6-Gingerol, 8-Gingerol, 10-Gingerol, and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas, and beverages. **Journal of Chromatography B**, v.856, p. 41-47, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, 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.

SEELY, K. A.; HOLTHOFF, J. H.; BURNS, S. T.; WANG, Z.; THAKALI, K. M.; GOKDEN, N.; RHEE, S. W.; MAYEUX, P. R. Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury. **American Journal of Physiol Renal Physiol.** v. 301, p. 209-217, 2011.

SEIJA, M.; BACCINO, C.; NIN, N.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C.; GRANADOS, R.; FERRUELO, A.; MARTÍNEZ-CARO, L. RUÍZ-CABELLO, J.; PAULA, M.; NOBOA, O.; ESTEBAN, A.; LORENTE, J. A. Role of peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury In an experimental model of sepsis in rats. **Shock**, v. 38, p. 403-410, 2012.

SHANG, Y.; SIOW, Y.L.; ISAAK, C.K. Downregulation of Glutathione Biosynthesis Contributes to Oxidative Stress and Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2016: p. 1-13, 2016

SHUM, H.P.; YAN, W.W.; CHAN, T.M. Recent knowledge on the pathophysiology of septic acute kidney injury: A narrative review. **Journal of Critical Care**, v.31,p;82–89, 2016.

SENER, G.; TOKLU, H.; KAPUCU, C.; ERCAN, F.; ERKANLI, G.; KAÇMAZ, A.; TILKI, M.; YEGEN, B. Ç. Melatonin Protects Against Oxidative Organ Injury in A Rat Model of Sepsis. **Surg Today**, v.35, p.52–59, 2005.

SERKOVA, N.J., STANDIFORD, T.J.; STRINGER, K.A. The emerging field of quantitative blood metabolomics for biomarker discovery in critical illnesses. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.15;184, p.647-55, 2011.

SHANMUGAM, K.R.; RAMAKRISHNA, C.H.; MALLIKARJUNA, K.; REDDY, K.S. Protective effect of ginger against alcohol-induced renal damage and antioxidant enzymes in male albino rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.48, p.143-9, 2010.

SHARFUDDIN, A.A.; MOLITORIS, B.A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, p. 189–200, 2011

SHARMA, D.; SANGHA, G. K. Triazophos induced oxidative stress and histomorphological changes in liver and kidney of female albino rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 110, p.71–80, 2014.

SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. **Food and chemical toxicology**, v. 45, p. 683-90, 2007.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. **Mediators Inflammation**. v.2013: p.165974, 2013

SILVA NETO, A.G. Estudo dos efeitos vasculares e renais causados pelo 6-Gingerol isolado do gengibre. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará (UFC), 2012.

SINGH, P. A.; MUTHURAMAN, A.; JAGGI, A. S.; SINGH, N.; GROVER, K.; DHAWAN, R. Animal models of acute renal failure. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 31-44, 2012.

SINGH, S.; BHARDAWAJ, A.; SHUKLA, R.; JHADAV, T.; SHARMA, A.; BASANNAR, D. The handheld blood lactate analyser versus the blood gas based analyser for measurement of serum lactate and its prognostic significance in severe sepsis. **Med J Armed Forces India**, v. 72, n. 4, p. 325-331, 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L.; VITORINO, R. R.; PEREZ, M. C. A.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. DE A.; GELLER, M. Sepsis: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 207-216, 2011.

SIROTA, J. C.; KLAWITTER, J.; EDELSTEIN, C. L. Biomarkers of Acute Kidney Injury. **Journal of Toxicology**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

SORIANO, F. G.; LORIGADOS, C. B.; PACHER, P.; SZABÓ, C. Effects of a potent peroxynitrite decomposition catalyst in murine models of endotoxemia and sepsis. **Shock**, v. 35, p. 560-566, 2011.

SOUZA, A. C. Ação protetora da eritropoietina na injúria renal aguda em modelo experimental de sepse. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, SP, 2010.

SOUZA, A. C. P.; VOLPINI, R. A.; MARIA HELOÍSA SHIMIZU, M. H.; SANCHES, T. R.; CAMARA, N. O. S.; SEMEDO, P.; RODRIGUES, C. E.; SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- κ B and up regulating endothelial nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 302, p. 1045-1054, 2012.

SOUZA, V. C. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Baseado em APG II / Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

SPILLER, F.; COSTA, C.; SOUTO, F. O.; VINCHI, F.; MESTRINER, F. L.; LAURE, H. J.; ALVES-FILHO, J. C.; FREITAS, A.; ROSA, J. C.; FERREIRA, S. H.; ALTRUDA, F.; HIRSCH, E.; GREENE, L. J.; TOLOSANO, E.; CUNHA, F. Q. Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, p. 922-931, 2011.

SU, L.; LI, H.; XIE, A.; LIU, D.; RAO, W.; LAN, L.; LI, X.; LI, F.; XIAO, K.; WANG, H.; YAN, P.; LI, X.; XIE, L. Dynamic changes in amino acid concentration profiles in patients with sepsis. **PLoS One**, v. 7, n. 10, e. 4, 2015

TABIBI, H.; IMANI, H.; ATABAK, S.; NAJAFI, I.; HEDAYATI, M.; RAHMANI, L.; Effects of ginger on serum lipids and lipoproteins in peritoneal dialysis patients: a randomized controlled trial. **Peritoneal Dialysis International**, 2015.

TANER, G.; AYDM, S.; BACANLI, M.; SARIGÖL, Z.; ŞAHİN, T.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN N. Modulating Effects of Pycnogenol® on Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Sepsis in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 1692-1700, 2014.

TORRES-DUEÑAS, D.; CELES, M.R.; FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SPILLER, F.; DAL-SECCO, D.; CUNHA, F.Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.152, p. 341–352, (2007).

TSALIK, E.L.; WILLIG, L.K.; RICE, B.J.; VAN VELKINBURGH, J.C.; MOHNEY, R.P.; MCDUNN, J.E.; DINWIDDIE, D.L5.; MILLER, N.A.; MAYER, E.S.; GLICKMAN, S.W.; JAEHNE, A.K.; GLEW, R.H.; SOPORI, M.L.; OTERO, R.M.; HARROD, K.S.; CAIRNS, C.B.; FOWLER, V.G.; RIVERS, E.P.; WOODS, C.W.;

KINGSMORE, S.F.; LANGLEY, R.J. Renal systems biology of patients with systemic inflammatory response syndrome. **Kidney International**, v. 88, n. 4, p. 804-14, 2015.

TIMMERMANN, B.N. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 14, p. 123-8, 2007.

TRIPATHI, S.; BRUCH, D.; KITTUR, D. S. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 8, p.1-7. 2008.

TRIPATHI, S.; MAIER, K. G.; BRUCH, D.; KITTUR, S. D. Effect of 6-Gingerol on Pro-Inflammatory Cytokine Production and Costimulatory Molecule Expression in Murine Peritoneal Macrophages 1. **Journal of Surgical Research**, v. 213, p. 209-213, 2007.

TU, Y.; WANG H, SUN, R.; NI, Y.; MA, L, X.V. F.; HU, X, JIANG, L.; WU, A.; CHEN, X.; CHEN, M.; LIU, J.; HAN, F. Urinary netrin-1 and KIM-1 as early biomarkers for septic acute kidney injury. **Renal Failure**. v.36, p.1559-63, 2014.

TZENG, T.F.; LIOU, S.S.; CHANG, C.J.; LIU, I.M. [6]-gingerol dampens hepatic steatosis and inflammation in experimental nonalcoholic steatohepatitis. **Phytomedicine**, v. 15, p.:452-61. 2015.

UEKI, S MIYOSHI, M.; SHIDO, O.; HASEGAWA, J.; WATANABE, T. Systemic administration of [6]-gingerol, a pungent constituent of ginger, induces hypothermia in rats via an inhibitory effect on metabolic rate. **European Journal of Pharmacology**, v. 584, p. 87–92, 2008.

UMBRO, I.; GENTILE, G. TINTI, F.; MUIESAN, P.; MITTERHOFER, A. Recent advances in pathophysiology and biomarkers of sepsis-induced acute kidney injury. **Journal of Infection**. v.72, p.131-142, 2016.

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.

VÁZQUEZ, A.L.; GIL, C.L.; REGIDO, A.L. New therapeutic alternatives for severe sepsis in the critical patient. A review. **Medicine Intensiva**, v. 35 p.236–24, 2011.

VINCENT, J.L.; SAKR, Y.; SPRUNG, C.L.; RANIERI, V.M; REINHART, K.; GERLACH, H.; MORENO, R.; CARLET, J.; GALL, J.L.; PAYEN, D. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 344-353, 2006.

WALKER, P.D.; SHAH S.V. Reactive oxygen metabolites in endotoxin-induced acute renal failure in rats. **Kidney International**, v.38, p.1125-1132. 1990.

WANG, E.H.; NATHAN, M.S.; SHAPIRO, M.P.H.; GRIFFIN, R.; SAFFORD, M.D.; JUDD, S.; HOWARD, G. Inflammatory and endothelial activation biomarkers and risk

of sepsis: A nested case-control study. **Journal of Critical Care**, v. 28, p. 549–555, 2013.

WANG, H.; LIAO, H.; OCHANI, M.; JUSTINIANI, M.; LIN, X.; YANG, L.; AL-ABED, Y.; WANG, H.; METZ, C.; MILLER, E. J.; TRACEY, K. J.; ULLOA, L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve Survival in experimental sepsis. **Nature Medicine**, v. 10, p. 1216-1221, 2004.

WANG, P.; HUANG, J.; LI, Y.; CHANG, R.; WU, H.; LIN, J.; HUANG, Z. Exogenous Carbon Monoxide Decreases Sepsis-Induced Acute Kidney Injury and Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 20595-20608, 2015.

WANG, W.; BANSAL, S.; FALK, S.; LJUBANOVIC, D.; SCHRIER, R. Ghrelin protects mice against endotoxemia-induced acute kidney injury. **American Journal of Physiol Renal Physiol**, v. 297, p. 1032–1037, 2009.

WEI, Y.; GAO, N.; ZHANG, Z.; ZU, X.; HU, Z.; ZHANG, W.; YIN, J.; LIU, X. Metabolic changes at the early stage of sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats and the interventional effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**. v.1026: p.176-82. 2016

WHELAN, S.P.; CARCHMAN, E.H.; KAUTZA, B.; NASSOUR, I.; MOLLEN, K.; ESCOBAR, D.; GOMEZ, H.; ROSENGART, M.A.; SHIVA, S.; ZUCKERBRAUN, B.S. Polymicrobial sepsis is associated with decreased hepatic oxidative phosphorylation and an altered metabolic profile. **Journal of Surgical Research**. v.186, p.297-303, 2014.

WHITE, L. E.; CHAUDHARY, R.; MOORE, L. J.; MOORE, F. A.; HASSOUN, H. T. Surgical Sepsis and Organ Crosstalk: The Role of the Kidney. **Journal of Surgical Research**, v. 167, p. 306-315, 2011.

WILLIAMS, K.I.; BURSTEIN, S.H.; LAYNE, D.S. Metabolism of dimethyl sulfide, dimethyl sulfoxide, and dimethyl sulfone in the rabbit. **Arch Biochem Biophys**, v. 117, n. 1, p. 84-7, 1966.

WILSON, J.; HIGGINS, D.; HUTTING, H.; SERKOVA, N.; BAIRD, C.; KHAILOVA, L.; QUEENSLAND, K.; VU TRAN, Z.; WEITZEL, L.; WISCHMEYER, P.E. Early propranolol treatment induces lung heme-oxygenase-1, attenuates metabolic dysfunction, and improves survival following experimental sepsis. **Crit Care**, v. 10: p.17e 5, 2013.

WU, L.; GOKDEN, N.; MAYEUX, P. R. Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, p. 1807–1815, 2007.

WU, R.; DONG, W.; ZHOU, M.; ZHANG, F.; MARINI, C. P.; RAVIKUMAR, T. S.; WANG, P. Ghrelin Attenuates Sepsis-induced Acute Lung Injury and Mortality in Rats.

American journal of respiratory and critical care medicine, v. 176, p. 805-813, 2007.

XU, C.; CHANG, A.; HACK, B. K.; EADON, M. T.; ALPER, S. L.; CUNNINGHAM, P. TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. N. **Kidney International**, v. 85, p. 72–81, 2013.

XU, H.; STEINBERG, H.; LIU, S.F. Selective blockade of endothelial NF-kappaB pathway differentially affects systemic inflammation and multiple organ dysfunction and injury in septic mice. **Journal of Pathology**, v.220: p. 490–498, 2010.

XU, J, ZHANG, X.; MONESTIER, M.; ESMON, N.L.; ESMON, C.T.Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. **The Journal of Immunology**. v.187: p. 2626-31, 2011.

XU, J.; ZHANG, X.; PELAYO, P. MONESTIER, M. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. **Nature Medicine**, 15, 1318 – 1321, 2009.

YANG, M.; LIU, C.; JIANG, J.; ZUO, G. Ginger extract diminishes chronic fructose consumption-induced kidney injury through suppression of renal overexpression of proinflammatory cytokines in rats. **BMC Complementary Alternative Medicine**. v.27: p.14:174, 2014.

YANO, Y.; RODRÍGUES, A. C. JR.; DE BRAGANÇA, A. C.; ANDRADE, L. C.; MAGALDI, A. J. PKC stimulated by glucagon decreases UT-A1 urea transporter expression in rat IMCD. **Pflügers Archiv: European journal of physiology**, v. 456, p. 1229-1237, 2008.

YAO, L.; LIU,Z.; ZHU, J.; LI, B.; CHAI, C.; TIAN, Y. Clinical evaluation of circulating microRNA-25 level change in sepsis and its potential relationship with oxidative stress. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, p.7675–7684, 2015.

YASUDA, H.; LEELAHAVANICHKUL, A.; TSUNODA, S.; DEAR, J. W.; TAKAHASHI, Y.; ITO, S.; HU, X.; ZHOU, H.; DOI, K.; CHILDS, R.; KLINMAN, D. M.; YUEN, P. S. T.; STAR, R. A. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced Acute kidney injury. **American Journal of Physiol Renal Physiol**, v. 294, p. 1050–1058, 2008.

YASUDA, H.; YUEN, P. S. T.; HU, X.; ZHOU, H.; STAR, R. A. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. **Kidney International**, v. 69, p. 1535–1542, 2006.

YILDIRIM, Y.; CELLAD, E.G.; KARA, A.V.; YILMAZ, Z. Effect of Intraperitoneal Etanercept on Oxidative Stress in Rats with Peritonitis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2016, p.9418468, 2016.

YOUSIF, Y.; BILTO, ALABDALLAT, N.G. Ex vivo and In vivo Antioxidant Related Effects of Zingiber officinale Roscoe (Ginger) Extracts in Humans. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 7, p. 99-108, 2015.

YUN, N.; LEE, C.; LEE, S. Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p.1341–1348, 2009.

ZARBOCK, A.; GOMEZ, H.; KELLUM, J.A. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Current Opinion in Critical Care*, v.20: p.588-95, 2014.

ZAKY, A.; DEEM, S.; BENDJELID, K.; TREGGIARI, M.M. characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge. **Shock**, v. 41, p. 12-24, 2014.

ZANON, F.; CAOVILO, J. J.; MICHEL, R. S.; CABEDA, E. V.; CERETTA, D. F.; LUCKEMEYER, G. D.; BELTRAME, C.; POSENATTO, N. Sepsis na Unidade de Terapia Intensiva: Etiologias, Fatores Prognósticos e Mortalidade. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, p. 128-134, 2008.

ZARJOU, A.; AGARWAL, A. Sepsis and Acute Kidney Injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, p. 999–1006, 2011.

ZHANG, J.; WU, Q.; SONG, S.; WAN, Y.; ZHANG, R.; TAI, M.; LIU, C. Effect of hydrogen-rich water on acute peritonitis of rat models. **International Immunopharmacology**, v. 21, p. 94–101, 2014.

ZHAO, H.; ZHAO, M.; WANG, Y.; LI, F.; ZHANG, Z. Glycyrrhizic acid attenuates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B signaling pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p.1-12, 2015.

ZENG, G.F.; ZONG, S.H.; ZHANG, Z.Y.; FU, S.W.; LI, K.K.; FANG, Y.; LU, L.; XIAO, D.Q. The Role of 6-Gingerol on Inhibiting Amyloid β Protein-Induced Apoptosis in PC12 Cells. **Rejuvenation Research**, v.1, p.413-21, 2015.

ZHOU, H.; DENG, Y.; XIE, Q. The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, p. 301-5, 2006.

ZICK, S. M.; DUJURIC, Z. Pharmacokinetics of [6]-gingerol, [8]-Gingerol, [10]-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 17, p. 1930-6, 2008.

Anexos

Anexo A- Declaração de aprovação pela comissão de ética e pesquisa animal da universidade Federal do Ceará.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº45/14 , sobre o projeto intitulado: “Análise dos efeitos farmacológicos dos compostos (6) e (10) gengibre isolados do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no dano renal induzido pelo modelo polimicróbiano de sepse em ratos ”, de responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 16 de maio de 2014

Fortaleza, 22 de abril de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA


UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734