



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

FRANCISCO ADELVANE DE PAULO RODRIGUES

**EFEITOS DA FRAÇÃO ZOEB4 CONTENDO O [6]-, [8]- E [10]-GINGEROL
ISOLADOS DO GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe) NA NEFROTOXICIDADE
INDUZIDA POR GENTAMICINA EM RATOS**

**FORTALEZA-CE
2013**

FRANCISCO ADELVANE DE PAULO RODRIGUES

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

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

**FORTALEZA-CE
2013**

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

R613e Rodrigues, Francisco Advane de Paulo.

Efeitos da fração zoeb4 contendo o [6]-, [8]- e [10]-gingerol isolados do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) na nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos. / Francisco Advane de Paulo Rodrigues. – 2013.

109 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

1. Antioxidante. 2. Estresse Oxidativo. 3. Toxicidade. I. Título.

CDD 615.321

FRANCISCO ADELVANE DE PAULO RODRIGUES

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

Aprovada em: ____/____/____/

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^o. Dr. Alexandre Braga Libório
Universidade Federal do Ceará-(UFC)

Prof^o. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará-(UECE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pelos dons, pelas oportunidades e por iluminar meus caninhos na busca dos meus projetos e ideais de vida.

A minha família, em especial a minha mãe, Da. **Maria**, pelo exemplo de vida que representa para mim.

Ao Prof^o. Dr. **Alexandre Havt Bindá**, pela oportunidade de orientação, pelo apoio constante, paciência e dedicação. Expresso minha admiração pelo exemplo de profissional e de pessoa. Obrigado!

À **Prof^a Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, coordenadora do LFAFVET (Laboratório de Toxinas Venenos e Lectinas), pelo acolhimento e pelos momentos de aprendizagem compartilhados.

Ao **Prof^o. Dr. Jame's Almada da Silva**, que gentilmente nos cedeu a fração isolada e que muito colaborou para a realização deste estudo.

Aos professores, **Prof^o. Dr. Alexandre Braga Libório** e **Prof^o. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, por terem gentilmente aceito o convite para participar da Banca Examinadora desta dissertação.

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^a. Dra. Danielle Macêdo**, **Prof^o. Dr. Manasses Claudino Fonteles**, **Prof^a. Dra. Francisca Clea de Sousa** pelos conhecimentos transmitidos e dedicação permanente aos alunos e ao programa de pós-graduação.

A minha amiga **Iris**, pela amizade, por compartilhar alguns momentos e pela ajuda nos experimentos.

Aos laboratórios LDI (Laboratório de Doenças Infecciosas), 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.

Ao patologista Prof^o. Msc **Daniel de Araújo Viana** pela colaboração no estudo histopatológico.

Aos amigos do LAFAVET, **Daniel, Neto, Claudênio, Roberta, Rafael Jorge, Pedro, João Vitor, Aline, João Alison, Socorro**, pelo apoio durante esse período de mestrado.

A minha amiga **Natacha**, parceira de dosagens bioquímicas, pelos momentos de incentivo . Obrigado!

Aos meus amigos **Rafael Ximenes** e **Lenise**, pela convivência e por compartilhar conhecimento e as dificuldades do inicio do mestrado.

Aos meus amigos do LDI, **Vinicios** e, principalmente a **Rosa Marques** e **Mara Prata** pela colaboração durante os experimentos de PCR. Obrigado “irmãos”!

Aos amigos da pós-graduação, **Stefanio, Marcos Felipe, Gdayllon, Venucia, Grayce, Issabele**, pela amizade e pelos momentos de cooperação.

Aos estudantes de iniciação científica, **Marco, Marina, Katharine, Mariana, Nickolas, Leticia, Yuri e Bruno Cidade** pela dedicação e apoio durante os experimentos. Obrigado!

Aos técnicos e funcionários do IBMED(Instituto de Biomedicina), **Silvia, Teresinha, José, Vandinha** pela companhia constante, alegre no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, **Aura e Márcia**, pela dedicação ao trabalho.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

“Deus criou o infinito pra vida ser sempre mais...”(Cecília Vaz Castilho).

RESUMO

A Gentamicina (GM) é um aminoglicosídeo amplamente utilizado contra infecções por microrganismos gram-negativos. Lesão renal aguda (LRA) é a principal limitação para a sua eficácia terapêutica, ocorrendo em 10-20% dos pacientes. O evento capital é produção de espécies de reativa de oxigênio (EROs) e alteração na dinâmica intra-renal e glomerular. O gengibre é fonte de substâncias bioativas que podem ter efeito satisfatório na renoproteção por ação antioxidante. A fração ZOEB4 é enriquecida com os compostos com [6]-, [8]- e [10]-gingerol, isolada a partir do extrato do *Zingiber officinale* Roscoe, parece ser promissora diante desta nefrotoxicidade, podendo auxiliar o rim na resposta antioxidante endógena, diminuindo o dano oxidativo e atenuando a resposta pró-inflamatória. O presente estudo visou investigar os possíveis efeitos protetores da fração ZOEB4 em um quadro de LRA pela administração de GM 100 mg/kg i.p. em 7 dias consecutivos. Foram utilizados ratos Wistar, adultos machos, divididos em 6 grupos. Os grupos controles foram induzidos com NaCl 0,9% por 7 dias e tratados oralmente com tween-80 2%, ou com a fração ZOEB4 25 mg/kg; grupos induzidos a nefrotoxicidade com GM 100mg/kg por 7 dias acrescido do tratamento oral com a fração ZOEB4(6,25, 12,5 ou 25mg/kg) ou com tween 80 2%. O tratamento oral ocorreu durante 5 dias a partir do 5º dia de indução. Ao término de cada tratamento foram coletados plasma, urina e rins para as análises. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos indicativos de função renal, função tubular, perfil oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes, a transcrição gênica de mediadores pró-inflamatórios através da reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR), além da análise histopatológica. A GM alterou consideravelmente quase que todos os parâmetros investigados: Clcr ($0,7 \pm 0,1$ mL/min), ureia ($73,1 \pm 7,5$ mg/dL) proteína urinária ($93,5 \pm 9,2$ mg/dL), FENa ($3,3 \pm 0,5$ %) e FEK ($78,76 \pm 11,7$ %), MDA renal ($1,7 \pm 0,3$ nM/mg de prot.), GSH ($101,6 \pm 23,4$ µg/mg prot.), SOD ($52,47 \pm 7,7$ U/mg prot.) e TNF- α ($3,2 \pm 0,7$) estabelecendo assim, dano renal nos animais. O tratamento com a fração ZOEB4 na dose de 25mg/kg desencadeou proteção diante desta nefrotoxicidade, revertendo a diminuição do Clcr ($1,3 \pm 0,2$ mL/min), diminuindo os níveis sérico de ureia ($41,7 \pm 0,03$ mg/dL), de proteína urinária ($51,36 \pm 3,2$ mg/dL), da FENa ($1,82 \pm 0,21$ %) e FEK ($48,8 \pm 4,6$ %), MDA ($0,67 \pm 0,2$ nM/mg de prot.), além de aumentar os níveis de GSH ($250,2 \pm 27,7$ µg/mg prot.) e a atividade da SOD ($112,2 \pm 6,4$ U/mg prot.) e, inibição da transcrição de TNF- α ($1,5 \pm 0,2$). Desta forma, proporcionando proteção a função renal. Estes resultados, acrescentados aos relatos de estudos prévios realizados com os compostos desta planta, indicam um futuro promissor para a utilização dos gingeróis como um coadjuvante no tratamento diante de LRAs induzidas por aminoglicosídeos.

Palavras-chave: Antioxidante. Estresse oxidativo. *Gingerol*. Nefrotoxicidade.

ABSTRACT

Gentamicin (GM) is an aminoglycoside widely used against infections by Gram-negative microorganisms. Acute Renal Injury (ARI) is the main limitation to its therapeutic efficacy, occurring in 10-20% of patients. The capital event is the production of reactive oxygen species (ROS) and changes in the intrinsic-renal and glomerular dynamics. Ginger is sources of bioactive substances that may have satisfactory effects on renal protection by an antioxidant action. The ZOEB4 fraction enriched with the compounds [6]- [8]- and [10]-gingerol, was isolated from *Zingiber officinale* Roscoe hydroalcoholic extract. Therefore, their use is promising in relation to its use against nephrotoxicity, contributing to the clearance of the ROS and attenuating the pro-inflammatory response during the damage caused by aminoglycoside. The present study aimed to investigate, experimentally, the possible protective effects of ZOEB4 fraction a model of ARI by administering GM 100 mg/kg i.p. for 7 consecutive days. We used Wistar rats, adult males, divided into 6 groups. Control groups were induced with 0.9% NaCl by 7 days orally treated with tween-80 2% or with ZOEB4 fraction in dose 25 mg/kg; groups induced nephrotoxicity with GM 100mg/kg were treated orally for 7 days with tween-80 2% or ZOEB4 fraction (6.25, 12.5 or 25mg/kg). Oral treatment occurred by 5 days in the 5th day of induction. At the end of each group's treatment, we collected plasma, urine and kidneys for analysis. We evaluated biochemical parameters indicative of renal function; tubular function; oxidative profile MDA (malonaldehyde), antioxidant enzymes SOD and GSH; gene transcription of pro-inflammatory mediators by real time polymerase chain reaction (qPCR); and the histopathological analysis. GM reverted considerably almost all parameters investigated: CrCl ($0.7\pm 0,1$ ml/min), urea ($73,1\pm 7,5$ mg/dL) urinary protein ($93,5\pm 9,2$ mg/dL mg/dL) FENa ($3.3\pm 0.5\%$) and FEK ($78,76\pm 11,7\%$), MDA ($1,7\pm 0,3$ n nMg/mg prot.), GSH ($101,6\pm 23,41$ μ g/mg prot.), SOD ($52,47\pm 7,7$ U/mg prot) and TNF- α (3.23 ± 0.7) related to renal injury in animals. The fraction ZOEB4 at a dose of 25 mg/kg was able to improve the damage caused by the used drug: reversing the decline in do CrCl ($1,3\pm 0,2$ mL/min), by lowering levels of serum urea ($41,7\pm 0,03$ mg/dL) urinary protein ($51,36 \pm 3,2$ mg/dL), FENa ($1,8\pm 0,2\%$) and FEK ($48,8\pm 4,6\%$); MDA ($0,67\pm 0.2$ nM/mg prot.) while increasing GSH levels ($250,2\pm 27,7$ μ g/mg prot.) and SOD ($112,2\pm 6,4$ U/mg prot) and inhibition of the transcription of TNF- α ($1,5\pm 0,2$). Therefore, exhibit protection of renal function. These data, added to the reports of previous studies with compounds of this plant, indicate promising future for gingerols as an alternative coadjuvant for treatment against AKI induced by aminoglycoside.

Keywords: *Antioxidant. Gingerol. Nephrotoxicity. Oxidative Stress.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1. Lesão renal aguda: aspectos epidemiológicos, etiopatogênese e fisiopatologia	17
1.2 Drogas e nefrotoxicidade	20
1.3 Antibióticos Aminoglicosídeos	22
1.4 Nefrotoxicidade por Gentamicina	23
1.5 Dano oxidativo e lesão inflamatória por GM	27
1.6 Compostos naturais: agentes que atenuam a nefrotoxicidade da GM	29
1.7 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Gengibre).	31
1.8. [6]-, [8]- e [10]-Gingerol.	34
1.9. Relevância e justificativa	37
2 OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo Geral	38
2.2. Objetivos Específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Animais	39
3.2. Indução da nefrotoxicidade	39
3.3. Substâncias utilizadas.	39
3.4 Caracterização da fração ZOEB4.	39
3.4.1 Procedimento de extração e fracionamento do <i>zingiber officinale</i> (gengibre)	40

3.4.2 Isolamento dos gíngerois por HPLC semipreparativa	40
3.4.3 Preparo das drogas	41
3.5 Grupos experimentais	42
3.6 Protocolos experimentais	42
3.7 Função renal: <i>clearance</i> de creatinina	45
3.8 Avaliação da função tubular	45
3.8.1 Fração de excreção de sódio e de potássio	45
3.9 Determinação da peroxidação lipídica	46
3.9.1 Dosagem malonaldeído (MDA) urinário	46
3.9.2 Determinação da concentração de malonaldeído (MDA) no ecido renal de ratos	47
3.10 Análise dos níveis de nitrito em tecido renal de ratos	47
3.11 Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido renal de ratos.	48
3.12 Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em tecido renal	48
3.13 Avaliação da transcrição gênica	49
3.14 Estudo histopatológico	49
3.15 Análise estatística	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Efeito da administração de gentamicina em dias consecutivos	52
4.2 Avaliação da função renal	53
4.3. Avaliação do fluxo renal	59
4.4 Avaliação da função tubular	61
4.5 Perfil do dano oxidativo	63

4.6 Avaliação da participação do óxido nítrico	65
4.7 Avaliação da atividade antioxidante.	66
4.8 Avaliação da atividade pró-inflamatória	68
4.9 Avaliação histopatológica	72
5 DISCUSSÃO	75
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Mecanismos que contribuem para a o dano tubular.	20
FIGURA 2 -	Estrutura química da gentamicina.	23
FIGURA 3 -	Receptores Megalina e Cubilina no túbulo proximal.	25
FIGURA 4 -	Mecanismos de absorção e de redistribuição subcelular de GM em células tubulares renais e outras células.	26
FIGURA 5 -	Redistribuição citosólica de GM e os mecanismos que conduzem à morte celular por necrose e apoptose.	27
FIGURA 6 -	Mecanismos patológicos relacionados com a nefrotoxicidade induzida pela GM	29
FIGURA 7 -	Rizoma do gengibre.	33
FIGURA 8 -	Estrutura dos [6]-, [8]- e [10]-gingerol.	34
FIGURA 9 -	Cromatograma obtido por HPLC em sistema semi-preparativo da fração ZOEB4	41
FIGURA 10 -	Desenho experimental utilizado para indução da nefrotoxicidade com GM (100mg/kg i.p.) ou NaCl 0,9 (0,6 ml i.p.) durante 7 dias consecutivos.	44
FIGURA 11-	Alteração nos níveis de creatinina sérica induzida pelo tratamento com GM em ratos.	52
FIGURA 12-	Efeito da fração ZOEB4 sobre o <i>clearance</i> de creatinina em ratos com nefrotoxicidade por GM.	53
FIGURA 13-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de creatinina plasmáticas em ratos com nefrotoxicidade por GM.	54
FIGURA 14-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de ureia plasmática em ratos	55

com nefrotoxicidade por GM.

FIGURA 15-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de proteína urinária em ratos com nefrotoxicidade por GM.	56
FIGURA 16-	Efeito da Fração ZOEB4 sobre os níveis de Ácido úrico em ratos com nefrotoxicidade por GM.	57
FIGURA 17-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de Ca^{++} urinário em ratos com nefrotoxicidade por GM.	58
FIGURA 18-	Efeito da fração ZOEB4 sobre o fluxo urinário de ratos com nefrotoxicidade por GM.	60
FIGURA 19-	Efeito da fração ZOEB4 sobre a transcrição gênica de aquaporina-2 em ratos com nefrotoxicidade por GM.	61
FIGURA 20-	Efeito da fração ZOEB4 sobre a fração de excreção de Na^+ em ratos com nefrotoxicidade por GM.	62
FIGURA 21-	Efeito da fração ZOEB4 sobre a fração de excreção de K^+ em ratos com nefrotoxicidade por GM.	63
FIGURA 22-	Efeito da Fração ZOEB4 sobre os valores malonaldeído urinário em ratos com nefrotoxicidade por GM.	64
FIGURA 23-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores MDA em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.	65
FIGURA 24-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores de nitrito em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.	66
FIGURA 25-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de Glutathione reduzida (GSH) em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.	67
FIGURA 26-	Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores de SOD no tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.	68
FIGURA 27-	Efeito da fração ZOEB4 sobre a transcrição gênica de $\text{TNF-}\alpha$ no	69

tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.

- FIGURA 28-** Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores da transcrição gênica de IL-1 β em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM. 70
- FIGURA 29-** Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores da transcrição gênica de IL-2 em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM. 70
- FIGURA 30-** Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores da transcrição gênica de INF- γ em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM. 71
- FIGURA 31-** Imagens representativas do efeito da fração ZOEB4 sobre Degeneração Hidrópica Tubular (Hematoxilina-eosina) em ratos iduzidos a nefrotoxicidade por GM. 73
- FIGURA 32-** Imagens representativas do efeito da fração ZOEB4 sobre Infiltrado Inflamatório (Hematoxilina-eosina) em ratos iduzidos a nefrotoxicidade por GM. 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Fatores responsáveis pelas LRAs com causas de origem intrínsecas	19
TABELA 2 -	Agentes antioxidantes naturais que atenuam a nefrotoxicidade por GM.	31
TABELA 3 -	Descrição botânica do Gengibre	32
TABELA 4 -	Quantidade percentual (m/m) de cada gingerol na fração ZOEB4.	41
TABELA 5 -	Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: senso e A:antisenso)	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão renal aguda: aspectos epidemiológicos, etiopatogênese e fisiopatologia.

Os rins são órgãos complexos, essencialmente reguladores que exercem uma gama de funções primordiais para a homeostasia orgânica. A maioria destas funções envolve uma combinação entre excreção e reabsorção renal de substâncias, produzindo um balanço de entrada e saída. É responsabilidade da função renal regular o equilíbrio hídrico e eletrolítico, controlar a pressão sanguínea, a produção de células vermelhas e de vitamina D, excretar metabólitos e secretar substâncias bioativas como hormônios, e promover a manutenção do equilíbrio acidobásico, dentre outras (EATOON; POOLER, 2006; BERNE; LEVI, 2009).

No entanto, alguns compostos químicos e determinadas complicações patológicas são responsáveis por danificarem a estrutura e diminuírem a atividade funcional dos rins, desencadeando quadros denominados de Lesões Renais Agudas (LRAs). Esta síndrome manifesta-se de forma peculiar através da deterioração das funções tubular e glomerular, possuindo como causas frequentes a isquemia e a nefrotocidade associada à alta morbidade e mortalidade (BRENNER et al., 1998; BELLOMO, 2004).

A LRA está relacionada com rápido declínio na taxa de filtração glomerular (TGF) e na incapacidade do sistema renal em excretar compostos nitrogenados resultantes dos processos metabólicos orgânicos, tais como a ureia e a creatinina, acompanhado ou não de diminuição da diurese (MEHTA et al., 2003; MELCHERT et al., 2007).

Atualmente, a doença renal é um sério problema de saúde pública que atinge milhares de pessoas no Brasil e no mundo. A LRA é uma complicação em cerca de 5% das hospitalizações e até 30% das internações em UTI. Necrose tubular aguda (NTA) é responsável por mais de 50% da LRA em pacientes hospitalizados e mais de 76% dos casos nos pacientes em UTI (NUNES et al., 2010). Além disso, detêm taxas de mortalidade que variam de 15% a 60% nesses pacientes (KELLUM, 2008).

Segundo Lameire et al., (2013) a pré-existência de doença renal crônica e/ou situações que manifestem redução da TFG, proteinúria e depleção de volume, são fatores de riscos comuns e importantes, tanto em jovens como em idosos para o desenvolvimento de falha renal aguda. Além disso, fatores de co-morbidade, incluindo o diabetes mellitus, doença cardiovascular, doença hepática crônica, câncer e cirurgia têm sido associados com o desenvolvimento de lesão renal em ambiente hospitalar, necessitando de cuidados críticos.

Diante da dificuldade de se comparar resultados terapêuticos e, a ausência de uniformidade de classificação e de diagnósticos, a rede AKIN (the Acute Kidney Injury Network) indicou uma classificação para LRA, caracterizando-a pela redução abrupta da função renal (dentro de 48 horas) com o aumento absoluto na creatinina sérica $>0,3$ mg/dL (> 25 mmol/L), aumento percentual de 50%, ou, ainda, por redução na produção de urina (documentado oligúria de $<0,5$ ml/kg/h durante >6 horas) (BONVENTRE, 2008).

Além do exposto, tradicionalmente as causas de LRA podem ser classificadas em pré-renal, renal ou intrínseca e pós-renal (ABUELO, 2007). A LRA pré-renal é a causa mais comum de azotemia aguda em pacientes hospitalizados, em percentagem que varia de 40% a 60% do total de acometimentos (COSTA et al., 2003; LAMEIRE et al., 2013).

Durante a LRA pré-renal a integridade anatomofuncional do rim está preservada, resulta principalmente de uma redução na perfusão renal causada por uma série de eventos que culminam, sobretudo com a redução do volume circulante efetivo e hipoperfusão glomerular. As causas mais frequentes são desidratação (vômito, diarreia e febre), uso de diuréticos e insuficiência cardíaca, vasoconstrição intra-renal primária e obstrução renovascular. O seu diagnóstico é imprescindível, já que existe reversibilidade nesses casos, em um a dois dias e, se persistir, pode desencadear NTA (COSTA et al., 2003; ABUELO, 2007, BONVENTRE, 2011).

A LRA pós-renal ocorre por obstrução do trato urinário e, conseqüentemente, causa interrupção do fluxo urinário. A importância do diagnóstico nesta patologia proporciona a reversibilidade da insuficiência renal quando se utiliza o tratamento apropriado mais precocemente possível (HUMPHREYS et al., 2005).

A LRA desencadeada por fatores intrínsecos (renal) ao rim é classificada de acordo com o principal local afetado (túbulos, interstício, vasos ou glomérulo) que, depois da pré-renal, é a segunda modalidade mais comum de LRA. Em torno de 70% a 90% dos casos deste tipo de LRA tem como causas comuns o dano tubular de origem isquêmica ou tóxica desencadeando a NTA. Além disso, caracteriza-se por perda quase total, porém reversível, da função renal, que incluem todas as formas de lesões ao parênquima renal (tabela 1) (COSTA et al., 2003; HUMPHREYS et al., 2005).

Tabela-1 Fatores responsáveis pelas LRAs com causas em origens intrínsecas.

Insuficiência renal aguda: (Renal ou intrínseca)	Causas
1- Hemodinâmicas:	➤ Politraumatismos, hemorragias, choque séptico, pancreatite, gastroenterite.
2- Nefrotóxicas:	➤ Antibióticos (aminoglicosídeos, tetraciclina, anfotericina, aciclovir) chumbo, ouro, deposição tubular de cálcio, ácido úrico, contrastes radiográficos, DAINES.
3- Venenos:	➤ Pesticidas, herbicidas, peçonhas.
4- Agentes nefrotóxicos endógenos:	➤ Mioglobina, hemoglobina, metahemoglobina.

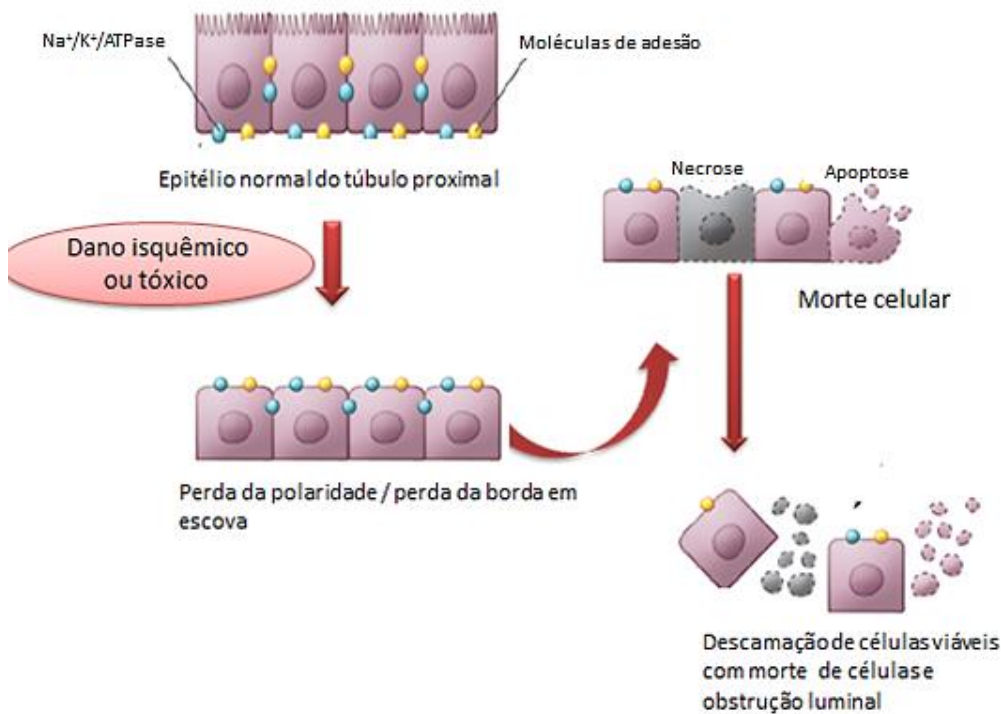
Fonte: adaptado de PANNU e NADIM, (2008).

Nota: DAINES – Drogas anti-inflamatórias não esteroidais.

Após a exposição a um agente nefrotóxico, um ou mais mecanismos podem contribuir para a redução da taxa de filtração glomerular (TFG), incluindo modificações hemodinâmicas, resultante da alta azotemia, além de alterações nos níveis de uma variedade de mediadores vasoativos (endotelina-1, Angiotensina-2, Prostaglandina- E2, ON). Ademais, se uma nefrotoxina provoca alterações hemodinâmicas intra-renais que levam à vasoconstrição, desencadearia uma diminuição da pressão de perfusão e na pressão hidrostática glomerular, resultando em redução da ultrafiltração glomerular (SCHNELLMANN, 2001).

Se o dano estiver relacionado à privação de oxigênio, toxinas, ou, uma combinação de ambas, resultam em lesões com rápida perda de polaridade celular e integridade do citoesqueleto, alterações na borda em escova no túbulo proximal, danos no funcionamento das moléculas de adesão e em outras proteínas de membrana (Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ e β -integrinas), seguidos de a apoptose e necrose (**Fig. 1**). (BONVENTRE, 2008).

Figura 1 - Mecanismos que contribuem para a o dano tubular.



Fonte: adaptado: BONVENTRE, (2008).

Além disso, é considerável a presença de eventos inflamatórios nessa fisiopatologia, onde as moléculas de adesão de leucócitos desempenham papel crítico e, a capacidade dos próprios leucócitos ativados em estimular citocinas (BONVENTRE, 2013). É descrito para lesões isquêmicas e nefrotóxicas o dano tecidual e lesão aos capilares, além de extravasamento, o que poderia contribuir para a congestão vascular que é geralmente observada (SCHNELLMANN, 2001; BELLOMO, 2004).

1.2 Drogas e Nefrotoxicidade.

Os rins são locais frequentes de toxicidade, as drogas por eles excretadas podem exercer efeitos tóxicos, sobretudo nos túbulos renais, levando à lesão e morte celular, ou induzindo a nefrite intersticial aguda (PANNU; NADIM, 2008).

As LRAs nefrotóxicas correspondem a 30% dos casos de lesão renal, sendo a nefrotoxicidade um efeito indesejável de diversos fármacos de uso rotineiro (SILVA, 2010). Fármacos causam cerca de 20% dos episódios de injúrias renais no ambiente hospitalar, com nefrotoxicidade consideravelmente elevada (CYNTHIA et al., 2008).

Segundo estudos de Markowitz e Perazella (2005), os padrões de lesão renal induzida por drogas podem ser subdivididos com base nos componentes do parênquima renal. A maioria das lesões renais induzidas por fármacos envolve os túbulos e interstício. Menos comumente, os agentes terapêuticos podem induzir lesão nos vasos sanguíneos ou produzir uma variedade de padrões de doença glomerular.

Muitas das lesões nefrotóxicas e isquêmicas envolvem as células do túbulo proximal, sendo a causa primária responsável pela ativação dos principais mecanismos fisiopatológicos que levam à perda da TFG durante as LRAs, como discutido anteriormente. O segmento proximal e o ramo ascendente espesso medular da alça de Henle são as regiões do rim que são alvos de dano isquêmico e de algumas lesões tóxicas (WALKER; ENDRE, 2008).

Os eventos lesivos a estas células ocorrem devido à alta taxa de trabalho dessa região, principalmente em concentrar e reabsorver o filtrado glomerular, o que expõe os túbulos a elevados níveis de substâncias circulantes, dentre elas as toxinas, sendo assim, uma região vulnerável a toxicidade (CYNTHIA et al., 2008).

Consideravelmente, parte das lesões que atingem a região do túbulo proximal ocorre por NTA. Embora o termo NTA não seja completamente apropriado, é utilizado universalmente para designar o quadro clínico de LRA provocado por lesão isquêmica e/ou nefrotóxica, cuja reversão imediata não ocorre após a remoção da causa inicial. A NTA é provocada por isquemia em 50% dos casos e por nefrotoxicidade em 35% (COSTA et al., 2003). A NTA é geralmente um fenômeno dose-dependente e, previsivelmente ocorre em pacientes de alto risco para injúria renal (pacientes idosos, com doença renal pré-existente, vários agentes nefrotóxicos utilizados) (PANNU; NADIM, 2008).

As drogas que causam toxicidade tubular atuam alterando a função mitocondrial, interferindo no transporte tubular, aumentando estresse oxidativo e a formação de radicais livres. Dentre as drogas associadas a este mecanismo patogênico de lesão, estão os aminoglicosídeos, anfotericina B, quinolonas, rifampicina, adefovir, cidofovir, tenofovir, DAINES, cisplatina, contrastes radiológicos, dentre outras (CYNTHIA, 2008).

Nesse contexto, é notável citar que a utilização de antibióticos nefrotóxicos, sozinhos ou em combinação com outros fármacos nefrotóxicos são causas importantes de lesão renal direta (MEHTA et al., 2004, PANNU; NADIM, 2008).

Os mecanismos pelos quais os aminoglicosídeos provocam lesão renal ainda não estão bem definidos, apesar de bem estudados em modelos com animais. Porém, a interferência com o funcionamento dos lisossomos, alteração mitocondrial, produção excessiva de radicais

livres, inibição competitiva das reações citosólicas mediadas por cálcio e diminuição do coeficiente de ultrafiltração glomerular tem sido apontado como fatores etiopatogênicos da nefrotoxicidade (RIELLA, 2003).

1.3 Antibióticos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são moléculas constituídas por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que geralmente se encontram no núcleo central (**Fig. 2**) (JANA; DEB, 2006). De estrutura polar catiônica, possuem peso molecular variando entre 445 a 600 Da, altamente solúveis em água e estáveis em pH 6 a 8 (OLIVEIRA et al., 2006).

Essa classe de fármacos tem importante mecanismo de ação bactericida contra infecções graves por microrganismo gram-negativos (*Acinetobacteria*, *Enterobacteria*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Shigella*), além de atuar sinergicamente contra os microrganismos gram-positivos tais como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O mecanismo de ação contra essas espécies resulta da inibição da síntese proteica bacteriana por meio de ligação à subunidade 30s do ribossomo bacteriano, induzindo a leituras incorretas e interrupção prematura da tradução do mRNA (RAO, 2010).

Possuem farmacocinética semelhante, atingindo concentrações plasmáticas após 30-90 min. A eliminação ocorre através da filtração glomerular, com sua depuração em cerca de 66% simultânea com a da creatinina e meia-vida estimada de 30-700 h, o que faz com que haja eliminação 20 a 30 dias após a última administração (RIELA, 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

Ressalta-se que as concentrações séricas observadas com as doses terapêuticas estão próximas da dose tóxica, conferindo assim, um baixo índice terapêutico. A toxicidade celular é comum a praticamente todos aminoglicosídeos, principalmente nefrotoxicidade e ototoxicidade (OLIVEIRA et al., 2006).

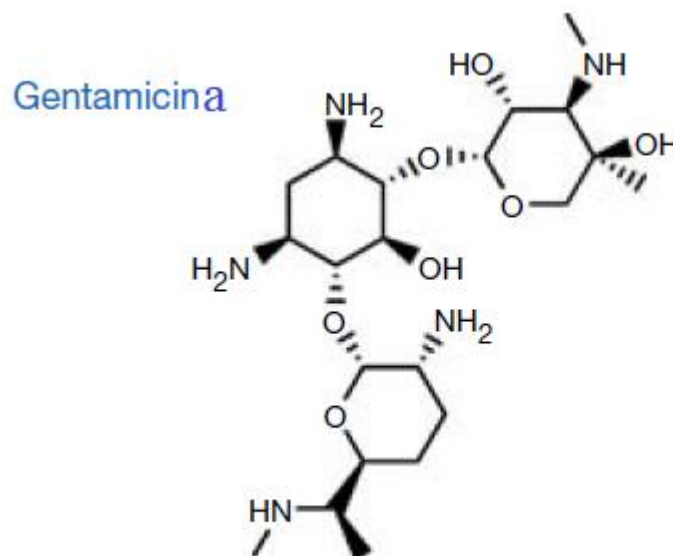
Relatos na literatura citam que o grupamento amina confere toxicidade ao aminoglicosídeo, de modo que quanto maior o número de aminas maior a toxicidade do antibiótico, entretanto, a gentamicina (GM), quando comparada aos outros aminoglicosídeos, apresenta maior nefrotoxicidade em relação, por exemplo, à netilmicina e à tobramicina (CONCENZA, 2010).

O tratamento com esta classe de antibióticos (GM, Amicacina, Neomicina, Estreptomicina, etc) é uma fator importante para o desenvolvimento de disfunção renal com toxicidade celular considerável (BALAKUMAR et al., 2010). Tal toxicidade está associada à lesão renal aguda não oligúrica, que geralmente ocorre com 7 a 10 dias de tratamento, manifestando-se através de uma redução na TFG, enzimúria, aminoacidúria, glicosúria, hipomagnesemia, hipocalcemia e hipocalemia, síndromes de Fanconi símile e Bartter. Contudo, os mecanismos nos quais estes fármacos causam lesão renal não foram totalmente descritos (ROUGIER, 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

1.4 Nefrotoxicidade por Gentamicina

Um marco histórico dos aminoglicosídeos ocorreu na década de 60 com a descoberta da gentamicina (GM). Assim como os outros fármacos desta classe, têm o potencial de produzir toxicidade renal reversível ou irreversível, o que limita a sua frequente exploração clínica terapêutica (**Fig. 2**) (SOUZA et al., 2008).

Figura 2 - Estrutura química da gentamicina.



Fonte: MAURICE et al (2008).

Ressalta-se que o uso na rotina terapêutica de GM (80 mg/kg) por mais de sete dias, tem sido uma causa comum de nefrotoxicidade em aproximadamente 30% dos pacientes (DERAKHSHANFAR et al., 2005).

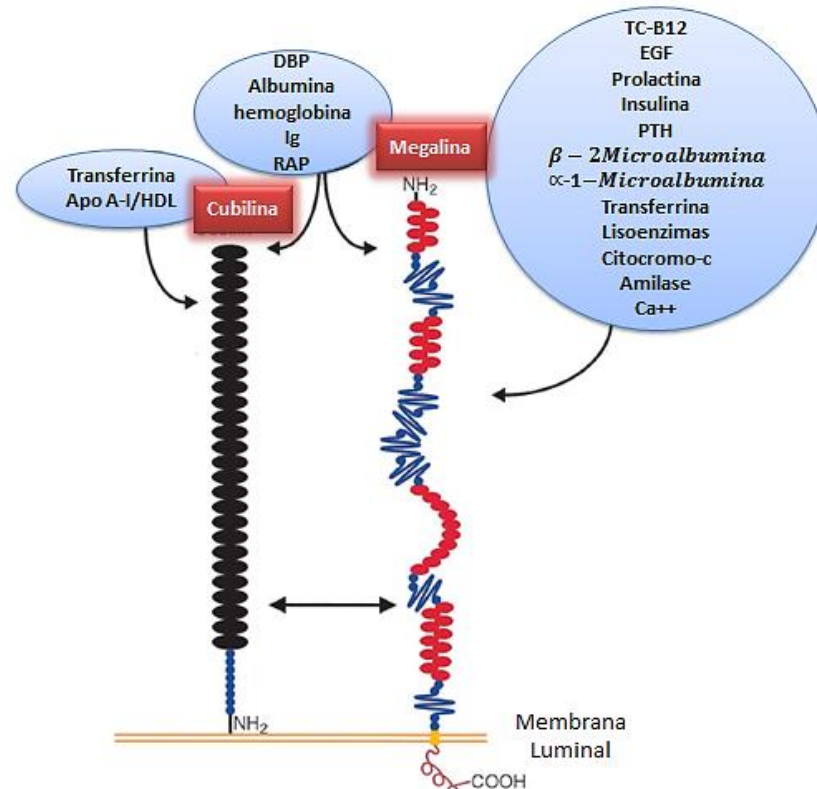
Conforme Parlakpınar e colaboradores (2005), a nefrotoxicidade induzida por GM é um fenômeno complexo caracterizado por um aumento na concentração de ureia e creatinina séricas, além de grave necrose tubular proximal, seguido de deterioração e insuficiência renal. Embora a etiopatogênese seja bem estudada, ainda não é bem compreendida. Contudo, a toxicidade encontrada no rim é bem relacionada com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) nestas células.

Nos rins, a GM acumulam-se nas células epiteliais do túbulo proximal induzindo alterações morfológicas renais. Este evento tem sido verificado tanto em humanos como em modelos experimentais. No entanto, a síndrome é similar em ambos. Esse acúmulo altera a função de diversas organelas e os processos que são cruciais para viabilidade celular. Além disso, a GM pode ativar os receptores extracelulares sensíveis ao cálcio (CaSR) associados à morte celular tubular (**Fig. 3**) (BANDAY et al., 2008; QUIROS et al., 2011).

A etapa inicial para a nefrotoxicidade é a ligação do fármaco e sua internalização no túbulo proximal. A interação com a membrana tubular ocorre por meio do complexo Megalina e Cubilina, receptores endocitóticos expressados na membrana apical do epitélio tubular proximal que são responsáveis por se ligarem a uma variedade de substâncias, dentre elas as proteínas de baixo peso molecular e xenobióticos. A Megalina é uma glicoproteína de aproximadamente 600 kD. É membro dos receptores da família das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), tem um único domínio transmembrana e um grande domínio extracelular N-terminal. Já a Cubilina é uma glicoproteína com 3,600 aminoácidos de peso molecular de 400 Kd com função semelhante à Megalina (**Fig. 3**) (SCHMITZ et al., 2002; VERROUST et al., 2002).

Uma vez ligado, o complexo aminoglicosídeo-megalina/cubulina é endocitado. Este processo requer a ligação eletrostática da GM a cargas negativas de fosfolípidos de membrana e, em seguida, passa através de pinocitose para o compartimento endossomal (SAFA et al., 2010; OUEDRAOGO, et al., 2013).

Figura 3 - Receptores Megalina e Cubilina no túbulo proximal.



Fonte: adapto de VERROUST et al., (2002).

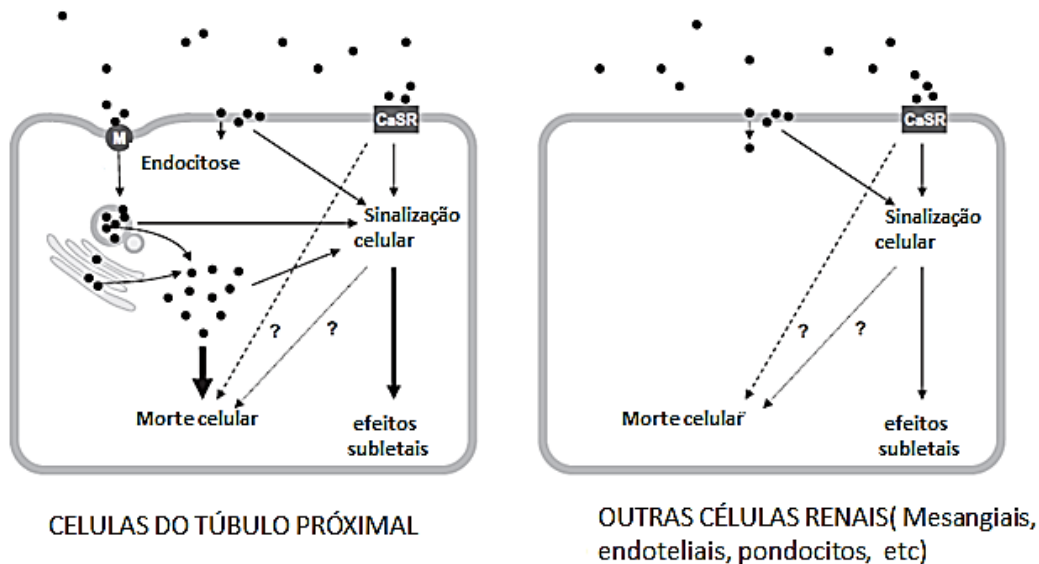
A droga se acumula principalmente nos lisossomos, viaja de forma retrógrada pela via secretora de Golgi e do retículo endoplasmático, alterando o tráfego vesicular. Nos lisossomos a GM produz desestabilização da membrana, agregação lisossomal, alteração do metabolismo de lipídeos, fosfolipidose e formação de corpos mielóides. Muitos dos eventos desencadeados têm sido associados com morte celular, contudo, os mecanismos específicos pelos quais o aminoglicosídeo altera a filtração glomerular ainda não foram totalmente esclarecidos (SAFA et al., 2010; QUIROS et al., 2011; OUEDRAOGO, et al., 2013).

Um dos efeitos mais importantes ocorre quando a concentração de GM no interior dos lisossomos, do complexo de Golgi, e do retículo endoplasmático excedem um limiar e desestabiliza as membranas. O fármaco é liberado no citoplasma e altera o funcionamento das mitocôndrias, causando estresse oxidativo e, conseqüentemente, redução das reservas de ATP, o que está associado à ativação da via mitocondrial de apoptose (**Fig. 4**) (MORALES et al., 2010; QUIROS et al., 2011).

Alem disso, estudos demonstraram que a GM causa ruptura dos lisossomos e provoca a liberação de proteases para o citosol, tais como as catepsinas L, B, D, e outras, que intervêm na indução de morte celular. As catepsinas catalisam a ativação proteolítica das caspases 3 e 7 e ativam a via mitocondrial da apoptose. Na ausência de ATP, catepsinas no citosol produzem

proteólise maciça que leva a morte celular por necrose (**Fig. 5**) (CHWIERALSKI *et al.*,2006; YIN, 2006)

Figura 4 - Mecanismos de absorção e de redistribuição subcelular de GM em células tubulares renais e outras células.



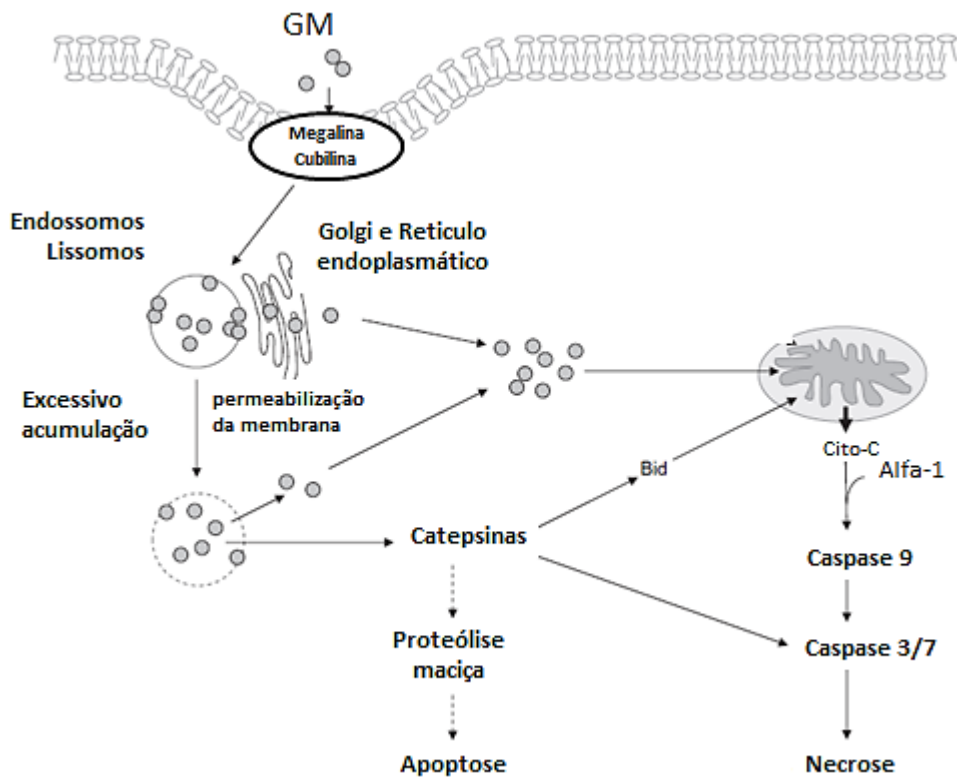
Fonte: QUIROS *et al.*,(2011)

NOTA: M: Megalina; CaSR: Receptor sensível a Ca^{2+} .

Conforme Quiros e colaboradores (2011), outro fator relevante é a inibição dos transportadores de membrana encontrados nas células proximais, que contribuem fortemente para a nefrotoxicidade do fármaco, já que este inibe uma variedade de transportadores na borda em escova e membrana basolateral, (Na^+/Pi , Na/H^+ , o transportador de dipeptídeos, transportador eletrogênico de Na^+ e a bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$), ocasionando alterações no transporte de Na^+ e redução da entrada de glicose para o meio intracelular, colaborando assim para a redução dos níveis de ATP e, seguidamente conduzindo à necrose e morte.

Resumidamente, a nefrotoxicidade induzida pela GM é caracterizada pelo aumento da creatinina e da ureia sérica, pela incidência da albuminúria e perdas urinárias de carnitina. Estruturalmente essa lesão é associada às ocorrências de descamação celular, atrofia glomerular, necrose tubular, fibrose tubular, edema epitelial dos túbulos proximais, edema/inflamação perivascular e congestão glomerular (BALAKUMAR *et al.* 2010).

Figura 5 - Redistribuição citosólica de GM e os mecanismos que conduzem à morte celular por necrose e apoptose.



Fonte: Adaptado de QUIROS et al., (2011).

1.5 Dano oxidativo e lesão inflamatória por GM

Vários estudos demonstram que a GM aumenta a geração de radicais livres tais como o anion superóxido, radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio, além de espécies reativas de nitrogênio (RNS) no córtex renal os quais, eventualmente, levam à deterioração estrutural e funcional destes órgãos (CUZZOCREA et al., 2002; BALAKUMAR et al., 2010).

Além disso, tem sido comumente demonstrado que o tratamento com o fármaco desencadeia redução nas quantidades de glutathiona (GSH), Superóxido Dismutase (SOD) e de catalase no tecido renal (JUAN et al., 2007; MORALES et al., 2010).

Neste contexto de dano, o detrimento renal está relacionado com aumentos acentuados nos níveis de lipoperoxidação e produção de MDA (Malondealdeido), a formação de nitrotirosina e oxidação de proteína no córtex renal (**Fig. 6**) (HUSSAIN et al., 2012; STOJILJKOVIC et al., 2012).

O corpo de evidências experimentais sugere que mecanismos multifatoriais estão envolvidos nesse quadro de nefrotoxicidade (**Fig. 6**). Durante o dano renal, o antibiótico

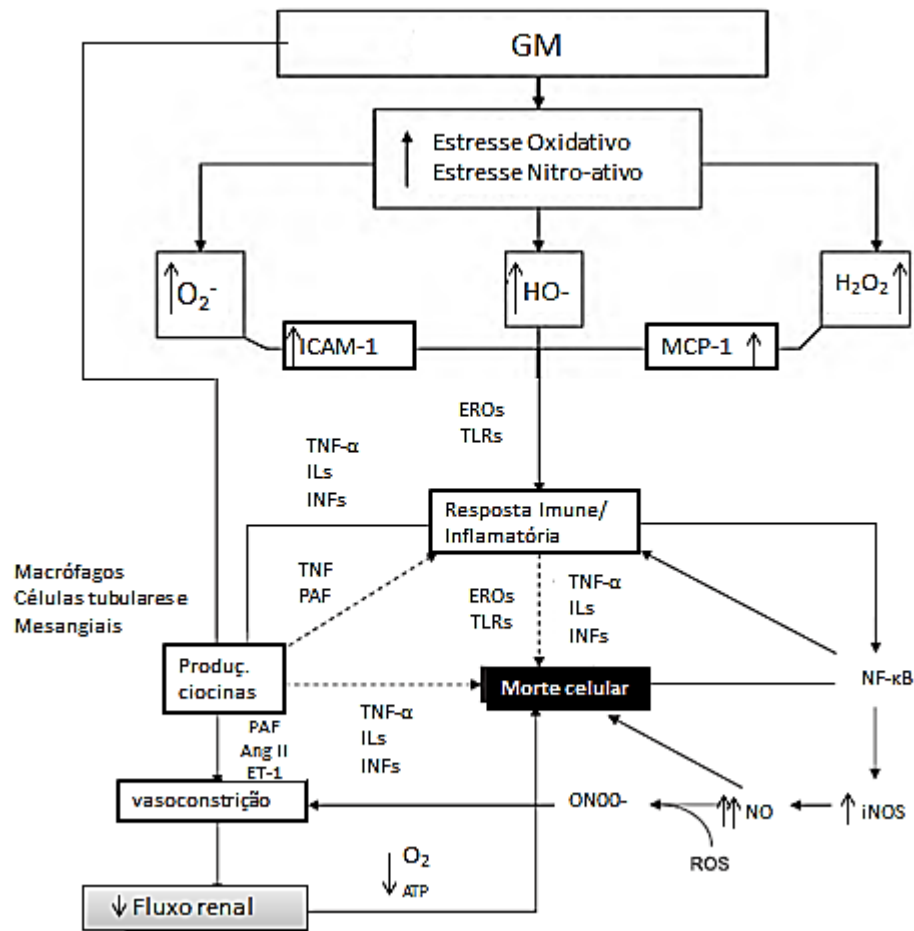
estimula eventos inflamatórios pelo recrutamento local da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e por proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), aumentando a migração de monócitos e macrófagos para o local do dano tecidual com considerável elevação nos níveis de TGF- β , contribuindo assim para a progressão da nefrite tubular intersticial (MOUEDDEN et al., 2000; BLEDSOE et al., 2006).

A GM causa aumento na população de monócitos/macrófagos no rim, o fármaco aumenta a expressão de marcadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . Estas moléculas inflamatórias participam na patogênese da insuficiência tubulointersticial através da promoção da atração de leucócitos e a aderência às células tubulares renais inflamadas (BAE et al., 2013).

A GM aumenta ativação da proteína quinase ativada por mitogeno (p38 MAPK) e da via do fator nuclear Kappa-B (NF κ -B), importante mediador de algumas vias inflamatórias que induz a expressão de citocinas pró-inflamatória e da Óxido Nítrico Sintetase (NOS) durante a IRA (VOLPINI et al., 2006).

No entanto, as vias inflamatórias podem aumentar o metabolismo das NOS significativamente. As eNOS produzem óxido nítrico (ON) em níveis baixos e medeiam assim a vasodilatação fisiológica. Contudo, a produção em excesso de ON devido à elevada expressão da iNOS pode causar efeitos citotóxicos nas células. O ON pode reagir com o anión superóxido e produzir peroxinitrito, um radical altamente reativo que contribui para dano celular reduzindo o relaxamento vascular e, conseqüentemente, aumentando o cenário da lesão local (**Fig. 6**). (QUIROS et al., 2011; FORSTERMANN, 2010). Ressalta-se que inibidores de NF κ -B são fatores de proteção contra os danos renais induzidos pela GM em modelos experimentais (SANCHEZ-LOPEZ et al., 2009).

Figura 6 - Mecanismos patológicos relacionados com a nefrotoxicidade induzida pela GM



Fonte: adaptado de BALAKUMAR et al., (2010).

Nota: $O_2^{\cdot-}$: Radical superóxido, OH^{\cdot} : radical hidroxila; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, ICAM: Molécula intercelular de adesão celular-1, a MCP-1: Proteína hemoatraente de monócitos-1, IL: Interleucina, PAF: Fator de Agregação Plaquetária, INF: Inteferonas, Ang II: Angiotensina II.

1.6 Compostos naturais: agentes que atenuam a nefrotoxicidade da GM.

Apesar das plantas medicinais já fazerem parte da cultura popular, nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia teve um aumento considerável entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas ou preparações destas. Diante do exposto, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (ROSA et al., 2011).

Cerca de aproximadamente 25% das drogas mundialmente prescritas são derivadas de plantas e, 11% das drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de

Saúde são originárias de plantas. Além disso, um grande número de drogas sintéticas possui um precursor natural. Estima-se que 60% dos medicamentos anti-tumorais e antibióticos tenham origem natural (RATES, 2001).

Em adição, ressalta-se que o tratamento concomitante com outros fármacos, como estratégia farmacológica na tentativa de atenuar as LRAs nefrotóxicas, pode ser arriscado, já que existe possibilidade de acontecer sinergismo e incorrer em maior número de efeitos indesejáveis, pois tais fármacos podem exibir outras toxicidades somatórias (ALI et al., 2011).

Alguns estudos têm visado identificar agentes com efeitos renoprotetores. Neste contexto, observa-se o uso crescente de fitoterápicos, representando assim uma alternativa viável. Desta forma, vários extratos e substâncias oriundas de plantas medicinais foram testados experimentalmente diante da nefrotoxicidade induzida por GM. A geração EROs parece ser à base de uma variedade de insultos do antibiótico e, o tratamento com vários antioxidantes naturais tem se mostrando útil, tanto na prevenção como no tratamento.

Tais efeitos são observados através de vários compostos, dentre eles os compostos naturais *Ginkgo biloba* e extrato da *Rhazya stricta*, que preveniram as mudanças no *clearance* de creatinina e nas concentrações de ureia e creatinina sérica, além da necrose tubular desencadeada pela GM, conduziu o aumento nos níveis de GSH, SOD, e redução dos níveis de peroxidação lipídica e de expressão de mieloperoxidase (NAIDU et al., 2000; ALI, 2002).

O composto natural *Glicirrhizina* também atenuou as alterações nos parâmetros renais causados pela GM, além de ter melhorado a incapacidade de concentrar urina e manutenção dos níveis adequados das aquaporinas danificadas pelo tratamento com o antibiótico (SOHN et al., 2003).

Geralmente, os efeitos indesejáveis dos fármacos nefrotóxicos (GM e Cisplatina), são melhorados por antioxidantes naturais, por exemplo, a *Aerva lanata* teve ação protetora ao reduzir a retenção dos compostos nitrogenados e as alterações lesivas observadas através da análise histopatológica (SHIRWAIKAR et al., 2004). Além disso, estudos de Ali et al., (2004) relataram que o tratamento com óleo da *Nigella sativa* reduziu os indícios de nefrotoxicidade por GM, aumentando o status antioxidante total dos animais tratados com essa substância.

Como discutido anteriormente, nota-se que os agentes naturais parecem ser fonte valiosa de substâncias antioxidantes que são bem efetivas diante do estresse oxidativo. Pode-se evidenciar uma série de efeitos benéficos diante dessa toxidade (**tabela-2**). Como exemplo, foi identificado que a Curcumina eleva os níveis de Catalase; a Timoquinona conserva os níveis de ATP reduzidos pela GM; a *Spirulina platensis* melhoram a ação da SOD e GSH; o

óleo de *gergilim* atenua a produção elevada de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (FAROMBI; EKOR, 2006; SAYED-AHMED; NAGI et al., 2007; KARADENIZ et al., 2008; HSU et al., 2010).

Tabela 2 - Agentes antioxidantes naturais que atenuam a nefrotoxicidade por GM.

Agente	Dose do antioxidante	GM	Efeitos	Referência
Diallil sulfureto	50 mg/kg; 4 dias; i.p.	125 mg/kg; 4 dias; i.m	Protege e diminui o dano oxidativo no córtex renal.	Pedraza-Chaverri et al.,(2003)
<i>Pongamia pinnata</i>	300 e 600 mg/kg; 10 dias; v.o.	40 mg/kg; 5 dias; i.m.	Atenua sinais bioquímicos, funcionais e histológicos da nefrotoxicidade .	Shirwaikar et al.,(2003)
<i>Hemidesmus indicus</i>	5 g/kg v.o	90 mg/Kg; 6 dias de tratamento	Reduzo o prejuízo renal induzida em ratos por GM.	Kotnis et al.,(2004)
<i>Phyllanthus amarus</i>	100-400 mg/kg; 14 dias; v.o..	40 mg/kg; 14 dias; i.p..	Proteção contra os sinais bioquímicos e histológicos da nefrotoxicidade.	Adeneye e Benebo, (2008)
<i>Spirulina platensis</i>	1000 mg/kg; 7 dias; v.o.	100 mg/kg; 7 dias; i.p..	Diminui o estresse oxidativo e preserva a atividade das enzimas antioxidantes.	Karadenize et al.,(2008)
<i>Bauhinia purpurea</i>	300 mg/kg; 8 dias, v.o..	100 mg/kg; 8 dias; i.p..	Reversão das alterações bioquímicas e histológicas do dano renal.	Lakshmi et al.,(2009)
<i>Nigella sativa</i>	0.2 ou 0.4 ml /kg; 6 dias; i.p..	100 mg/kg, 6 dias; i.p.	Proteção contra os sinais bioquímicos e histológicos da nefrotoxicidade.	Yaman et al., (2010)
<i>Sida rhomboidea</i>	200-400 mg /kg, 8 dias; v.o.	100mg/Kg, 8 dias, i.p..	Protege contra o estresse oxidativo e alterações bioquímicas.	Thounaojam et al.,(2010)
<i>Macrophyllus Micheli</i>	100-300 mg /kg, 5 dias; v.o.	80mg/Kg, 5 dias, i.p..	Protegeu as alterações na fração de excreção de sódio e potássio e nos níveis do Clcr.	Portela et al.,(2012)

Fonte: Adaptado de ALI et al., (2011).

1.7 *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre).

Originário das florestas tropicais do Sudoeste da Ásia, o gengibre (*Zingiber officinale*) (Fig. 7) é cultivado em diversos países, tais as Antilhas, Havaí, África, Austrália e no Brasil. Em nosso país, esta planta chegou um século anterior ao início de sua colonização. Naturalistas que visitavam o país achavam que se tratava de uma palavra nativa, pois era

comum encontrá-la em estado silvestre, os indígenas chamavam-na de mangaratiã ou magarataia (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).

Dentre suas características gerais, o gengibre é uma planta herbácea aromática, perene, de rizoma articulado, septante, carnoso, revestido de epiderme rugosa, de onde desenvolve o caule aéreo (JOLY, 2002). Na parte inferior, possui muitos rizomas cilíndricos, horizontais, distribuídos lateralmente, com ramificações situadas num mesmo plano, digitiformes, no vértice das quais se encontram cicatrizes do caule foliáceo de 14 a 16 cm de comprimento por 4 a 20 mm de espessura. As características botânicas estão representadas na tabela 3 (DABAGUE, 2008).

Tabela 3 - Descrição botânica do Gengibre.

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

Fonte: BEAL, (2004).

É importante ressaltar que o gengibre é uma das mais antigas e populares plantas medicinais do mundo, um composto natural utilizado como condimento e como erva medicinal desde a antiguidade pelos povos do oriente e, atualmente utilizado na medicina popular de quase todos os povos do planeta (PALHARIN et al., 2008; DABAGUE, 2008).

Figura 7 - Rizoma do gengibre.



Fonte: DABAGUE, (2008); MISHRA et al., (2012).

É amplamente utilizado devido a sua atividade farmacológica citada contra diversas enfermidades. São crescentes os relatos científicos das ações benéficas advindas do *Zingiber officinale*. Encontra-se atividades anti-inflamatória, antiemética, anti-náusea, antiulcerosa, ansiolítica, antipirética anti-úlceras, hipoglicêmica, antitumoral e antioxidante (ZHOU et al., 2006; SHUKLA, 2007).

Por meio dos estudos de Jolad et al., (2005), foram identificadas 63 compostos através da análise das frações purificadas do *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). Dentre os diversos componentes, é relevante a quantidade de óleos voláteis (10% a 30%) e vários componentes pungentes, compostos estes, responsáveis pelos principais mecanismos farmacológicos citados na literatura (ZICK et al., 2008).

Os óleos voláteis encontrados no gengibre são constituídos principalmente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, predominando os zingibereno (35%), curcumeno (18%), farneseno (10%) e, em quantidades menores, o bisaboleno e b-sesquiphellandreno. Além destes temos a presença de hidrocarbonetos monoterpênicos, tais como o 1,8-cineol, linalol, borneol, neral, geraniol. Muitos destes constituintes voláteis contribuem para o aroma e sabor distinto do gengibre (SHUKLA; SINGH, 2007).

Os componentes pungentes não voláteis são os constituintes biologicamente ativos desta espécie, tais como os compostos gingeróis, shogaols, paradols e zingerone. Dentre estes se destacam os gingeróis, que apresentam uma série de homólogos diferenciados pelo comprimento das suas cadeias alquila não ramificadas. Os gingeróis foram identificados como os principais componentes ativos no rizoma fresco. Além disso, os shogaols, e uma série de compostos homólogos são 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. Contudo, ainda podemos citar a

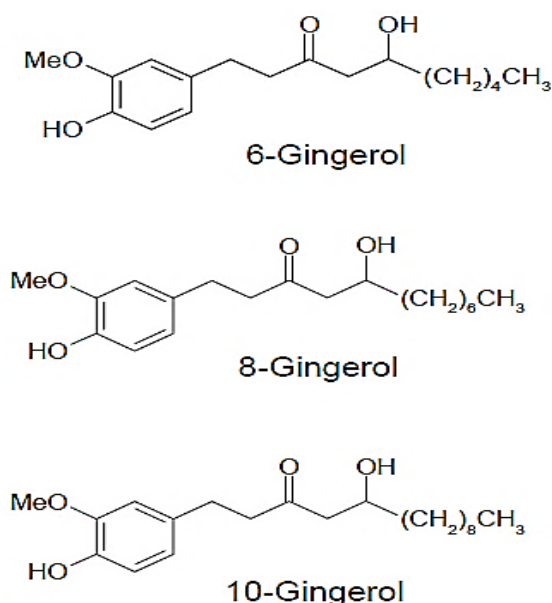
presença do paradol, composto semelhante ao gingerol formado por meio da hidrogenação do shogoal (JIANG et al., 2006; SHUKLA; SINGH, 2007).

1.8 [6]-, [8]- e [10]-Gingerol.

Os principais constituintes químicos não voláteis encontrados no rizoma do gengibre são os gingeróis, os quais formam uma família de compostos homólogos, diferenciados entre si pelo número de átomos de carbono em sua cadeia lateral: 10, 12 e 14 átomos de carbono que dão origem ao [6]-, [8]- e [10]-gingerol, respectivamente, sendo o [6]- gingerol o composto mais abundantemente encontrado (**Fig. 8**) (JIANG et al., 2005).

Tem sido demonstrada uma variedade de efeitos farmacológicos para estes compostos. No geral, estes possuem efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, antipirético, cardiotônicos, hipotérmicos e efeitos na prevenção do câncer (LANTZ et al., 2007; WANG et al., 2009).

Figura 8. Estrutura dos [6]-, [8]- e [10]-gingerol.



Fonte: MORERA et al.,(2012).

Contudo, o [6]- gingerol é citado como o principal responsável por tais ações. Diversos relatos na literatura mencionam que este possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anti-carcinogênica e anti-mutagênica (OJEWOLE, 2006, SARKAR et al., 2011; HANIADKA et al., 2012; ZICK et al., 2013).

Atualmente, é bem reportado o forte potencial do [6]-gingerol em reduzir a resposta inflamatória induzida. Segundo relatos de Tripathi et al., (2007), este composto reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS (Lipossacarídeo), tais 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.

Além da inibição de TNF- α e de NF κ -B, o 6-gingerol reduziu a expressão da iNOS induzida por LPS. A alta taxa da expressão desta enzima está associada com a participação das EROs na região lesionada, indicando assim, um efeito antioxidante deste composto (LEE et al., 2009; DUGASANI et al., 2010). O 6-gingerol possui a capacidade de reduzir também os níveis de TGF- β e COX-2 (KAMATO et al., 2013; SAPTARINI et al., 2013).

Contudo, foi identificadas evidências de que o [8]-gingerol inibe seletivamente a agregação plaquetária, além de ser um forte inibidor da atividade de COX-1 em células leucêmicas (RBL-2H3) de basófilos de rato, sugerindo que este também possui efeitos anti-inflamatórios e antiplaquetários (NURTJAHJA et al., 2003; MISHRA et al., 2012). Outros estudos relatam que além da redução da expressão de COX-2, os compostos [6]- [8]- e [10]-gingerol têm a capacidade de reduzir *in vitro* a produção de PGE₂ (LANTZ et al., 2007; KIM et al., 2005; ALI et al., 2008).

São reportadas ações benéficas do [6]-gingerol frente a eventos neoplásicos. A aplicação tópica do 6-gingerol em animais evita a papilomagenese na pele, como também, este inibiu a metástase pulmonar de melanomas B16F10 e, a carcinogênese intestinal induzida por azoximetano. Recentemente, o [6]-gingerol demonstrou efeitos anti-cancerígenos e anti-inflamatórios em hepatomas, inativando a via do NF- κ B e supressão de TNF- α , além de inibir a hidrolase de leucotrieno A4 no câncer de cólon (JU et al., 2012).

Ocorre inibição da adesão celular e da ação das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e -9) em linhagens de células cancerígenas da mama humana pelo [6]-gingerol. Além do que, a inibição da angiogênese por este composto pôde ser útil no tratamento de tumores e outras doenças dependentes deste evento (KIM et al., 2005; KAMATO et al., 2013).

Além de forte efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico, recentemente tem sido demonstrado que a [6]-gingerol é dotado de uma intensa ação anti-oxidante, tanto *in vivo* como *in vitro*, com isso, torna-se agente eficaz para a prevenção da formação de EROs (ALI et al., 2008).

Os compostos fenólicos [8]- e [10]-gingerol detêm ação antioxidante significativa semelhante ao [6]-gingerol. Os três inibem o dano oxidativo por redução na 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 da xantina/xantina oxidase que é uma fonte de formação dessas espécies (BADRELDIN et al., 2008; DUGASANI et al., 2010).

É bem relatado os efeitos anti-eméticos do gengibre, sugere-se que os fitoquímicos, especialmente [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol podem funcionar como um antagonista de 5-hidroxitriptamina, antagonista de Neurokinina-1 e como anti-histamínico (WANG et al., 2009; HANIADKA, et al., 2010).

Contudo, ainda é descrito um efeito benéfico do [6]-gingerol sobre o metabolismo. Esse composto diminuiu significativamente a glicemia de jejum e melhorou a tolerância à glicose em animais diabéticos tipo 2, reduziu os triglicérides plasmáticos, o colesterol total, ácidos graxos livres, as lipoproteínas de baixa densidade e os níveis plasmáticos de insulina (LI et al., 2012; TZENG et al., 2013).

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

Em face dessas considerações e na tentativa de atenuar a nefrotoxicidade da GM, nosso trabalho teve como intuito investigar os efeitos benéficos reportados aos gingeróis, diante de um quadro de nefrotoxicidade por GM.

1.9 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Existem vários relatos importantes, nos quais a administração de Gentamicina (GM) está implicada como uma causa importante para a gênese de LRA por NTA, envolvendo numerosos mecanismos de nefrotoxicidade (TAVAFI; AHMADVAND, 2011; AYGÜN e AKÇAM, 2012). Esta interligação entre GM e os quadros de LRAs proporciona uma causalidade aceitável para referendar a necessidade de se identificar medidas de prevenção e tratamento dos eventos críticos que atingem o sistema renal nessa fisiopatologia.

O modelo de LRA por GM como objeto de estudo é extremamente valioso, desencadeia efeitos agudos sobre a função renal em investigação, proporcionando um processo de indução de dano tubular.

Nesse contexto, o presente estudo vem na tentativa de demonstrar que algumas estratégias farmacológicas, quando adotadas, poderiam proporcionar benefício para a problemática em questão, tendo como ênfase os agentes fitoterápicos antioxidantes, que têm se consolidado nessa procura. Os compostos do Gengibre são detentores de mecanismos biológicos nos quais os componentes ativos deste produto natural demonstram efeitos nos sistemas celulares, possuindo ações classificadas como antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásicas dentre outras. Com isso, demonstram proteção celular através do enriquecimento dos sistemas orgânicos (ALI, 2008). No entanto, estas ações ainda não foram completamente elucidadas sobre o quadro de IRA desencadeado por GM, gerando assim um amplo interesse na utilização dos mesmos, principalmente no ponto de vista terapêutico.

Portanto, o foco de investigação deste estudo experimental foi determinar os possíveis efeitos renoprotetores da fração enriquecida em *gingerois* (ZOEB4) do extrato etanólico de *Z. Officinale*, administrado após a gênese, e no percurso da IRA induzida pela administração de GM em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral.*

Investigar o potencial terapêutico e os efeitos farmacológicos da fração ZOEB4 do extrato etanólico de *Z. Oficinalle* roscoe na insuficiência renal aguda induzida por gentamicina em ratos.

2.2 *Objetivos específicos.*

- ✓ Caracterizar a lesão renal induzida pela gentamicina (GM) em tratamento de sete dias consecutivos.
- ✓ Verificar os possíveis efeitos protetores do tratamento com a fração enriquecida em gingeróis (ZOEB4), sobre a função renal e tubular de ratos submetidos à indução de LRA por GM.
- ✓ Avaliar o perfil oxidativo da lesão renal induzida GM em ratos tratados ou não com a fração ZOEB4.
- ✓ Verificar as possíveis alterações histológicas na ausência e presença da fração ZOEB4 em ratos submetidos ou não ao tratamento com Gentamicina.
- ✓ Investigar o mecanismo molecular do possível efeito protetor da fração ZOEB4 sobre os marcadores de lesão inflamatória induzida por GM.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos, pesando entre 240-280 gramas (n= 6 a 7 por grupo), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ com 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), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA-UFC (**protocolo 68/12**).

3.2 INDUÇÃO DA NEFROTOXIDADE

O modelo de nefropatia induzida por droga ocorreu pela administração de GM na dose de 100 mg/kg (i.p.) durante sete dias consecutivos. Tal dose foi escolhida por meio de um protocolo piloto realizado previamente ao início dos experimentos, e fundamentada por estudos de Singh e colaboradores, (2012). Ao término do período experimental de indução da nefrotoxicidade e do tratamento de cada grupo, foram mensurados marcadores da função renal por meio da coleta de urina, sangue e do tecido renal conforme descrito e representado no protocolo experimental que segue no item 3.5.

3.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.

GM e todos os produtos químicos e outras drogas aqui mencionadas foram obtidas da Sigma-Aldrich[®] USA, ou Vetec[®] Brasil. A fração ZOEB4 foi isolada no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jame's Almada da Silva.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO ZOEB4.

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é constituído por diversos compostos biologicamente ativos. A ZOEB4 é uma fração enriquecida em compostos gingeróis do

extrato etanólico do *Z. officinale*. Nesta estão concentrados e isolados os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol. Foi utilizada a tecnologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) que pode ser usada para purificar metabólitos lábeis de animais ou plantas como no caso do *Z. officinale*.

3.4.1 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO *Zingiber officinale* Roscoe (GENGIBRE)

Um kilo e meio *Z. officinale* roscoe foi cortado em pedaços pequenos e secos em estufa climatizada a 40°C com circulação de ar. Depois de 3 dias na estufa o material seco foi pulverizado e macerado utilizando álcool etílico (99,5 %) por 9 dias, com troca de solvente de 3 em 3 dias. O álcool etílico foi evaporado utilizando rota evaporador, obtendo-se desta forma um extrato livre de solventes (extrato bruto: 8,9 g). Em seguida este extrato foi aplicado em uma coluna de vidro (4,2 cm de diâmetro) preenchida com sílica (18 cm de altura). Inicialmente eluiu-se 500 mL de hexano na coluna com o objetivo de eliminar a fração lipídica presente no extrato. Após ter sido coletado a primeira fração denominada ZOEB1 (500 mL), eluiu-se uma mistura de hexano/acetato de etila na proporção 60:40 (v/v), coletando-se as duas frações seguintes (200 mL de ZOEB2 e 200 mL de ZOEB3). As frações seguintes foram coletadas utilizando a mistura de solventes hexano/acetato de etila (40:60). Volumes de 400 mL foram coletadas até a fração de número 6 (ZOEB4-ZOEB6). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando o [6]-, [8]- e [10]-gingerol como padrões. Identificou-se a fração ZOEB4 como a enriquecida com os gingeróis.

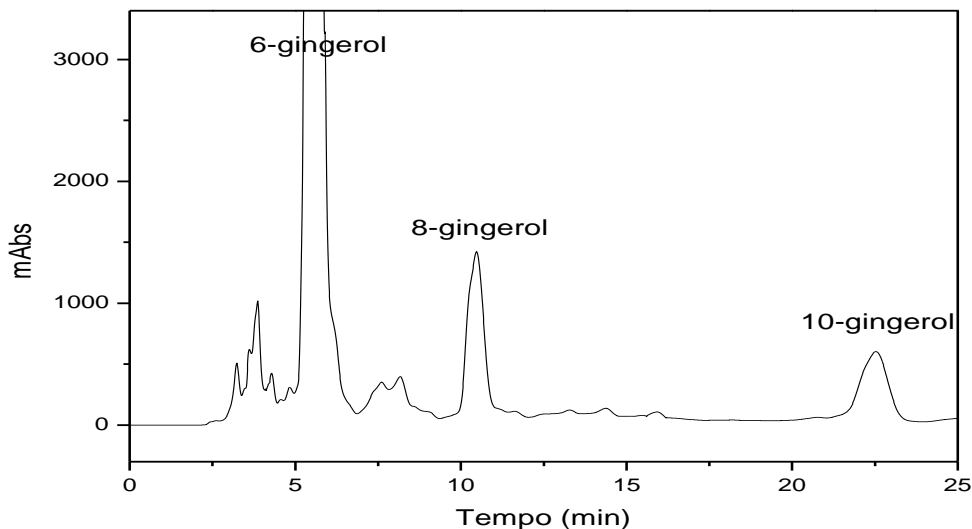
3.4.2 ISOLAMENTO DOS GINGEROIS POR HPLC SEMIPREPARATIVA

Para quantificar os [6]-, [8]- e [10]-gingeróis uma alíquota (50 mg) da fração ZOEB4 foi injetada em um sistema de HPLC da Shimadzu, utilizando uma coluna C18 (10 μ , 25 x 1 cm), com detector de ultravioleta (DAD: diode array detector), vazão de 4,7 mL/min, volume de injeção 150 μ L utilizando como fase móvel metanol/água (75:25). Antes da injeção em escala semipreparativa injetou-se uma amostra em escala analítica nas mesmas condições acima em coluna C18 (10 μ , 25 x 0,46 cm), vazão 1 mL/min, volume de injeção 10 μ L.

A quantificação obtida dos compostos gingeróis por HPLC está expressa na tabela 4 e no cromatograma representado na figura 9.

Tabela 4 - Quantidade percentual (m/m) de cada gingerol na fração ZOEB4.

Gingerol	Quantidade de <i>gingerol</i> na fração ZOEB4 (m/m, %)*	Quantidade relativa de <i>gingerol</i> na fração ZOEB4 (m/m, %)	Razão em massa dos <i>gingerois</i>
6-gingerol	41,7	85,3	17,4
8-gingerol	4,8	9,8	2
10-gingerol	2,4	4,9	1
Outras substâncias	51,1	-	-

Figura 9 - Cromatograma obtido por HPLC em sistema semi-preparativo da fração ZOEB4

3.4.3 PREPARO DAS DROGAS

A fração ZOEB4 foi dissolvida em Tween-80 a 2%, obtendo-se as concentrações finais de 6,25, 12,5 e 25 mg/mL que foram administradas nas doses 6,25 e 12,5 e 25 mg/kg, respectivamente. Os grupos controles receberam intraperitonealmente (i.p.) uma solução líquida de GM na dose de 100 mg/kg; GM mais tween-80 2% (v.o.); ou salina 0,9% (v.o.); e salina 0,9% (i.p.) mais tween-80 2%(v.o.). O restante dos grupos recebeu GM acrescentada ao tratamento (v.o.) com a fração ZOEB4 nas três doses citadas anteriormente. O subitem 3.5 apresenta informações adicionais sobre os grupos e suas respectivas doses.

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

- **Grupos Controles (NaCl).**
 - Animais receberam indução com NaCl 0,9% (i.p.) durante 7 dias acrescentado ao tratamento com Tween-80 2% (v.o.) durante 5 dias, iniciando a partir do 5º dia de indução. Grupo denominado CT.
 - Animais receberam indução com NaCl 0,9% (i.p.) durante 7 dias acrescentado ao tratamento com a fração ZOB4 (25mg/Kg v.o.) durante 5 dias, iniciando a partir do 5º dia de indução. Grupo denominado zoeb4 25.

- **Grupo Nefrotóxico.**
 - Animais receberam indução com solução de GM (100 mg/kg, i.p.) durante 7 dias, e tratamento com solvente Tween-80 2% (v.o.) durante 5 dias, iniciando a partir do 5º dia de indução. Grupo denominado GM.

- **Grupo nefrotóxicos mais tratamento com a fração ZOEB4.**
 - Animais receberam indução com GM (100mg/kg i.p.) durante 7 dias, e tratamento com a fração ZOEB4 (6,25, 12,5 e 25 mg/kg v.o.), iniciando a partir do 5º dia de indução durante 5 dias seguidos. Grupos denominados GM +ZOEB4 (6,25; 12,5 e 25).

Todos os grupos listados acima foram submetidos à avaliação da função renal, através do *clearance* de creatinina, além da mensuração do estresse oxidativo e análise histopatológica. No entanto, a partir dos resultados destas metodologias, foram selecionados apenas animais do grupo CT, GM, GM+ ZOEB4 25 e zoeb4 25 para os ensaios com biologia molecular.

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Com o intuito de induzir o quadro de LRA e seguir um esquema de tratamento os animais receberam indução com NaCl ou GM seguidos do tratamento oral com a fração ZOEB4 ou com Tween-80 2%. Os mesmos estão ilustrados na figura 10.

Os animais induzidos com NaCl 0,9% foram tratados com Tween-80 2% (Controle: CT) ou com a fração ZOEB4na dose de 25 mg/Kg (Grupo Controle: zoeb4 25) (**Fig. 10**). No entanto, os grupos induzidos com GM foram tratados concomitantemente com fração ZOEB4 6,25; 12,5 ou 25 mg/Kg (Grupos: GM+zoeb4 6,25; 12,5 ou 25), ou com solvente Tween-80 2% (Grupo: GM) (**Fig. 10.1**). O tratamento oral ocorreu durante 5 dias consecutivos, iniciando a partir do quinto dia do desenvolvimento do período experimental. Quando estes ocorreram em dias similares à administração com os indutores, o tratamento oral deu-se uma hora após tal administração. Todos os animais pertencentes aos grupos experimentais ficaram em gaiolas metabólicas a partir do 7º dia do protocolo experimental até o termino do mesmo no 10º dia (**Fig.10 e 10.1**). Ressalta-se, que foi observado o peso dos animais durante todo protocolo experimental e, a partir da entrada nas gaiolas metabólicas, o consumo de alimento e água também foram averiguado diariamente.

Após a obtenção do volume urinário de 24h do último dia experimental, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg) e, em seguida, conduzidos à laparotomia e dissecação da aorta abdominal, por onde foi realizada punção. As amostras sanguíneas foram coletadas em microtúbulos (2 mL) contendo 20µL de heparina a 10% e, posteriormente, centrifugadas a 3.500 rpm a uma temperatura de 4 °C durante 15 minutos. As amostras de plasma obtidas foram armazenadas a -80Cº para dosagens bioquímicas. Seguidamente à coleta sanguínea, sucedeu-se a coleta dos rins, estes foram pesados rapidamente em uma balança analítica (shimadzu®) e, em seguida, o rim direito foi armazenado em formol tamponado 10% para o posterior estudo histopatológico. O restante do tecido foi mantido em gelo e rapidamente conduzido a -80 °C para serem utilizados nos protocolos do dano oxidativo e nos ensaios de biologia molecular (**Fig. 10 e 10.1**).

Figura 10 - Desenho experimental utilizado para indução com NaCl 0,9%, juntamente com o tratamento via oral com solvente Tween-80 2% ou ZOEB4 25 mg/Kg. Grupos (CT e Zoeb4 25).

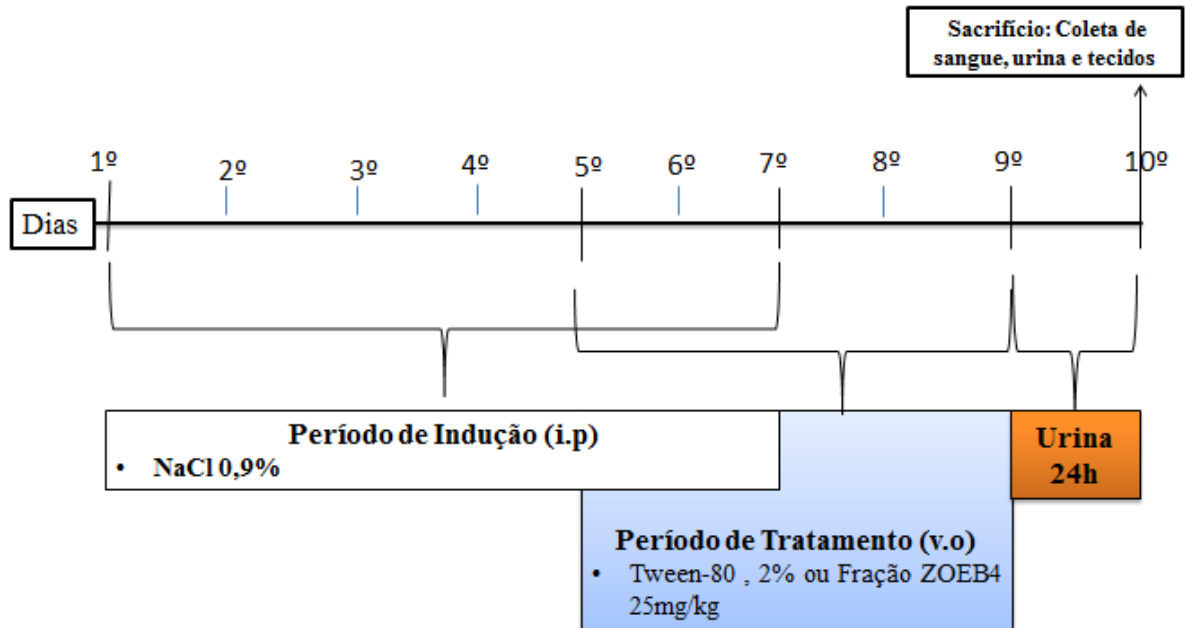
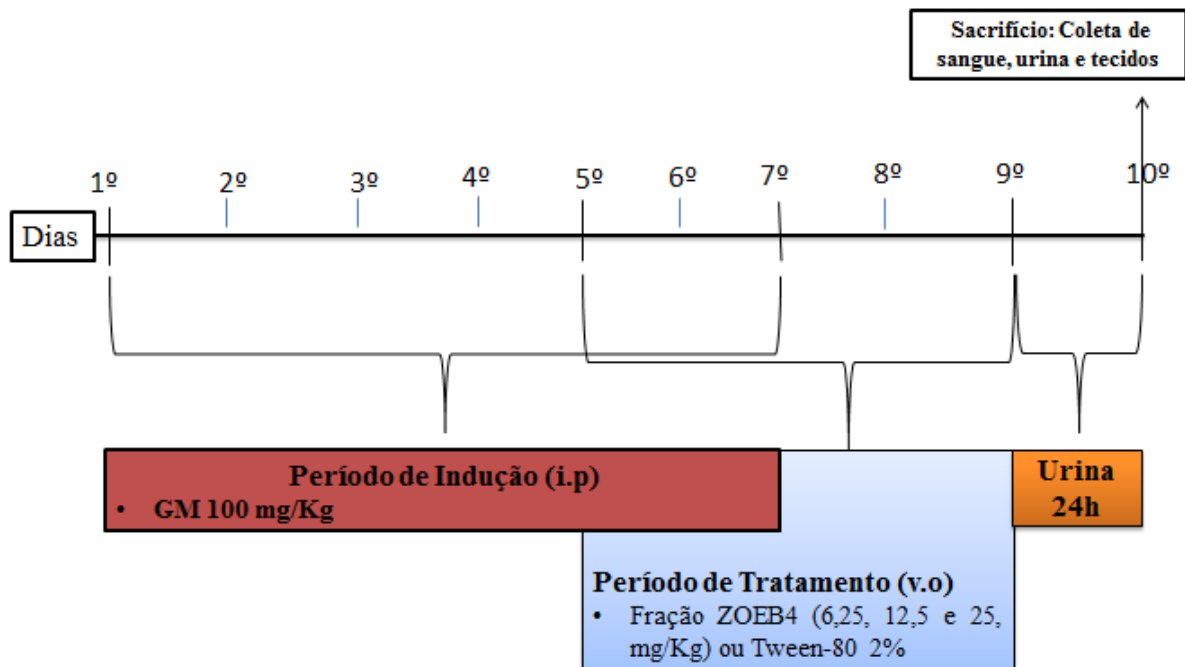


Figura 10.1 - Desenho experimental utilizado para indução com GM, juntamente com o tratamento via oral com fração ZOEB4 (6,25, 12,5 e 25 mg/Kg). Grupos GM + ZOEB4 (6,25, 12,5 e 25).



3.7 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. Estimou-se o Ritmo Filtração Glomerular (RFG) através do *clearance* de creatinina (Clcr), este foi utilizado para determinar a função renal dos animais e calculado por meio da seguinte fórmula:

$$Ccr = (crU \times Vu / Pcr)$$

Onde:

crU = concentração urinária creatinina (mg/dl); **Vu** = volume urinário (ml/min);

crP = concentração plasmática de creatinina (mg/dl).

Os valores do Clcr foram expressos em ml/min.

Para as dosagens de ureia e ácido úrico plasmático foi utilizado os kits Ureia CE e ácido úrico liquiform, já a proteína urinária e o cálcio urinário foram dosados utilizando os kits comerciais, SensiProt, e Cálcio liquiform respectivamente, todos comercialmente fornecidos pelo fabricante (Labtest®, Fortaleza, CE, Brasil) e, seguindo as recomendações de dosagens para cada kit. Todos os resultados foram dados em mg/dL.

3.8 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR

3.8.1 FRAÇÃO DA EXCREÇÃO DE SÓDIO E DE POTÁSSIO

A fração excretada de sódio (FENa⁺) e a fração excretada de potássio (FEK⁺) consistem nos percentis de Na⁺ e K⁺ filtrados e excretados na urina. Existe uma variação muito grande no manejo iônico destes durante os quadros de LRAs.

A fração de excreção de sódio (FENa⁺) e (FEK⁺) foi calculada a partir da mensuração de sódio e potássio urinário e plasmático por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil) pelo método eletrodo íon seletivo. Foi utilizado como diluente o Snap Park® (Roche, Brasil) para preparo da solução padrão e solução para mensuração de eletrólitos urinária. 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 e potássio foram determinadas as frações de excreção de Na^+ e K^+ (FENa^+ , FEK^+). Estes parâmetros servem para analisar do manejo renal de tais íons.

O cálculo utiliza as seguintes fórmulas:

$$\text{FENa}^+ = \frac{\text{Clearance Na}^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

$$\text{FEK}^+ = \frac{\text{Clearance K}^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

Os valores foram expressos em %.

3.9 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LÍPIDICA

3.9.1 DOSAGEM MALONDEALDEÍDO (MDA) URINÁRIO

Para analisar o estresse oxidativo renal desencadeado pelo tratamento com GM 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 H_2O 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 minutos 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).

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

Para confirmar o dano oxidativo direto no tecido renal, o grau de lipoperoxidação nos tecidos foi mesurado 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 homogenato dos tecidos renais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Retirou-se 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%. Colocou-se em 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 nMols de malondialdeído (MDA) por mg de proteína. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método adaptado de Bradford (1976).

3.10 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 quantificar nitrito em amostras por uma reação de diazotização, formando um cromóforo de cor rósea durante a reação. 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 consistiu na adição de 100 µL do sobrenadante do homogenato em 100 µL do reagente de Griess. Como controle negativo foi adicionado 100 µL do reagente em 100 µL de tampão PBS. Uma curva padrão foi construída para a quantificação do nitrito, através de uma diluição seriada com concentrações de 100, 50, 25 12,5, 6,25, 3,12, e 1,56 µM. A leitura feita na faixa de absorbância de 560 nm (GREEN et al., 2000).

3.11 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 é bem usado para analisar a atividade da GSH em amostra de tecidos. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzoico (TNB) de cor amarela que pode ser detectado por espectrofotometria (SEDLAK e LINDSAY, 1968).

Para avaliação das alterações no conteúdo tecidual renal de glutatona reduzida foi feito homogenato a 10% em solução gelada de EDTA 570,02 M. 40 µL de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato), adicionada a 50 µL de água destilada e 10 µL de TCA (ácido tricloro acético) 50%. O material foi centrifugado a 3000 g por 10 min e retirado 60 µL do sobrenadante, que foi adicionado à solução de DTNB em tampão Tris. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg). Todo o ensaio foi avaliado na absorbância de 412 nm e os resultados foram expressos em µg/mg de proteína.

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

A atividade da enzima SOD foi avaliada medindo-se a capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Nesse método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera O_2^- o qual reduz o NBT produzindo formazan, que absorve no comprimento de onda de 560nm segundo o método de Sun et al., (1988). Na presença de SOD a redução do NBT é inibida, determinando que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%.

O homogenato (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (10 minutos, 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 µL da amostra, 150µL do NBT 75µM e 300 µL de riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. A leitura foi feita espectrofotômetricamente em 560nm. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína.

3.13 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA

3.13.1 Extração do RNA total

As amostras foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração. Foi feito um homogenato com trizol e, em seguida, a extração de RNA foi realizada com o Kit RNeasy Lipid Tissue Mini (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, $1\mu\text{L}$ 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).

3.13.2 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 contém $1\mu\text{L}$ da enzima transcriptase reversa, $4\mu\text{L}$ do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para $200\text{ng}/\mu\text{L}$ e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para completar $20\mu\text{L}$. 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).

3.13.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Conforme a Tabela 5, foram avaliados na transcrição do mRNA os genes relacionados com o processo pró-inflamatório celular (TNF- α , IL-1B, IL-2 e INF- γ) com o aparelho do iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). O gene de referência utilizado foi o YWHAZ da fosfolipase A2 (Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta) (SOUSA et al., 2011).

Para a reação foi utilizado $10\mu\text{L}$ da Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), $2\mu\text{L}$ de cada iniciador ($0,2\mu\text{M}$) e $1\mu\text{L}$ de cDNA das amostras completando com água livre de nucleases para um volume final de $20\mu\text{L}$. Todos os

iniciadores utilizados e as condições da qPCR estão na Tabela 6. 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 (C_q ou C_t) 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')	Produto (pb)	n° NCBI	Condições do PCR	Fonte*
Resposta inata	TNF- α	S – GTACCCACTCGTAGCAAAC AS – AGTTGGTTGTCTTTGAGATCCATG	107	NM_021578	95°C - 20'' 60°C - 20'' 72°C - 45''	RTprimer ID: 3899
	IL-1 β	S – GACCTGTTCTTTGAGGCTGACA AS – CTCATCTGGACAGCCCAAGTC	78	AF079314.1		RTprimer ID: 3771
	IL-2	S – CAAGCAGGCCACAGAATTGA AS – CCGAGTTCATTTCCAGGCA	51	NM_030845.1		RTprimer ID:1307
	INF- γ	S – ACAGTAAAGCAAAAAAGGATGCA AS – GCTGGATCTGTGGGTTGTTT	69	NM_138880.2		RTprimer ID:4300
Transporte celular	Aquaporina-2	S – GAGCAGCATGTGGGAACT AS – AGCGTGGCCAAGAACTC	69	NM_012909.2	95°C - 20'' 58°C - 20'' 72°C - 45''	RTprimer ID:4280
Referência	YWHAZ	S – GCTACTTGGCTGAGGTTGCT AS – TGCTGTGACTGGTCCACAAT	61	NM_013011.3	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	Souza et. al., 2011

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

3.14 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

O rim direito foi seccionado transversalmente e armazenado em cassetes histológicos que foram imersos em formol 10% tamponado por 48 horas. Logo após esse período foi armazenado em álcool 70% até o processo de fixação. Depois da devida fixação dos tecidos. O material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser então 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 foi cortado em 5 μm de espessura e colocado 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 de hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada pelo patologista Msc. Daniel de Araújo Viana, sendo posteriormente registradas através de fotomicrografias.

Foram analisadas em microscópio óptico em diferentes aumentos de lente e, para a captura das imagens utilizou-se uma câmera de vídeo digital (Samsung®) acoplada ao microscópio, por onde ocorreu a digitalização das imagens.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Student-Newman-Keuls *post hoc*. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$.

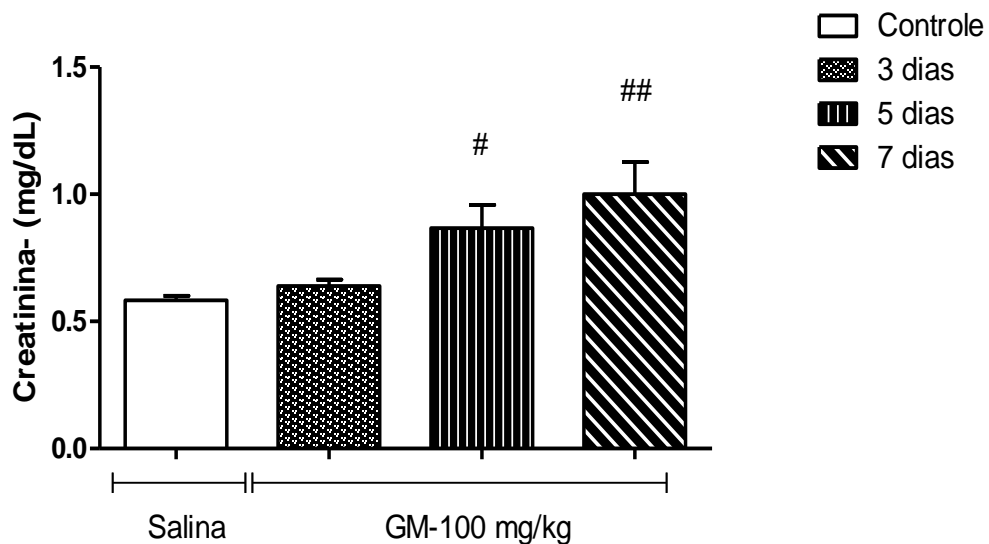
4 RESULTADOS

4.1. Efeito da administração em dias seguidos com GM sobre os níveis séricos de creatinina em um modelo piloto experimental.

Inicialmente para o desígnio da indução da nefrotoxicidade, realizou-se a administração de GM na dose de 100 mg/kg (i.p.) em distintos grupos durante 3, 5 e 7 dias. O grupo controle (salina) recebeu, durante sete dias, um volume equivalente de NaCl 0,9% (i.p.) similar aos grupos tratados com GMs.

Por meio da Figura 11 podemos observar que os animais tratados com GM, após 5 e 7 dias ($0,86 \pm 0,09$ mg/dL e $1,02 \pm 0,12$ mg/dL, respectivamente), apresentaram aumento significativo nos níveis de creatinina séricas em relação ao controle ($0,58 \pm 0,02$ mg/dL). Conforme este resultado e, baseado nesta escala temporal de administração, o período de administração em 7 dias foi o escolhido para a indução da disfunção renal (**Fig. 11**).

Figura 11 - Alteração nos níveis de creatinina sérica induzida pelo tratamento com GM em ratos.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da concentração de creatinina plasmática (mg/dL) nos grupos 3 dias (n=5), 5 dias (n=6) e 7 dias (n=6) tratados com GM (100mg/kg, i.p.) ou NaCl 0,9% i.p.(controle). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do Teste de Newman Keuls. Os valores significativos tinham #P < 0,05 e ##P < 0,01 em comparação com o grupo controle.

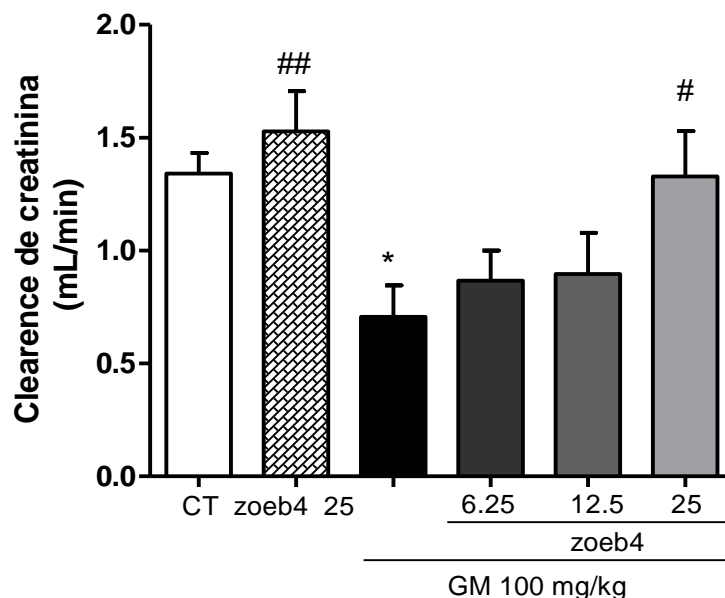
4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

4.2.1 Efeito da fração ZOEB4 sobre o RFG (*Clearance* de creatinina) em animais tratados com GM.

O Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) foi determinado pelo *Clearance* de Creatinina (Clcr). A administração de GM reproduziu o modelo de LRA nos animais dos grupos GM ($0,70 \pm 0,1$ mL/min), resultando na diminuição significativa do Clcr quando comparado ao grupo CT ($1,3 \pm 0,1$ mL/min).

O tratamento concomitante com a fração ZOEB4 proporcionou melhoria no RFG nos animais, conforme o resultado do grupo GM+ZOEB4 25 ($1,3 \pm 0,2$ mL/min) frente ao grupo GM ($P < 0,05$). Observou-se que o grupo Zoeb4 25 ($1,5 \pm 0,23$ mL/min), tratados com fração gingeróis, não alterou a função renal, expressando assim, resultado equivalente ao grupo controle (**Fig. 12**).

Figura 12 - Efeito da fração ZOEB4 sobre o *clearance* de creatinina em ratos com nefrotoxicidade por GM.



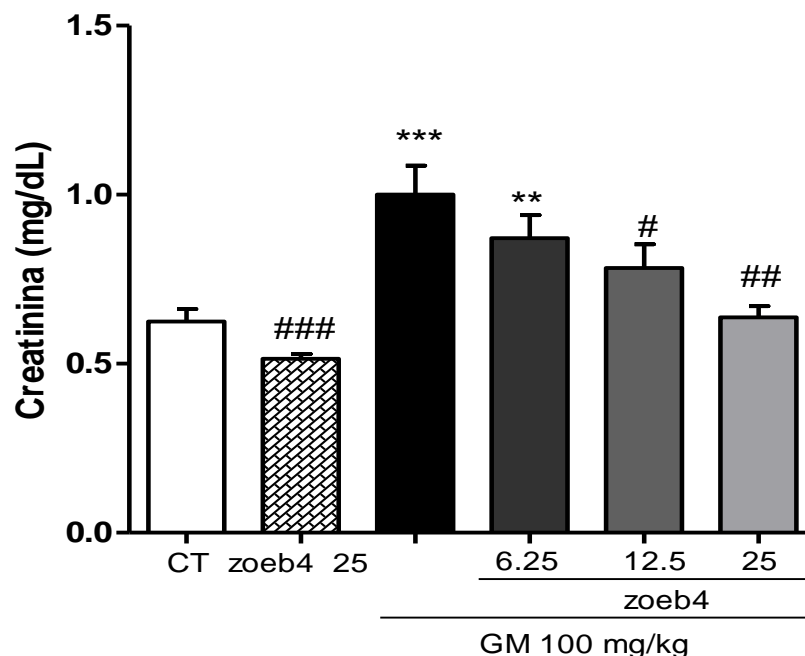
Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. do RFG no período de 24h em animais com o padrão de lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p. + Tween80-2%, v.o.), zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham * $P < 0,05$ vs CT, ## $P < 0,01$ vs GM e # $P < 0,05$ vs GM.

4.2.2 Efeito da fração ZOEB4 sobre a concentração plasmática de creatinina em animais tratados com GM.

Conforme os valores apresentados na figura 13, observou-se uma diferença significativa nos níveis de creatinina entre o grupo GM ($1,0 \pm 0,08$ mg/dL), frente ao grupo ao CT ($0,62 \pm 0,03$ mg/dL) demonstrando assim, o acúmulo sistêmico deste composto nos animais do grupo nefrotóxico.

Notou-se uma redução significativa desse parâmetro no grupo GM+ZOEB4 12,5 ($0,78 \pm 0,07$ mg/dL) assim como no grupo GM+ZOEB425 ($0,63 \pm 0,032$ mg/dL) quando confrontados ao grupo GM. Este achado demonstra o papel protetor dos gingeróis. Desta forma, a fração ZOEB4 contribuiu para a não acumulação sistêmica deste metabólito, aumentando a filtração e excreção e, desta forma, reforçando o resultado anterior. Nota-se diante do resultado do grupo zoeb4 25 ($0,51 \pm 0,01$ mg/dL) que o mesmo obteve valores estatisticamente não diferentes em relação ao grupos CT ($P < 0,05$). (Fig.13).

Figura 13 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de creatinina plasmáticas em ratos com nefrotoxicidade por GM.



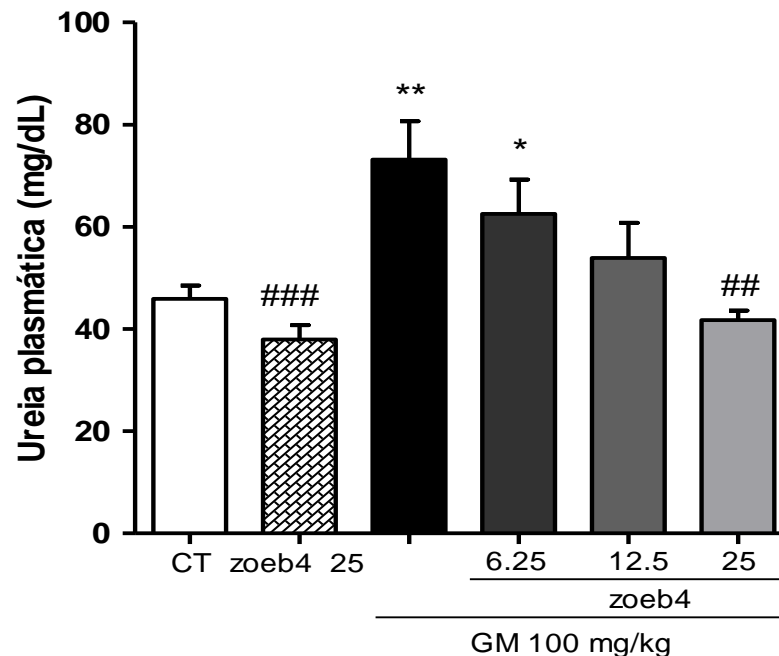
Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da concentração de creatinina no período de 24h em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p. + Tween80-2%, v.o.), Zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p.+ ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham *** $P < 0,001$ vs CT, ** $P < 0,01$ vs CT, ### $P < 0,001$ vs GM e ## $P < 0,01$ vs GM .

4.2.3 Efeito da Fração ZOEB4 sobre a concentração plasmática de ureia em animais tratados com GM.

A figura 14 demonstra diferença significativa na concentração plasmática de ureia entre o grupo GM ($73,18 \pm 7,50$ mg/dL) frente ao grupo CT ($45,2 \pm 2$, mg/dL). Desta forma, nota-se o acúmulo deste metabólito após o tratamento com GM.

Foi encontrada uma redução significativa desse parâmetro nos grupos GM+ZOEB4 12,5 ($53,88 \pm 6,94$) e estatisticamente significativo em GM+ZOEB4 25 ($41,75 \pm 1,8$ mg/dL) quando comparados aos grupos GM. Este achado demonstra e reforça o papel protetor da fração ZOEB4. Similar ao resultado da creatinina. Observa-se que o grupo zoeb4 25 ($37,95 \pm 2,83$ mg/dL) obteve valores estatísticos semelhante aos grupos CT e GM+ZOEB4 25 ($P < 0,05$) (Fig.14).

Figura 14 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de ureia plasmática em ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da concentração de ureia no período de 24h, em animais com lesão nefrotóxica tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p.+ ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham ** $P < 0,01$ vs CT, ### $P < 0.001$ vs GM e ## $P < 0.01$ vs GM.

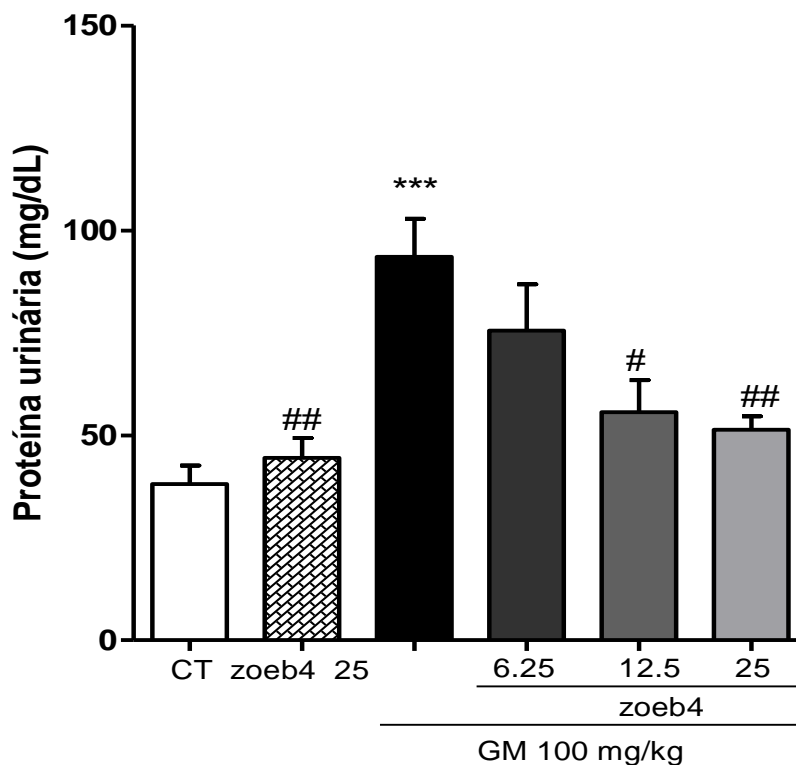
4.2.4 Efeito da fração ZOEB4 sobre a concentração de proteína urinária em animais tratados com GM.

Conforme expresso na figura 15 ocorreu um aumento dos níveis de proteína urinária (PU) significativo no grupo GM. Esse dado mostra o surgimento de uma provavelmente, além da lesão tubular, também um dano glomerular nos animais tratados com GM. Isto foi notável quando se compara o grupo GM ($93,5 \pm 9,0$ mg/dL) em relação ao grupo CT ($38,53 \pm 4,5$ mg/dL).

A associação do tratamento concomitante com a fração ZOEB4 demonstrou efetividade na redução na excreção de proteína urinária, de forma notável nos grupos GM+ZOEB4 12,5 ($55,68 \pm 7,74$ mg/dL) e GM+ZOEB4 25 ($51,36 \pm 3,24$ mg/dL) quando esses grupos foram comparados aos animais do grupo GM ($P < 0,05$).

O grupo controle que recebeu zoeB4 25 apresentou valores baixos de PU ($44,53 \pm 4,82$ mg/dL), valor este estatisticamente semelhante ao grupo CT (**Fig. 15**).

Figura 15 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores de proteína urinária em ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da concentração de proteína urinária de 24h, em animais com lesão nefrotóxica tratados, concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%,

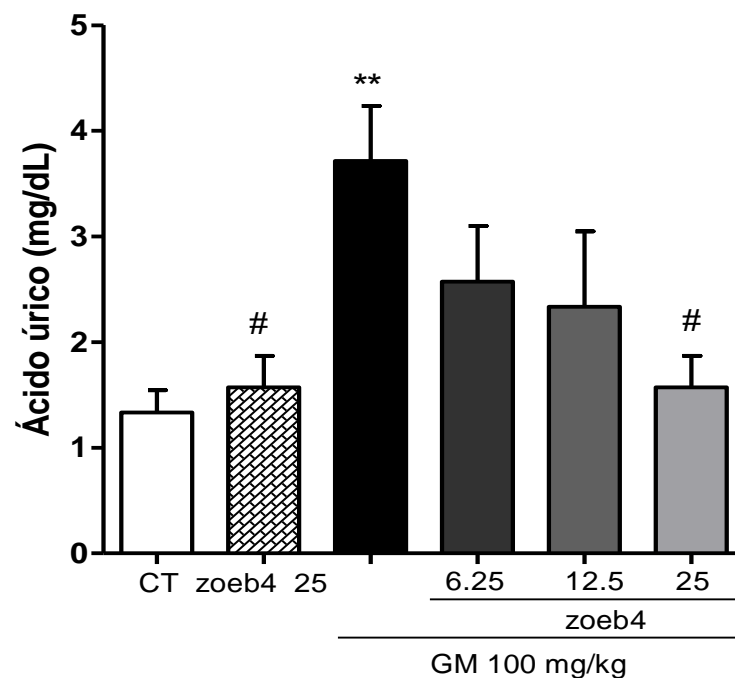
v.o.), Zob4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham ***P < 0,0001 vs CT, ##P < 0.01 vs GM e #P < 0.05 vs GM.

4.2.5 Efeito da fração ZOEB4 sobre a concentração plasmática de ácido úrico em animais tratados com GM.

Estão representados na figura 16 os níveis séricos de ácido úrico. Este metabólito dos ácidos nucleicos, geralmente encontra-se elevado nos quadros de LRAs desencadeados por necrose tubular aguda, sendo assim, um indicativo útil para o diagnóstico dos quadros de disfunção renal. Ocorreu uma diferença significativa entre o grupo GM ($3,71 \pm 0,52$ mg/dL) frente ao grupo CT ($1,33 \pm 0,2$ mg/dL). Confirmando o quadro de disfunção renal pela administração de GM.

O grupo GM+ZOEB4 25($1,57 \pm 0,2$) apresentou valores menores de ácido úrico em relação aos grupos GM ($P < 0,05$). Observa-se que o valor estatístico dos animais do grupo zoeb4 25 ($1,57 \pm 0,30$ mg/dL) foi próximo ao grupo CT ($P < 0,05$) (**Fig. 16**).

Figura 16 - Efeito da Fração ZOEB4 sobre os níveis plasmáticos de ácido úrico em ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média ± E.P.M. da concentração plasmática do ácido úrico no período de 24h, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p.

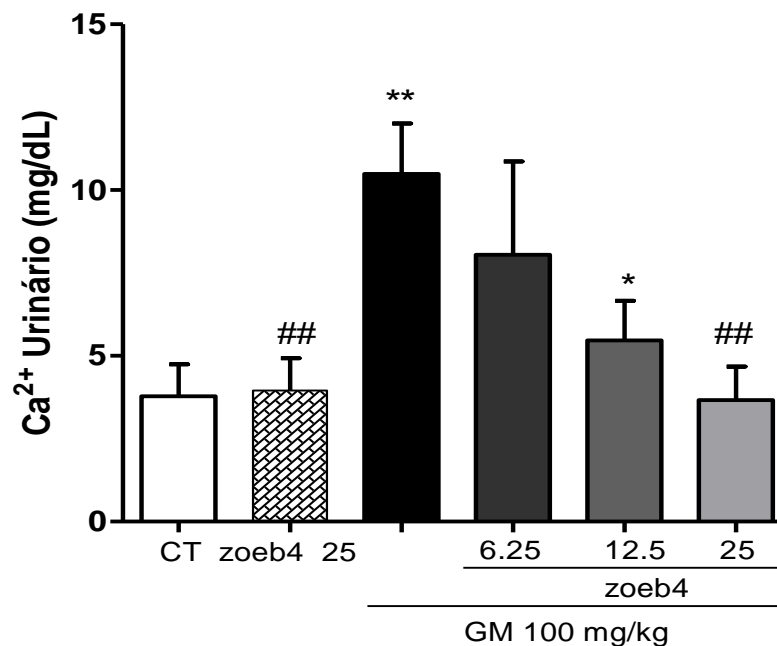
+ tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p.+ ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham **P<0,01 vs CT e #P<0.05 vs GM.

4.2.6 Efeito da fração ZOEB4 sobre a concentração Ca^{++} urinário em animais tratados com GM.

Evidenciam-se na figura 17 os valores de Ca^{++} urinário. Esse parâmetro pode ser utilizado como índice de disfunção renal, com alterações no transporte tubular. Foi estatisticamente significativo a diferença entre o grupo GM ($10,49 \pm 1,52$ mg/dL) frente ao grupo CT ($3,78 \pm 0,96$ mg/dL), demonstrando assim, um quadro de disfunção renal como provável dano tubular pela administração de GM.

Notavelmente, foi observado um papel protetor no grupo GM+ZOEB4 25 ($3,67 \pm 1,01$ mg/dL), apresentando valores menores de Ca^{++} urinário em relação ao grupo GM ($P>0,05$). Observa-se que os animais do grupo zoeb4 25 ($3,95 \pm 0,98$ mg/dL) obtiveram valores estatísticos semelhantes aos grupos CT e GM + ZOEB4 25 ($P<0,05$) (Fig.17).

Figura 17 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de Ca^{++} urinário em ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da concentração urinária de Ca^{++} durante 24h, em animais com de lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4 Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-

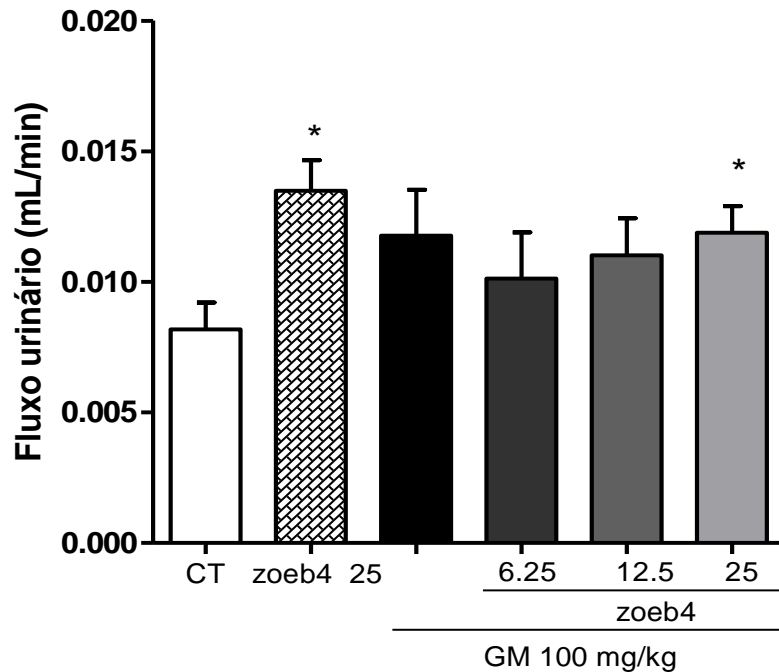
2%, v.o.), zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham **P < 0,01 vs CT e ##P < 0.01 vs GM.

4.3 AVALIAÇÃO DO FLUXO URINÁRIO

4.3.1 Efeito da fração ZOEB4 sobre fluxo urinário em animais tratados com GM.

Na figura 18 estão representados os valores do fluxo urinário de cada grupo, constituindo como critério para confirmação da fase na qual a LRA se encontrava. Em relação a esse parâmetro, não se observou diferença significativa entre o grupo GM ($0,011 \pm 0,0017$ mL/min) frente ao grupo CT ($0,0082 \pm 0,0010$ mL/min) , classificando assim a LRA como não oligúrica. Notou-se uma elevação significativa desse parâmetro nos grupos GM+ZOEB4 25 ($0,012 \pm 0,0010$ mL/min) e zoeb4 25 ($0,014 \pm 0,0011$ mL/min) quando comparado aos grupos CT (P<0,05). Esse achado expressa um possível efeito diurético da fração ZOEB4 advindo consequentemente dos gingeróis. Além disso, ressalta-se que não observou-se diferenças significativas entre a ingesta hídrica dos grupos, fator este que poderia interferir no resultado (**Fig. 18**).

Figura 18 - Efeito da fração ZOEB4 sobre o fluxo urinário de ratos com nefrotoxicidade por GM.

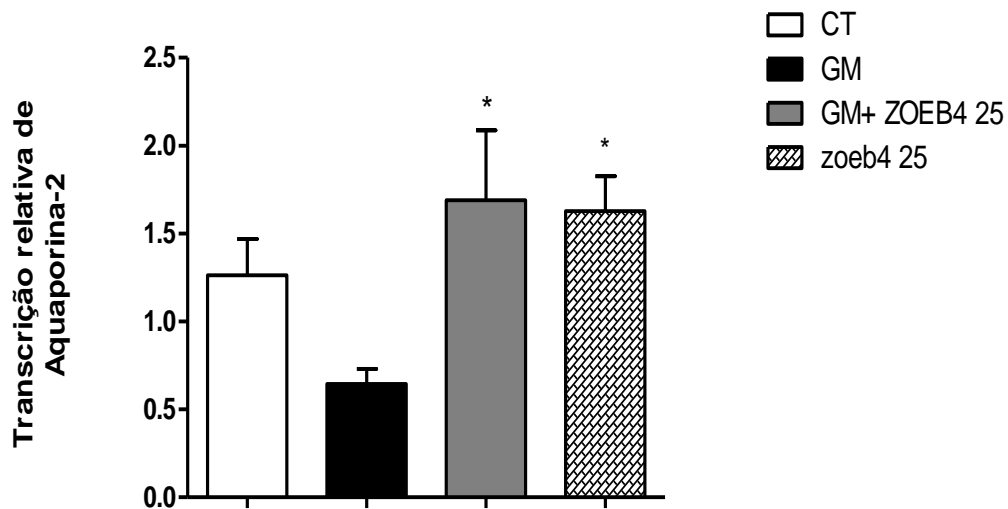


Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. do fluxo urinário no período de 24h em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitantemente com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p.. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham * $P < 0,05$ vs CT.

4.3.2 Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis transcricionais de aquaporina-2 em animais tratados com GM tratados com ZOEB4.

Conforme a figura 19 identificou-se que o grupo GM ($0,64 \pm 0,09$) obteve uma redução considerável na transcrição gênica de aquaporina-2 em relação ao grupo CT ($1,26 \pm 0,20$), sendo estatisticamente significativo diante ao grupo GM+ZOEB4 25 ($1,6 \pm 0,40$). Desta forma, o dado para o grupo GM contribui para justificar o aumento da excreção de água observado nos animais deste grupo, observado no resultado anterior, além de indicar uma LRA não-oligúrica. Essa redução também foi relevante diante o grupo zoeb4 25 ($1,63 \pm 0,20$), demonstrando que o efeito diurético do composto ZOEB4 foi oriundo de outro(s) mecanismo(s), ($P < 0,05$) (Fig. 19).

Figura 19 - Efeito da fração ZOEB4 sobre a transcrição gênica de aquaporina-2 em ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores da transcrição gênica de aquaporina-2 no tecido renal. CT (NaCl 0,9%, i.p. + Tween80-2%, v.o.), GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 25 mg/kg, v.o.) e ZOEB4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham $*P < 0,05$ vs GM.

4.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR

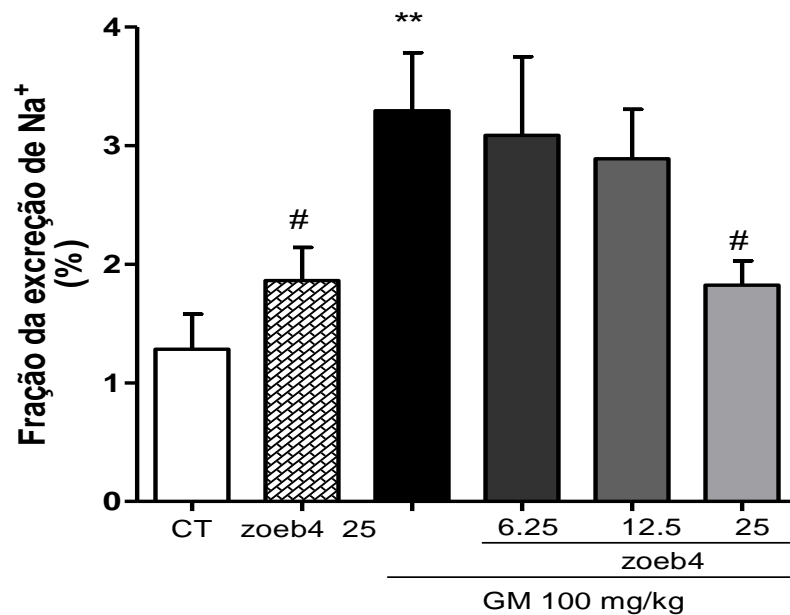
4.4.1 Efeito da fração ZOEB4 sobre a fração de excreção de Na^+ e K^+ em animais tratados com GM.

A fração excretada de sódio (FENa) e a fração excretada de potássio (FEK) consistem nos percentuais de sódio e potássio filtrados e excretados na urina. A figura 20 mostra que o grupo GM elevou significativamente os níveis de excreção de Na^+ . Esse aumento foi observado no grupo GM ($3,29 \pm 0,48$ %) quando comparado ao grupo CT ($1,29 \pm 0,29$ %), mostrando assim uma inabilidade dos rins dos animais tratados com GM em manter a função tubular adequada. Notável que o tratamento com ZOEB4 foi efetivo, se contrapôs a essa maior excreção, um efeito observado no grupo GM+ZOEB4 25 ($1,82 \pm 0,21$ %) quando comparado ao grupo GM ($P < 0,05$). Seguindo os resultados anteriores, os animais do grupo zoeb4 25 ($1,86 \pm 0,27$ %) apresentaram valores estatisticamente diferentes em relação aos grupos CT e GM + ZOEB4 25, ($P < 0,05$) (**Fig. 20**).

Já na figura 21, assim como o resultado anterior, demonstrou valores nos quais o grupo GM alcançou níveis maiores e significativos na excreção de K^+ . Esses valores são

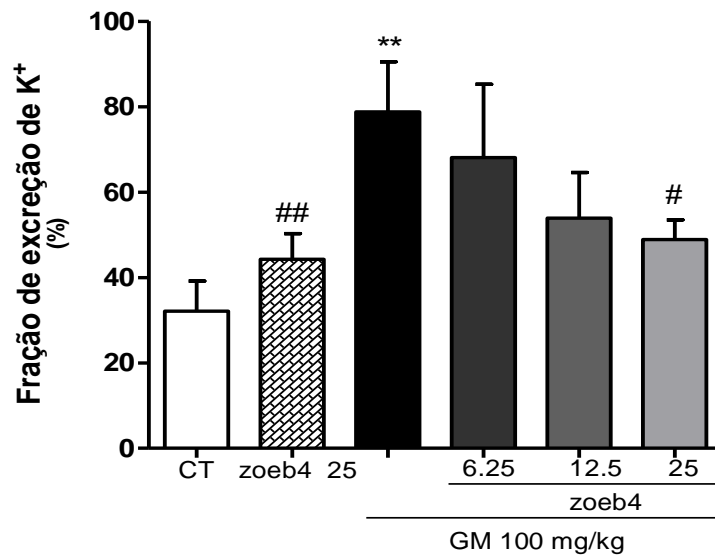
observados GM ($78,28 \pm 7,63$ %) frente ao grupo e CT ($32,11 \pm 7,04\%$), reforçando o resultado do grau lesivo tubular. Efetivamente esses valores foram reduzidos no grupo GM+ZOEB4 25 ($48,87 \pm 4,60$ %) quando comparados ao grupo GM ($P<0,05$). Os animais do grupo zoeb4 25 ($44,24 \pm 5,99$) apresentaram valores similares aos grupos CT e GM+ ZOEB4 25, ($P<0,05$) (Fig. 21).

Figura 20 - Efeito da fração ZOEB4 sobre a fração de excreção de Na^+ em ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da fração de excreção de Na^+ de 24h, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham * $P<0,05$ vs CT e # P vs GM.

Figura 21 - Efeito da fração ZOEB4 sobre a fração de excreção de K^+ em ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da fração de excreção de K^+ de 24h, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p.. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham ** $P < 0,01$ vs CT e ## $P < 0,01$ vs GM e # $P < 0,05$ vs GM.

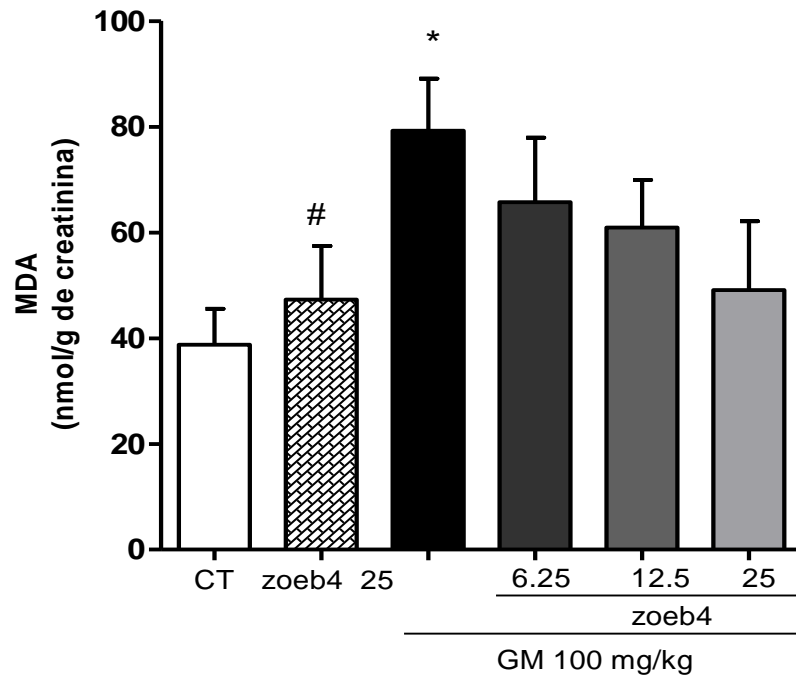
4.5 PERFÍL DO DANO OXIDATIVO

4.5.1 Avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA).

4.5.1.1 Determinação de MDA urinário em animais tratados com GM e tratados com ZOEB4.

A figura 22 mostra que o grupo GM apresentou maiores valores de MDA urinários, GM ($79,25 \pm 9,87$ nmol/g de creat.) quando comparados aos grupo e CT ($38,75 \pm 6,78$ nmol/g de creat). Os animais do GM+ZOEB4 25 ($49,11 \pm 13,01$ nmol/g de creat.) apresentaram valores menores que os o grupo GM, demonstrando assim, uma tendência deste composto a deter papel protetor contra o dano oxidativo da GM. O grupo zoeb4 25 ($47,34 \pm 10,14$ nmol/g de creat.) não apresentou alteração nos valores desse parâmetro, possuindo valores estatísticos próximos ao grupo CT ($P < 0,05$) (Fig. 22).

Figura 22 - Efeito da Fração ZOEB4 sobre os valores de malonaldeído urinário em ratos com nefrotoxicidade por GM.

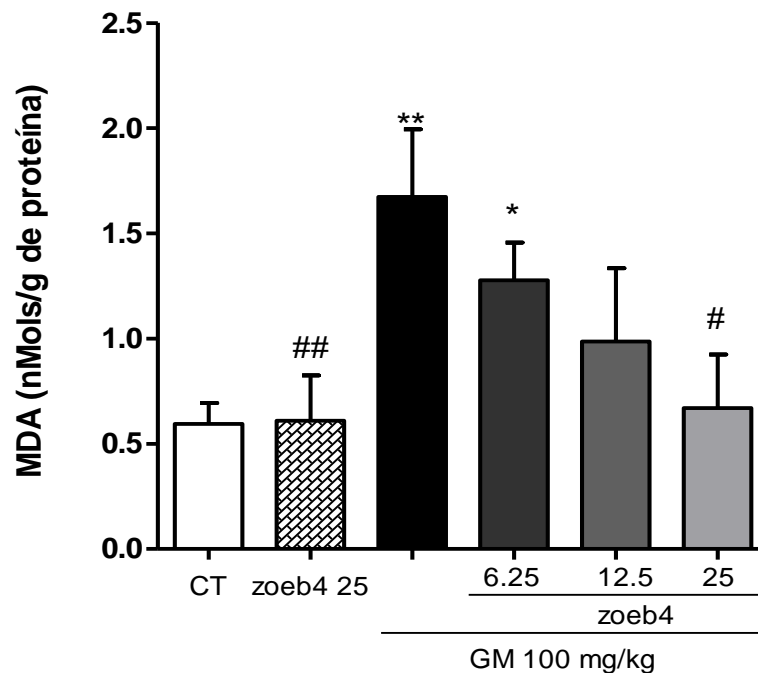


Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores malondeldeído (MDA) de 24h, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), Zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham * $P < 0,05$ vs CT e # $P < 0,05$ vs GM.

4.5.1.2 Determinação do malondialdeído (MDA) no tecido renal dos animais tratados com GM e ZOEB4.

A figura 23 apresenta valores nos quais o grupo GM obteve valores consideravelmente altos de MDA no tecido renal, GM ($1,71 \pm 0,36$ nMols/g de prot.) quando confrontados ao grupo CT ($0,59 \pm 0,10$ nMols/g de prot.). Os animais do GM+ZOEB4 25 ($0,67 \pm 0,26$ nMols/g de prot.) apresentaram valores significantes menores que os o grupo GM ($P < 0,05$). O grupo zoeb4 25 ($0,61 \pm 0,21$ nMols/g de prot.) não apresentou alteração nos valores desse parâmetro, detendo valores estatísticos similares aos grupos CT e GM+ ZOEB4 25 ($P < 0,05$), (Fig. 23).

Figura 23 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores MDA em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por Gentamicina.



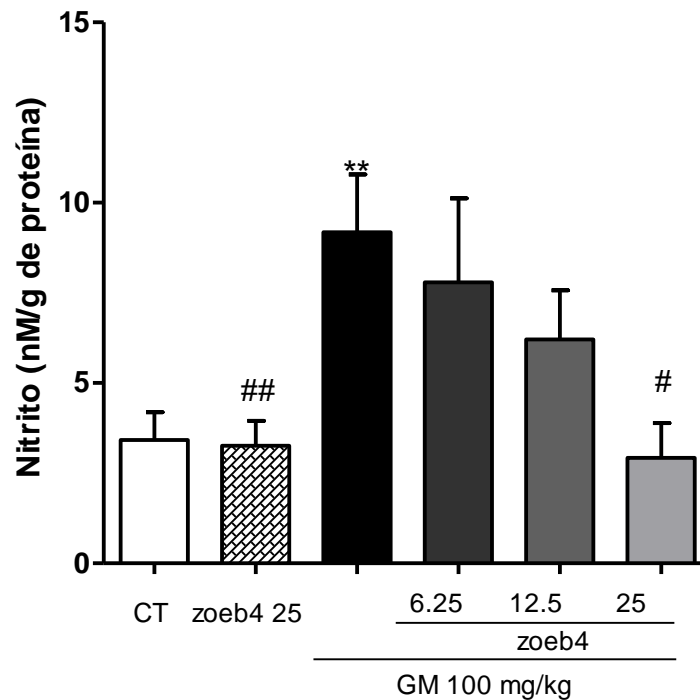
Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores malonaldeído no tecido renal, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), Zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham * $P < 0,01$ vs CT, ## $P < 0,01$ vs GM e # $P < 0,05$ vs GM.

4.6 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (ON)

4.6.1 Determinação do níveis de nitrito em animais tratados com GM e continuamente com a fração ZOEB4.

A figura 24 apresenta valores nos quais o grupo GM obteve aumento no nitrito total. GM ($9,14 \pm 1,5$ nM/g de prot.) quando em relação ao grupo CT ($3,42 \pm 0,77$ nM/g de prot.). Os animais do grupo GM+ZOEB4 25 ($2,9 \pm 0,967$ nM/g de prot.) apresentaram valores significantes menores do que o grupo GM. Já o grupo zoeb4 ($3,26 \pm 0,69$ nM/g de prot.) não apresentou alteração nos valores desse parâmetro, detendo valores próximos aos grupos CT e GM+ ZOEB4 25, ($P < 0,05$) (Fig.24).

Figura 24 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores de nitrito em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores de nitrito no tecido renal, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitantemente com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), ZOEB4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham **P < 0,01 vs CT, ##P < 0,01 vs GM e #P < 0,05 vs GM.

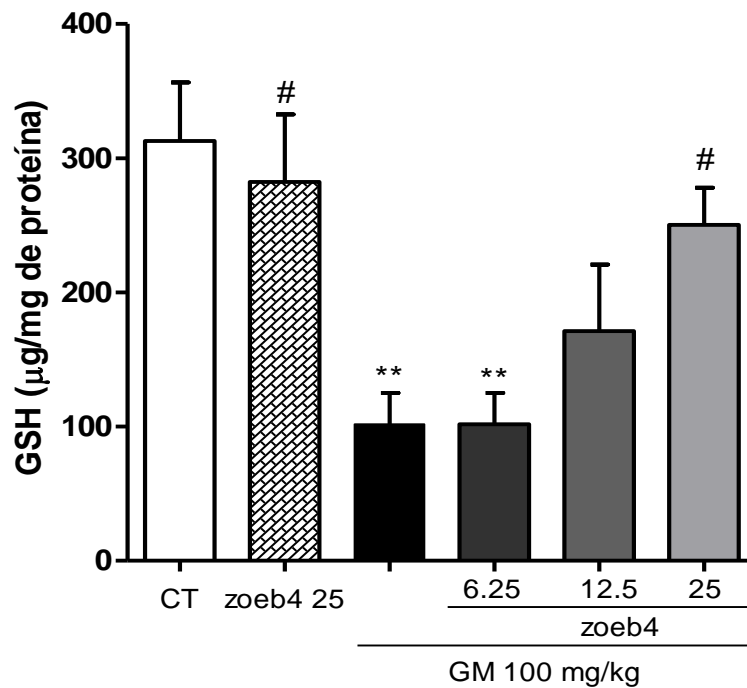
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

4.7.1 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) em animais tratados com GM e ZOEB4.

Conforme resultado da figura 25, o tratamento com GM foi efetivo em reduzir os valores de glutathiona reduzida nos animais do grupo GM ($101,6 \pm 23,41 \mu\text{g}/\text{mg prot}$) quando comparado ao grupo CT ($312,7 \pm 43,6 \mu\text{g}/\text{mg prot}$). Os animais do GM+ZOEB4 25 ($250,20 \pm 27,77 \mu\text{g}/\text{mg prot}$) apresentaram valores significantes maiores do que o grupo GM, demonstrando assim, uma proteção tecidual contra o dano oxidativo da GM. O grupo zoeb4 25 ($309,4 \pm 50,10 \mu\text{g}/\text{mg prot}$), como quase todos os resultados anteriores, não apresentou

alteração nos valores desse parâmetro, expressando valores semelhantes aos grupos CT e GM+ ZOEB4-25, ($P < 0,05$) (Fig. 25).

Figura 25 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os níveis de GSH em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.



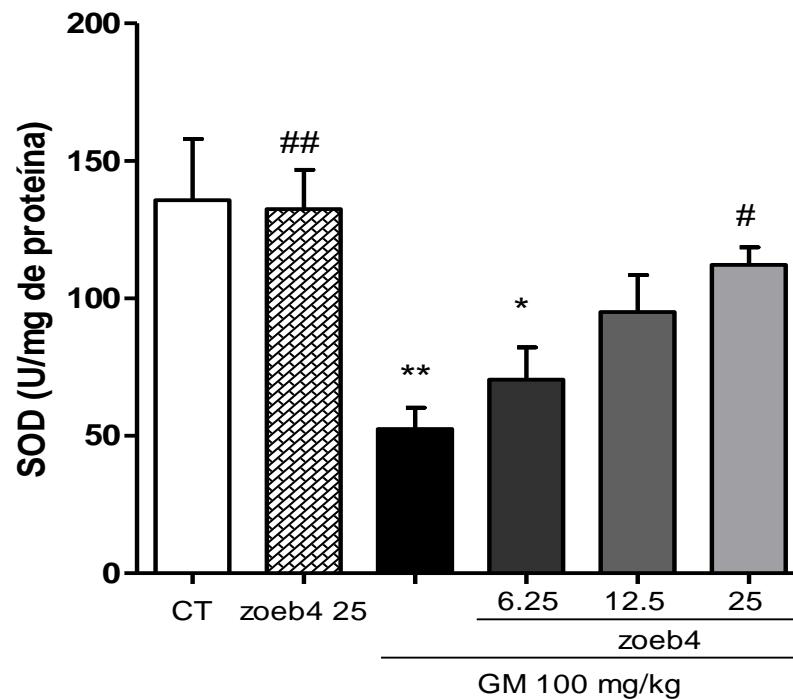
Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores de GSH no tecido renal, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), ZOEB4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham ** $P < 0,01$ vs CT, # $P < 0,05$ vs GM.

4.7.2 Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no tecido renal de ratos induzidos com GM, tratados com ZOEB4.

A figura 26 mostra que o grupo GM obteve valor diminuído na atividade da SOD, conforme os resultados dos animais deste grupo, GM ($52,4 \pm 7,73$ U/mg de prot.), quando confrontados aos grupo CT ($135,7 \pm 22,2$ U/mg de prot.). Os animais do GM+ZOEB4 25 ($112,2 \pm 6,40$ U/mg de prot.) apresentaram valores significante maiores do que o grupo GM, demonstrando assim, como no resultado que antecedeu a este, a capacidade de proteção da

fração ZOEB4 contra a dano oxidativo da GM. O grupo ZOEB4 ($132,60 \pm 10,74$ U/mg de prot.) equiparou-se estatisticamente aos grupos CT e GM+ ZOEB4 25, ($P < 0,05$) (Fig. 26).

Figura 26 - Efeito da fração ZOEB4 sobre a atividade da SOD no tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores de Superóxido Dismutase no tecido renal, em animais com lesão nefrotóxica, tratados concomitante com a fração ZOEB4. Grupos: CT (NaCl 0,9%, i.p.+ Tween80-2%, v.o.), ZOEB4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.) GM gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, v.o.) . A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham ** $P < 0,01$ vs CT, * $P < 0,05$ vs CT, # $P < 0,05$ vs GM e ## $P < 0,05$ vs GM.

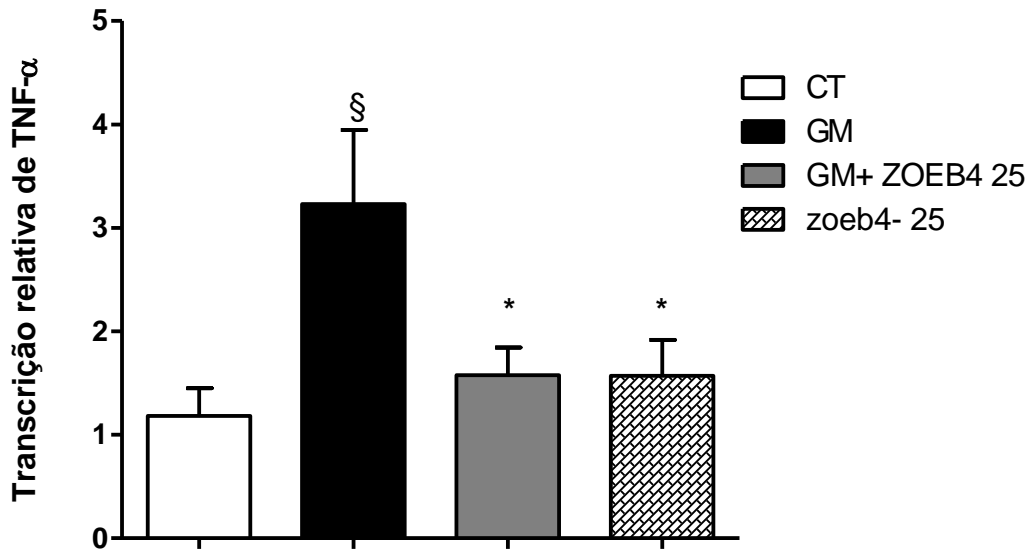
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PRÓ-ANTINFLAMATÓRIA

4.8.1 Avaliação da transcrição genica TNF- α no tecido renal de ratos induzidos com GM, tratados com ZOEB4.

A figura 27 mostra que o grupo GM ($3,23 \pm 0,71$) obteve aumento significativo na transcrição gênica de TNF- α diante do grupo CT ($1,18 \pm 0,27$). Desta forma, indicando a promoção da resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da danificado, além de ativá-los. O grupo GM+ZOEB4 25 ($1,57 \pm$

0,27) obteve valor significativo menor do que o grupo GM, demonstrando assim, um possível efeito anti-inflamatório da fração ZOEB4. O grupo ZOEB4 25 ($1,74 \pm 0,34$) equiparou-se estatisticamente aos grupos CT, e GM+ ZOEB4 25, ($P < 0,05$) (**Fig. 27**).

Figura 27 - Efeito da fração ZOEB4 sobre a transcrição gênica de TNF- α no tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.

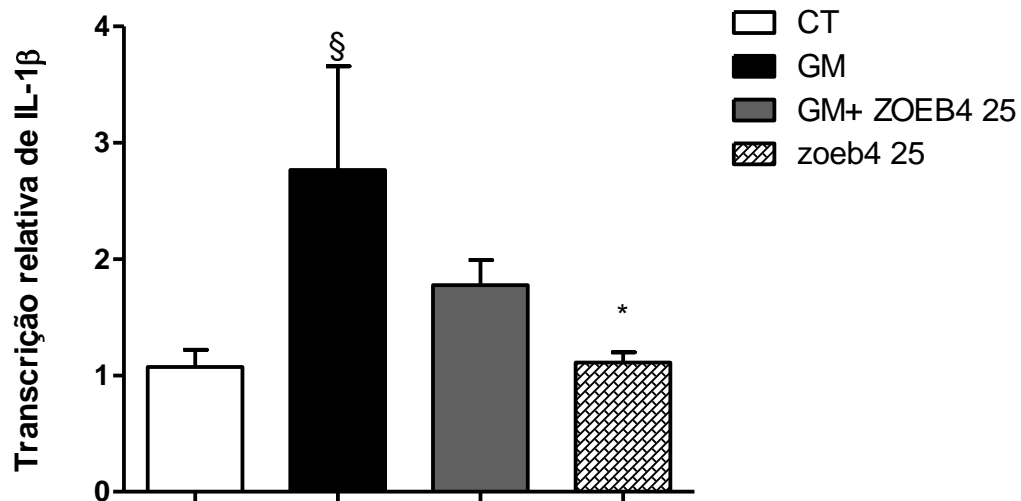


Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores da transcrição gênica de TNF- α no tecido renal. CT (NaCl 0,9%, i.p. + Tween80-2%, v.o.), GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. GM+ ZOEB4 25 mg/kg, v.o.) e ZOEB4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham § $P < 0,05$ vs CT, * $P < 0,05$ vs GM.

4.8.2 Avaliação da transcrição gênica de IL-1 β e IL-2 no tecido renal de ratos induzidos com GM, tratados com ZOEB4.

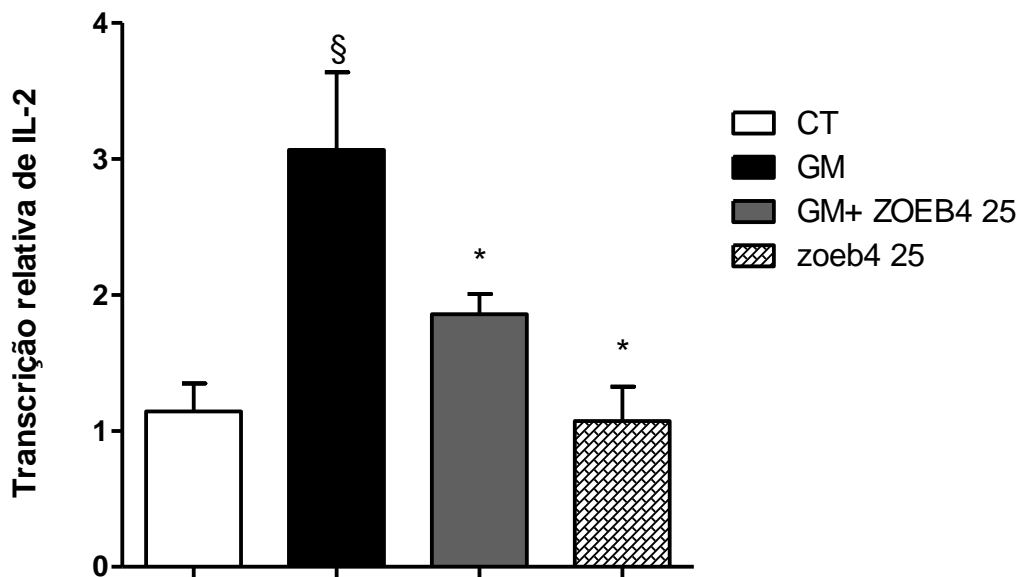
Conforme a figura 28 o grupo GM ($2,77 \pm 0,89$) obteve valor significativamente elevado na transcrição gênica para IL1- β comparada ao grupo CT ($1,07 \pm 0,15$) e ao grupo zoeb4 25 ($1,11 \pm 0,08$). O grupo GM+ZOEB4 25 ($1,78 \pm 0,22$) apresentou valor reduzido diante do grupo GM, porém não significativo (**Fig.28**). Conforme os resultados da figura 29, os resultados de transcrição para IL-2, demonstraram um significativo aumento na expressão desta citocina nos grupos GM ($3,07 \pm 0,57$) quando comparado aos demais grupos analisados: CT ($1,14 \pm 0,21$); GM+ZOEB4 25 ($1,86 \pm 0,15$) e zoeb4 25($1,07 \pm 0,25$), indicando mais uma vez o efeito anti-inflamatório dos compostos contidos na fração ZOEB4 ($P < 0,05$) (**Fig. 28**).

Figura 28 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores da transcrição gênica de IL-1 β em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores da transcrição gênica de IL-1 β no tecido renal. CT (NaCl 0,9%, i.p. + Tween80-2%, v.o.), GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween 80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. GM+ ZOEB4 25 mg/kg, v.o.) e zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham §P < 0,05 vs CT, *P < 0,05 vs GM.

Figura 29 - Efeito da fração ZOEB4 sobre os valores da transcrição gênica de IL-2 em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.



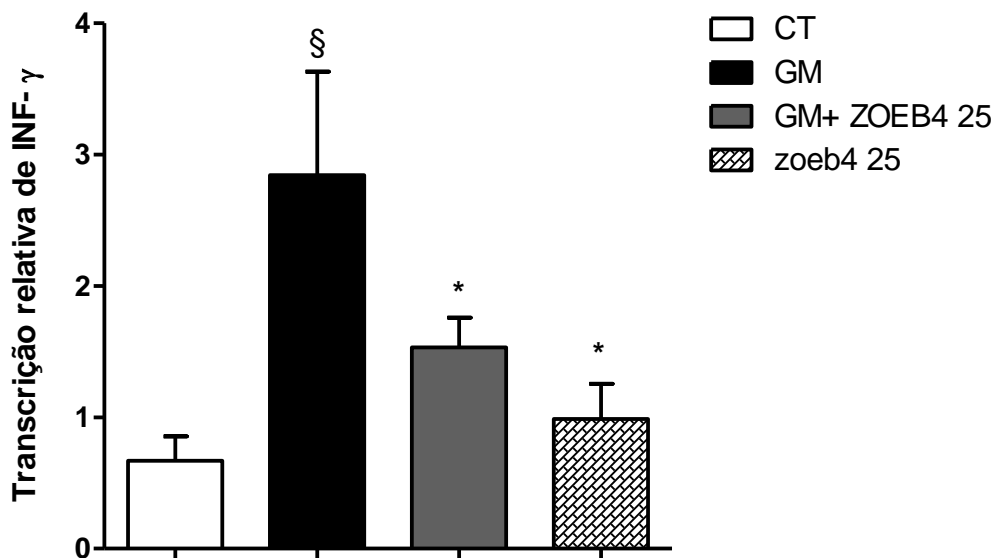
Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores da transcrição genica de IL-1 β no tecido renal. CT (NaCl 0,9%, i.p. + Tween80-2%, v.o.), GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween 80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. GM+ ZOEB4 25 mg/kg, v.o.) e zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg,

v.o.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham §P < 0,05 vs CT, *P < 0,05 vs GM.

4.8.2 Avaliação da transcrição genica de IFN- γ no tecido renal de ratos induzidos com GM, tratados com ZOEB4.

Conforme a figura 30, o grupo GM ($2,84 \pm 0,79$) aumentou a transcrição gênica para esse mediador significativamente em relação ao grupo CT ($0,67 \pm 0,19$). Ressalta-se que o grupo GM+ZOEB4 25 ($1,53 \pm 0,23$) reduziu relevantemente essa elevação. Diferença estatística semelhante teve o grupo zoeb4 25 ($0,99 \pm 0,27$) (P < 0,05) (**Fig. 30**).

Figura 30 - Resultado referente ao efeito da fração ZOEB4 sobre os valores da transcrição gênica de INF- γ em tecido renal de ratos com nefrotoxicidade por GM.



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. os valores da transcrição genica de IL-1 β no tecido renal CT (NaCl 0,9%, i.p. + Tween80-2%, v.o.), GM (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + tween 80-2%, v.o.) GM + ZOEB4 (gentamicina 100 mg/kg, i.p. + ZOEB4 25 mg/kg, v.o.) e zoeb4 25 (NaCl 0,9%, i.p. + ZOEB4 25mg/kg, v.o.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os valores significativos tinham §P < 0,05 vs CT, *P < 0,05 vs GM.

4.9 ANALISE HISTOPATOLÓGICA

4.9.1 Efeito da fração ZOEB4 sobre a nefrotoxicidade induzida por GM em tecido renal de ratos.

A análise histopatológica nos tecidos renais foi realizada com todos os grupos induzidos à nefrotoxicidade com GM e tratados com a ZOEB4 nas doses (6,25, 12,5 e 25 mg/Kg).

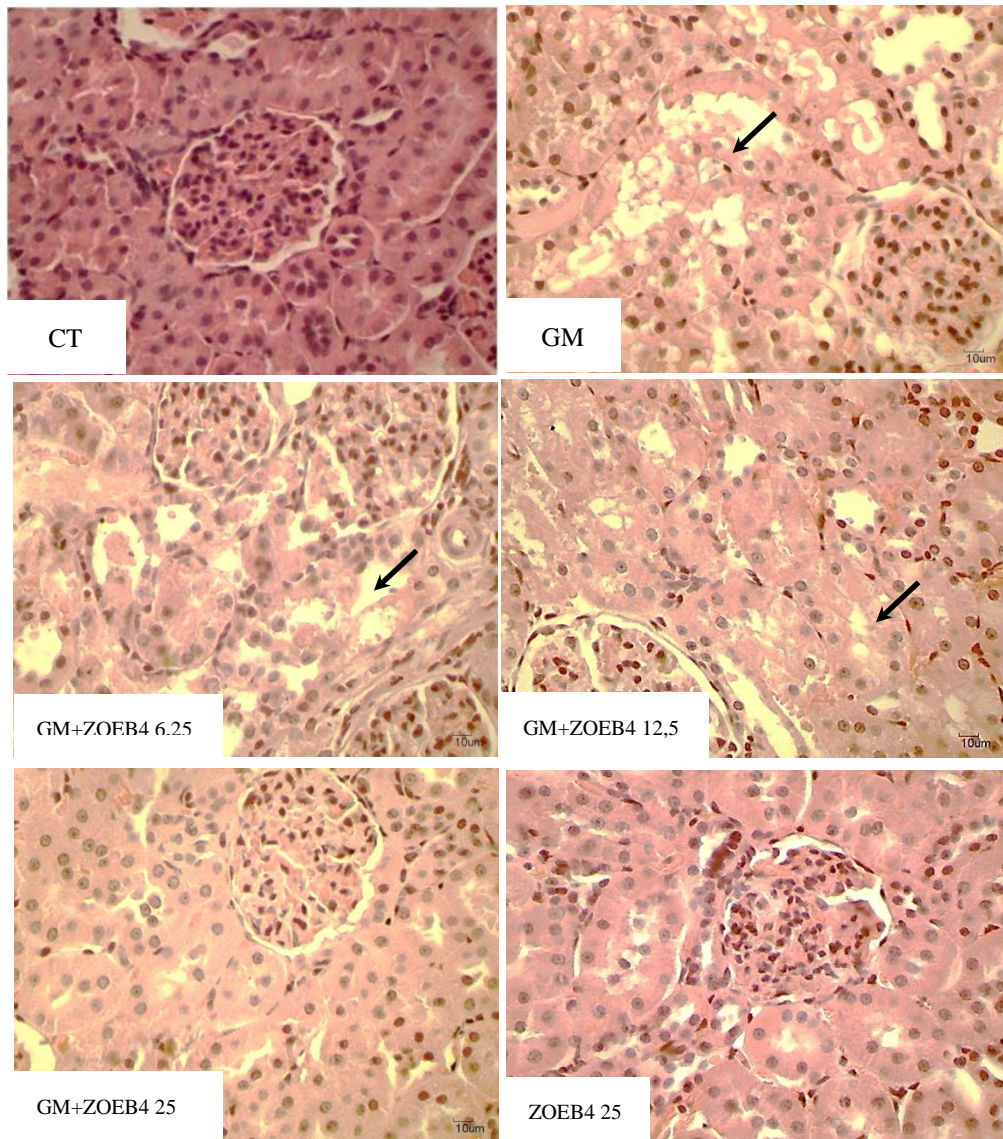
Conforme os resultados nas figuras 31 e 32, os animais dos grupos controles (CT e ZOEB4 25) não apresentaram quaisquer alterações arquiteturais nos órgãos examinados. Não houve qualquer indício de citotoxicidade. Foi observado apenas um pequeno processo inflamatório (pielonefrite) em um animal no grupo CT e, seguido a identificação de degeneração hidrópica do epitélio tubular renal em 2 animais do grupo CT, achados estes que representam citotoxicidade. Contudo, não relevante para o número de animais analisados, além do que, não foram observados processos inflamatórios nesses grupos.

No grupo GM, não se identificou alterações arquiteturais visivelmente. Entretanto, quase todos os animais deste grupo exibiram indícios de citotoxicidade (degeneração hidrópica do epitélio tubular), embora caracterizada como leve. Em alguns animais, presença de infiltrado inflamatório, linfocitário multifocal, como também presença de linfócitos e plasmócitos.

O tratamento com a fração ZOEB4 nas doses, 6,25 e 12,5 mg/kg conseguiu reduzir o número de animais com achados de toxicidade e os parâmetros de lesão nestes (**Fig.** 31 e 32). Cerca da metade dos animais do grupo GM+ ZOEB4 6,25 tiveram essa redução. Observou-se degeneração discreta hidrópica do epitélio tubular (citotoxicidade leve). Além disso, foi observado no grupo GM +ZOEB4 12,5 mg/kg degeneração hidrópica do epitélio tubular renal discreta na maior parte dos animais, o que representa citotoxicidade. Também foram observados pequenos infiltrados linfocitários. Mesmo menores, os achados não representam reversão da citotoxicidade pela fração ZOEB4.

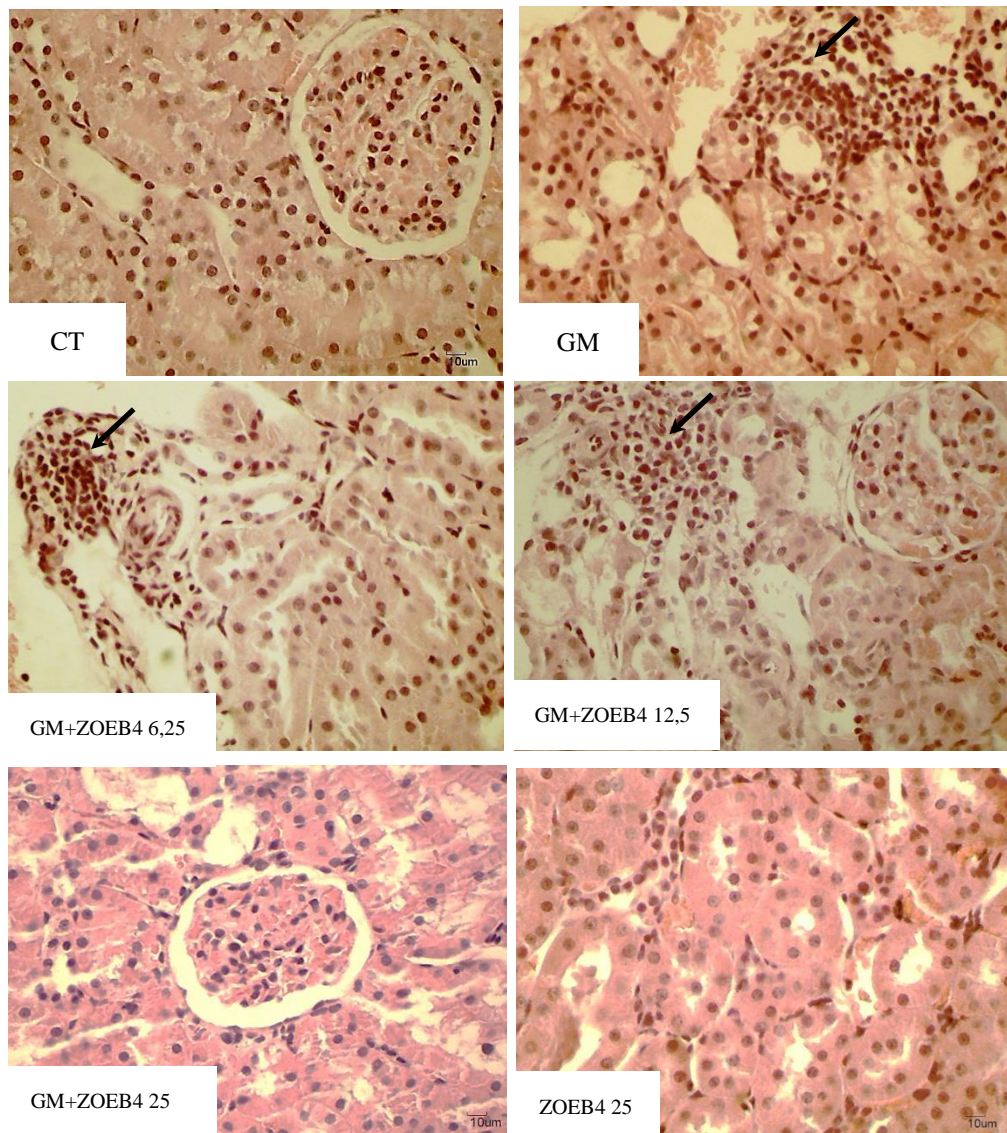
No entanto, foi observado um efeito protetor da fração ZOEB4 no grupo GM + ZOEB4 25, já que não havia alterações arquiteturais nos órgãos, além de não existir qualquer indício de citotoxicidade e somente um animal apresentou pequeno foco linfoplasmocitário. O grupo zoeb4 25, controle de citotoxicidade da fração ZOEB4, não apresentou qualquer indício de citotoxicidade.

Figura 31 - Imagens representativas do efeito da fração ZOEB4 sobre Degeneração Hidrópica Tubular (Hematoxilina-eosina) em ratos iduzidos a nefrotoxicidade por GM.



As setas nas figuras representam degeneração hidrópica tubular. Grupos: CT (NaCl 0,9%; i.p. + Tween80-2%; v.o.), GM (Gentamicina+ Tween80-2%; v.o.) GM + ZOEB4 (6, 25, 12,5 e 25 mg/kg; v.o.) e ZOEB4 25 (NaCl 0,9%; i.p. + ZOEB4 25mg/kg; v.o).

Figura 32 - Imagens representativas do efeito da fração ZOEB4 sobre infiltrado inflamatório (Hematoxilina-eosina) em ratos iduzidos a nefrotoxicidade por GM.



As setas nas figuras representam infiltrado inflamatório. Grupos: CT (NaCl 0,9%; i.p. + Tween80-2%; v.o.), GM (Gentamicina+ Tween80-2%; v.o.) GM + ZOEB4 (6, 25, 12,5 e 25 mg/kg; v.o.) e CT-FZ (NaCl 0,9%; i.p. + ZOEB4 25mg/kg; v.o.).

5 DISCUSSÃO

A LRA é caracterizada pela súbita perda da função renal e da inabilidade dos rins em excretar escórias, concentrar urina e de manter o balanço hidroeletrólítico adequado no organismo. Geralmente desencadeada por causas isquêmicas ou nefrotóxicas que se mantêm por períodos variáveis de tempo. Apesar do substancial avanço no entendimento e no tratamento dos mecanismos fisiopatológicos, nos últimos 40 anos os índices de mortalidade ainda continuam excessivamente elevados (SCHRIER et al., 2004; BELLOMO, 2011).

A GM, antibiótico pertencente à classe dos aminoglicosídeos, é frequentemente utilizado para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas. Contudo, os eventos de nefrotoxicidade são os principais efeitos colaterais, que afetam de 10-20% dos regimes terapêuticos dessa droga e, desta forma limitando sua ação clínica (MANIKANDAN et al., 2011).

As medidas de prevenção e de tratamento da nefrotoxicidade por GM e dos aminoglicosídeos, de forma geral, consiste em evitar e/ou prevenir o acúmulo do fármaco no córtex renal, ao mesmo tempo em que reduzir a fosfolipidose e promover medidas de proteção contra a NTA e outras alterações celulares, vasculares e glomerulares, sobretudo aumentando a capacidade da regeneração do rim (RIELLA, 2003; OLIVEIRA, 2006).

Relatos recentes (PARLAKPINAR et al., 2005; DERAKHSHANFAR et al., 2007; BLEDSOE *et al.*, 2008), demonstraram experimentalmente mecanismos de proteção diante desta nefropatia, através de alternativas terapêuticas advindas de produtos naturais, expondo assim, a eficácia destes em relação a esta fisiopatologia.

O gengibre como substância natural, tem sido considerado tanto ao nível científico, quanto clínico, como planta de alto potencial terapêutico em diversas enfermidades (SERTIÉ et al., 1992; WILKINSON, 2004).

Nesse sentido, o presente trabalho estudou experimentalmente a LRA, investigando o possível potencial terapêutico da fração ZOEB4, fração enriquecida com o [6]-, [8]- e [10]-gingerol diante da nefrotoxicidade da GM. Este composto natural foi utilizado com intuito de prevenir, intervir ou acelerar o restabelecimento normal da função renal, pois conforme Silva, (2010) e Calixto, (2003), considerável percentual da população utiliza plantas medicinais nos cuidados primários de saúde, o que torna perceptível o acentuado interesse na incorporação do uso destas pela medicina convencional.

Durante a padronização experimental da escala temporal da LRA neste estudo, observou-se uma elevação significativa nos níveis de creatinina sérica nos grupos tratados com GM. Notável que o período de sete dias de administração obteve valor significativo similar ao descrito na literatura e, através disto, foi à dose de escolha para a indução da disfunção renal. Esse dado, é reforçado em estudo de Said, (2011) ao estimar que até 30% dos pacientes tratados com GM por sete dias ou mais dias, apresentam indícios clínicos de nefrotoxicidade, ou o estudo Nykjær et al., (2009) ao citar que o tratamento por um período maior de tempo (10 dias), entretanto, com doses bem inferiores, é capaz de aumentar tais valores e consequentemente desencadear insuficiência renal em animais.

Os modelos de lesão renal contribuem para o esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos e para o desenvolvimento de prevenção terapêutica, intervindo ou reduzindo a severidade da lesão tubular frente ao insulto isquêmico ou tóxico. A aplicabilidade e viabilidade desses modelos são resultantes da similaridade da resposta inflamatória, congestão medular e lesão tubular apresentada quando comparados com dados obtidos de biópsia renal em pacientes com LRA (SILAN et al., 2007; BLEDSOE, 2008).

O protocolo de indução de NTA por GM constitui um modelo confiável, pois reproduz alterações renais conforme relatos clínicos em outros estudos. A nefrotoxicidade induzida por GM é semelhante em animais e seres humanos, o que incentiva o estudo da lesão renal neste modelo (ALI et al., 2009; PESSOA et al., 2012).

O RFG é um parâmetro capital para avaliação da função renal, considerada uma estimativa prática e valiosa para a identificação de disfunção renal. A aferição do RFG neste estudo se deu a partir do Clcr. O tratamento com GM, por si só, apresentou modificações no Clcr, ocorrendo uma diminuição significativa nesse parâmetro comparado aos grupos controles. O evento encontrado está em concordância com relatos de outros autores (SAID, 2011; HUSSAIN, 2012; PORTELA et al., 2012). O tratamento concomitante com a fração ZOEB4, por cinco dias, reverteu à redução do Clcr desencadeado ocasionado pelo antibiótico, indicando um efeito benéfico da fração ZOEB4 no progresso da melhora da função glomerular e tubular. Isto corrobora com efeito protetor encontrado no extrato Zingiber zerumbet frente à nefropatia diabética causada por Streptozotocina (TZENG, 2013).

O Clcr de ambos os rins representa a integração dos Clcr de todos os néfrons funcionantes. No entanto, a nível de um único néfron as EROs podem diminuir a eficácia do RFG, prejudicando os determinantes da filtração glomerular. Tais espécies podem contribuir para redução do RFG em circunstâncias de NTA desencadeadas por drogas nefrotóxicas,

afetando negativamente os determinantes da hemodinâmica glomerular ao danificarem células epiteliais renais (KUHAD et al., 2006; NITHA; JANARDHANAN 2008). Neste contexto, o tratamento com o [6]-gingerol conseguiu melhorar o RFG em lesão renal causada por cisplatina (KUHAD et al., 2006).

Ademais, o efeito reversor da fração ZOEB4 sobre a redução do Clcr neste estudo foi similar ao potencial protetor afirmado ao gengibre confirmado em outros estudos (MAGHSOUDI et al., 2010; TEZENG et al., 2013), atribuímos esse efeito possivelmente a ação do [6]-gingerol, já que este reverteu esse parâmetro como citado anteriormente (KUHAD et al., 2006) e, por ser o composto majoritário da fração em estudo. Além disso, a presença dos gingeróis [8]- e [10]-gingerol nesta fração, pode ter favorecido de forma sinérgica para tal efeito protetor, já que os mesmos possuem similaridade em estrutura. No entanto, não existem relatos científicos quanto ao potencial benéfico destes dois compostos diante as manifestações de lesões renais.

O aumento da creatinina plasmática resulta diretamente da queda no RFG, portanto, a medida da creatinina plasmática é um bom indicador do RFG. O acréscimo da creatinina no plasma é um sinal de alerta, indicando a possibilidade de haver algum problema renal sério (EATON; POOLER, 2006). A GM induziu um considerável aumento na concentração plasmática de creatinina, simultaneamente a redução do Clcr, caracterizando um cenário fidedigno de lesão renal. Este achado está em concordância com outros estudos (DERAKHSHANFAR et al., 2007; BLEDSOE et al., 2008; HOSOHATA et al., 2012).

Contudo, a ureia por sofrer filtração, mesmo com mecanismos diferentes, nos infere o mesmo tipo de análise anterior, no qual uma medida de sua concentração plasmática serve também como um indicador do RFG, principalmente em doença renal terminal. Com isso, a excreção renal deve igualar-se à produção, senão os níveis plasmáticos podem aumentar até um valor patológico, produzindo condições chamadas de uremia. Observou-se um acentuado aumento nos níveis plasmáticos de ureia. Desta forma, um resultado somatório ao da creatinina. Esses achados corroboram para a alta capacidade da retenção de compostos nitrogenados pela GM (SHIRWAIKAR, et al., 2004; SAID, 2010).

A diminuição plasmática nos níveis destes compostos nitrogenados, tanto de creatinina quanto de ureia pela fração enriquecida de gingeróis está em concordância com os resultados obtidos em outro trabalho Kuhad et al., (2006), onde o [6]-gingerol em doses similares às utilizadas para a fração ZOEB4, reduziu as concentrações séricas de creatinina e ureia no dano renal por cisplatina. Além disso, a simples administração do extrato do gengibre durante

vinte dias em animais saudáveis, reduziu significativamente os níveis séricos de creatinina e de ureia (MEHRDAD et al., 2007), sugerindo assim, um efeito benéfico dos componentes desta planta nos casos de uremia. O efeito nefroprotetor desta do extrato desta planta foi reforçado em modelo de lesão nefrotóxica por doxorubicina, ao reduzir os níveis de ureia e creatinina séricas (AJITH, 2008).

Na prática clínica, a proteinúria maciça é um indicativo sério de lesão glomerular ou tubular (SALGADO-FILHO et al., 2003). Como observado nos parâmetros da creatinina e da ureia plasmáticas, o tratamento com GM resultou em uma alteração na excreção urinária de proteínas. Este resultado está de acordo com outros estudos (PRIYAMVADA et al., 2008; CONSENZA, 2010). Além do que, essa elevação é significativamente crescente em uma escala temporal de tratamento entre 5 a 15 dias com o aminoglicosídeo (BANDAY et al., 2008). Mesmo com o aumento significativo, não podemos atribuir esse resultado a um quadro de proteinúria.

No presente estudo a fração ZOEB4 reduziu esse acréscimo da PU. Não existem relatos científicos sobre a participação dos gengerois sobre esse parâmetro da função renal. No entanto, o extrato etanólico e aquoso do *Zingiber officinale* Roscoe reduziu a proteinúria desencadeada por nefropatia diabética (AL-AMIN et al., 2006; TZENG et al., 2013). No presente estudo, sugerimos que os gengerois isolados na fração ZOEB4, melhorou esse parâmetro por ter um efeito protetor sobre o tecido epitelial tubular, já que a elevação da a proteinúria é a resultante do somatório das proteínas encontradas na urina não recaptadas. Tais proteínas, geralmente são proteínas de baixo peso molecular (PBM) que são livremente filtradas no capilar glomerular e reabsorvidas quase que totalmente pelas células tubulares proximais. A GM gera um dano lesivo a essas células e, desta forma, compromete sua reabsorção, favorecendo para que estas proteínas sejam excretadas em grandes quantidades.

É característico das lesões renais, uma súbita elevação nos níveis séricos de ácido úrico (MCPHERSON; PINCUS, 2007). Esse achado reforça os valores aumentados nos níveis séricos dos compostos nitrogenados neste estudo, aumentando e confirmando os indícios de disfunção renal.

A nefrotoxicidade induzida pelo tratamento com GM produz um fenômeno complexo, caracterizado por um aumento tanto nos níveis de creatinina e ureia sérica, como também de ácido úrico, que são seguidos de necrose tubular renal e falha renal (RAJU, et al., 2011; SUBRAMANIAN; ANANDAN 2012).

O extrato bruto do gengibre possui efeito benéfico sobre a função renal, ao reduzir os marcadores químicos de lesão renal quando administrados na dieta de animais submetidos a injúria renal por isquemia de reperfusão e por GM (EBRU et al., 2009; EL-GHANY et al., 2012). O ácido úrico sérico foi reduzido pelo extrato do gengibre (LAKSHMI; SUDHAKAR, 2010).

A GM ativa o receptor extracelular sensível a cálcio (CaSR), um receptor de membrana sensível à quantidade de cálcio extracelular, que também tem sido associada com a morte das células tubulares (QUIROS et al., 2011). Dentre as medidas que se contrapõem e que reduziram experimentalmente a nefrotoxicidade, está a sobrecarga de cálcio (OLIVEIRA, 2006; PARSONS, et al., 1997).

É observado durante o curso do tratamento de pacientes com aminoglicosídeos, dentre eles a GM, uma hipercalcúria dose-resposta. Tais mudanças induzidas pelo fármaco no manejo dos eletrólitos renais podem ocorrer independentemente e antes do desenvolvimento de lesão celular proximal (PARSONS, et al., 1997).

O tratamento oral em animais com carbonato de cálcio (CaCO_3) reduziu a gravidade na nefrotoxicidade por GM em um estudo experimental. No entanto, no mesmo estudo, o tratamento com verapamil provocou efeito oposto. Portanto, em doses elevadas a GM induz perda de cálcio, possivelmente, sendo este íon é um inibidor eficaz da ligação entre GM e os receptores de membranas, evitando assim sua endocitose e posterior armazenamento nas células tubulares (BENNETT et al., 1982; PARSONS et al., 1997; ALI et al., 2002).

No presente estudo, observou-se que a fração ZOE4 diminuiu significativamente a concentração de Ca^{++} urinário. Este achado demonstrou a eficácia protetora dos compostos gingeróis em aumentar a reabsorção do Ca^{++} filtrado, ou em inibir a ligação do fármaco com os receptores de membrana no túbulo. O gengibre quando administrado na dieta garantiu eficácia em aumentar os níveis de Ca^{++} séricos durante a lesão renal (EL-GHANY, et al., 2012). O óleo volátil do gengibre contém diversos compostos, tais como os monoterpênicos, sesquiterpênicos e zingiberol. No entanto, os compostos fenólicos como os gingeróis e shagoals, são indicados como os principais responsáveis pelas ações protetoras (EL-GHANY, et al., 2012, AHMAD, 2006).

Os extratos do *Z. officinale* Roscoe contém fito-constituintes flavonoides que poderiam melhorar o sistema antioxidante mitocondrial renal, protegendo contra nefrotoxicidade (ZAHEDI et al., 2010; EL-GHANY, et al., 2012, AHMAD, 2006; LAKSHMI; SUDHAKAR, 2010).

Tradicionalmente o curso clínico da LRA tem sido subdividido em quatro fases distintas: fase inicial, fase de oligúria, fase de poliúria e fase de recuperação funcional. A nefrotoxicidade por aminoglicosídeo causa LRA não oligúrica e queda na filtração glomerular, geralmente ocorrendo após sete dias de tratamento. Não é comum a evolução para insuficiência renal oligo-anúrica (OLIVEIRA, 2006).

No presente estudo, observou-se que o fluxo urinário de 24h nos animais do grupo GM se elevou e, desta forma classificando a LRA como não oligúrica. Este discreto aumento é comum nos casos de LRA por drogas nefrotóxicas, culminando em poliúria em determinadas situações (LEE et al., 2001; SOUZA, 2009). Possivelmente, esse efeito ocorre devido ao fato da GM impedir formação de AMP cíclico, o que reduz a mobilização das aquaporinas para a membrana apical das células principais, promovendo uma redução na reabsorção de água no ducto coletor, conseqüentemente levando a um aumento na perda de água (LEE et al., 2001).

Observou-se que a fração ZOEB4 elevou consideravelmente o fluxo renal. Existem relatos que o gengibre possui efeitos diuréticos (NAKAZAWA; OHSAWA, 2002), tal efeito foi confirmado em nosso laboratório, uma vez que o [6]-gingerol teve um potente efeito diurético em rim isolado de rato (dados não publicados).

É bem reportado que drogas nefrotóxicas reduzem a expressão de aquaporinas. O tratamento com cisplatina reduziu a expressão de aquaporina-1 e 3 no rim (KIM et al., 2001). Contudo, o tratamento com GM também foi capaz de reduzir a expressão de aquaporina 1, 2 e 3, tanto em nível de córtex como na medula renal (LEE et al., 2001).

Nossos resultados demonstram uma redução significativa nos níveis transcricionais de aquaporina-2. Este achado está de acordo com Park, (2009). No estudo do referido autor observou-se que além da redução da expressão de aquaporina-2, foi observado uma diminuição da expressão na subunidade α da Na/K/ATPase e no transportador de Na^+/H^+ promovido pela GM. Não existem relatos sobre a participação dos gingeróis sobre a função das aquaporinas.

A reabsorção iônica de sódio pelos transportadores na membrana da borda em escova do túbulo proximal é considerada uma função capital do rim, já que o transporte de outros íons e de solutos necessita diretamente ou indiretamente da reabsorção de Na^+ . Estes dependem da integridade estrutural da membrana e, da disponibilidade de energia advinda dos ATPs fornecido por vias metabólicas. É imperativo que alterações nestas vias, causadas por agressão tóxica durante doença renal, determinem modificações na taxa e na função dos

transportes tubulares (KHUNDMIRI et al., 2004; FATIMA et al., 2005; BANDAY et al., 2008).

O túbulo proximal é o segmento do néfron mais vulnerável aos efeitos tóxicos devido a maior reabsorção associada à intensa atividade metabólica com gasto energético e vulnerabilidade do sistema enzimático. Em condições normais no túbulo proximal, cerca de 65% da carga filtrada de sódio e potássio são reabsorvidos (BRENNER et al., 1998, EATON e POOLER, 2006, MARTINS, 2007).

As respostas fisiológicas ao dano tubular incide na instabilidade funcional das proteínas transportadoras na membrana da célula do túbulo, em consequência do déficit de energia. Esse desequilíbrio pode ser caracterizado pela translocação da bomba Na^+K^+ -ATPase, o que resultaria na degeneração funcional da reabsorção de sódio nesta região, procedendo em elevação na FENa. Além disto, existe uma interligação entre esse resultado e o manejo de ureia (SCHRIER, 2004; DEVARAJAN, 2006).

No presente estudo o comprometimento da função tubular foi observado pelo aumento das FENa^+ e FEK^+ . A estabilidade funcional renal foi danificada após a instalação da LRA. Com isso, desencadeou alterações na responsividade da célula tubular. O simples tratamento com NaCl não alterou os níveis de excreção de sódio nos animais controle. Porém a GM, quando administrada em 7 dias seguidos aumentou este valor consideravelmente. Este resultado está de acordo com dados relatados por outros autores (CUZZOCREA et al., 2002; PORTELLA et al., 2012).

A fração ZOEB4 reduziu a elevação na FENa. Os gengerois desta fração tiveram papel benéfico sobre este parâmetro, semelhantemente ao efeito obtido pelo extrato do Gíngibre diante da lesão renal por isquemia de reperfusão renal (MAGHSOUDI, 2010).

Independentemente das concentrações de potássio corporal, o túbulo proximal reabsorve aproximadamente 60 a 80 % deste íon filtrado e, o segmento espesso ascendente da alça de Henle cerca de 10 a 20%, deixando 10% ou mais para o néfron distal (EATON e POLLER, 2006).

Elevadas concentrações de potássio no líquido extracelular proporciona um aumento de sua excreção, sendo um fator importante para os mecanismos de secreção e regulação de potássio extracelular. Além disso, as alterações tubulares que ocorrem com a diminuição da filtração glomerular induzem ao aumento da FEK (DEVARAJAN, 2006; BERNE LEVY; 2009).

Outra justificativa para elevada excreção de potássio é o maior aporte de sódio para o ducto coletor cortical, as células renais captam sódio por canais na membrana apical nesta região, a secreção de potássio é dependente desse processo. Com o aporte aumentado de sódio para o ducto coletor cortical, mais sódio entra nas células principais e mais potássio é secretado (BERNE; LEVY 2009).

Assim, como o resultado observado para a excreção de sódio, obteve-se uma elevação considerável na FEK. Estes dados foram reportados em outros estudos (CAN et al., 2000, SILAN et al., 2007; STOJILJKOVIC et al., 2012). A fração ZOEB4 conseguiu reduzir essa taxa de excreção. O presente estudo confirmou ação protetora dos gengerois desta fração. Tal ação do gengibre foi relatada por outros autores em diferentes quadros de nefropatia (AJITH et al., 2008; ZAHEDI et al., 2010; TZENG et al., 2012).

Os dados apresentados neste estudo indicaram elevados níveis da $FENA^+$ e FEK^+ , as quais caracterizaram bem a LRA induzida por GM e, reforçam o comprometimento tubular em manejar a reabsorção destes íons. De acordo com alguns relatos, o aumento nas frações de excreção de sódio e potássio observados nos quadros de LRA é o resultado de necrose do túbulo proximal desencadeada pelo agente nefrotóxico (CUZZOCREA et al.,2002; BANDAY et al., 2008; SILAN et al., 2007; PORTELA et al., 2010).

Sugerimos que o efeito protetor dos gengerois tenha sido evidenciado através da proteção diante do dano celular ocasionado pela GM sobre as proteínas transportadoras na membrana do túbulo proximal, tal efeito benéfico provavelmente foi advindo do seu papel antioxidante, anti-inflamatório e antiapóptótico que é semelhantemente reportado ao gengibre (ZAHEDI et al., 2012). Diminuindo a lesão esturturel na região tubular, evitou-se os eventos compensatórios secundários a esse dano. Além do que, ressalta se que extrato seco do gengibre reduziu esta perda, aumentando os níveis plasmáticos dos íons em questão (EL-GHANY et al.,2012; NASRI et al., 2013).

O estresse oxidativo é entendido como um desequilíbrio entre a formação de EROs e a capacidade antioxidante total do organismo. Dentre os principais locais de produção destas espécies nos organismos vivos estão o sistema de transportes mitocondrial, sistema peroxisomal de ácido graxo, citocromo P-450 e células fagocíticas (PAGLIUSO et al., 2006, OZBEK, 2012).

É proposto que o estresse oxidativo esteja envolvido como mediador da sinalização intracelular relacionada com a perda da função celular e aos processos de apoptose, necrose e diminuição da defesa antioxidante do organismo, tem sido associado com dano glomerular,

nas doenças tubulares e na falha renal aguda (NORDBERG; ARNER, 2000; QUIROS et al., 2011).

A nefrotoxicidade por GM é resultante do dano citotóxico epitelial tubular. O fármaco aumenta diretamente a produção de EROs na cadeia respiratória mitocondrial. A interação entre as elevadas quantidades de EROs com os lipídios, ácidos nucleicos, proteínas, e várias biomoléculas polissacarídeas danifica a estrutura e funcionalidade dos mesmos. Ao danificarem a composição lipídica das membranas, causam alterações em sua fluidez, permeabilidade e integridade. Estas alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana celular originam a peroxidação lipídica, que é apoiada pelo aumento dos níveis de MDA, um aldeído resultante deste processo que pode ser facilmente identificado nas estruturas biológicas (SILAN et al., 2007; ÖZGE et al., 2011; OUEDRAOGO et al., 2013).

Níveis elevados de MDA encontrados através do método do TBARs têm sido identificados em pacientes críticos com sepse e falência de múltiplos órgãos (LEITE; SARNI, 2003; KOVACIC; ÖZGE et al., 2011; OUEDRAOGO et al., 2013).

No presente estudo, os grupos tratados apenas com NaCl 0,9% não apresentaram alterações nos níveis de MDA urinários e no tecido renal. No entanto, observou-se uma elevação significativa nos níveis de MDA, tanto nos valores urinários, como também expressados no tecido renal. Estes dois resultados foram similares e confirmados por estudos prévios a este (PRIYAMVADA et al., 2008; PESSOA et al., 2011; AYGÜN et al., 2012).

O tratamento com a fração enriquecida de gengerois conteve a elevação de MDA na urina e no tecido renal nos grupos induzidos com GM. Nossos resultados corroboram com o efeito protetor do extrato do gengibre ao reduzir os níveis de MDA em estudo *in vitro*, ao (STOILOVA et al., 2007). Os compostos fenólicos do gengibre, dentre eles o [6]-, [8]- e [10]-gingerol, têm efeito protetor frente à peroxidação lipídica em homogenato de cérebro de ratos. Entretanto, no estudo citado o maior efeito foi advindo do [10]-gingerol (PENG et al., 2012). Ademais o [6]-gingerol reduziu os níveis de MDA durante o quadro de LRA por Cisplatina (KUHAD et al., 2006). Sobretudo, este resultado foi observado com o extrato do gengibre quando administrado na dieta de animais durante a indução de disfunção renal por GM (EL-GHANY et al., 2012). É notável que os compostos gengerois e o gengibre, são detentores de efeitos protetores contra o dano lesivo aos lipídeos de membrana (KUHAD et al., 2006; STOILOVA et al., 2007; YON et al., 2012).

A literatura mostra que a GM potencializa a geração de ânions superóxido, peroxinitrito, peróxido hidrogênio e a produção de radicais hidroxilas a partir das mitocôndrias corticais renal (MAZZON et al., 2002; KUHAD et al., 2006).

O óxido nítrico (ON) é um radical sintetizado durante a conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina pelas NOSs (OZEN et al., 2004; SIGMON et al., 2004). O largo espectro de efeitos biológicos é alcançado através de interações químicas com diferentes alvos, incluindo oxigênio, superóxido e outras EROs, além de metais de transição e tiois (OZEN et al., 2004; KOVACIC; SOMANATHAN, 2008; ÖZGE et al., 2012).

Ao reagir com os grupos tiois (G-SH) nos aminoácidos e em proteínas, o ON forma nitro-tiois (-S-NO) relativamente estáveis. Quando reage com o ânion superóxido (O_2^-) desencadeia a produção do ânion peroxinitrito (ONOO⁻) que pode decompor-se para formar o dióxido de azoto (NO_2) e radical hidroxila (OH[•]). Peroxinitrito e seus produtos têm sido associados a diversas interações que podem contribuir para a lesão celular, incluindo a peroxidação lipídica, nitrodilatação de algumas moléculas e interações com diferentes metais (OZEN et al., 2004; KOVACIC; SOMANATHAN, 2008; ÖZGE et al., 2012).

Em nosso estudo foi evidenciado um aumento significativo nos valores de nitrito no tecido renal dos grupos tratados com GM. Este dado está em conformação com relatos encontrados em outros estudos, nos quais esse mediador foi identificado de forma elevada durante o cenário da injúria renal aguda, tanto por isquemia por cisplatina como por GM (KUHAD et al., 2006; POLAT et al., 2006; ÖZGE et al., 2012).

No entanto, por meio dos nossos resultados, foi notável que o composto em estudo teve um papel considerável em diminuir a formação de nitrito. Este achado está em concordância com outros resultados presentes na literatura (KUHAD et al., 2006). Estudos recentes atribuem esse efeito ao gengibre e, ao constituinte principal [6]-gingerol e seus homólogos [8]-, [10]-gingerol (CHARI *et al.*, 2013).

Outros estudos demonstraram que o gingerol inibe a produção de NO, por meio da redução significativa de iNOS em células J774.1 (KUHAD et al., 2006; CHARI, et al., 2013). A fração ZOEB4, rica principalmente em [6]-gingerol, foi eficiente em reduzir as quantidades de nitrito durante a lesão renal por GM, semelhante ao resultado deste frente a LRA por cisplatina (KUHAD et al., 2006).

Os radicais livres são produzidos constantemente e neutralizados por sistemas endógenos de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático, que previnem ou reparam a dano oxidativo. Para proteção celular, o organismo dispõe de um sistema de defesa composto

por enzimas que atuam desintoxicando os agentes agressores. Dentre os responsáveis por tal função, temos a GSH, SOD, Catalase, GSH-Px e vitamina-E (PAGLIUSO, 2006; KOVACIC; SOMANATHAN, 2008).

A GSH é um tripéptido (L- γ -glutamil- L-cysteiny - glicina) que está presente na maioria das células. Representa o tiol não proteico mais abundante nas células de mamíferos, 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).

Este peptídeo antioxidante é sintetizado no citoplasma e está presente em concentrações mais elevadas na matriz mitocondrial. Os baixos níveis de GSH podem estar diretamente relacionados com o aumento de EROS, peroxidação lipídica e presença de radicais hidroxilas (LEITE, 2003; SAID, 2010).

É fato que durante o percurso das lesões renais ocorrem depleções significativas na quantidade de GSH. Isto é notável durante as administrações de drogas nefrotóxicas e durante os eventos isquêmicos. Com isso, percebe-se o papel relevante desta enzima ao fornecer proteção a função renal (SINGH et al., 2004; POLAT et al., 2006; NITHA; JANARDHANAN, 2008; HEUVEL et al., 2012).

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que o tratamento com GM possibilitou uma redução significativa nos níveis de GSH, visto que os animais controles que receberam NaCl 0,9% possuíam valores bem superiores de GSH comparado aos grupo GM. Os dados apresentados estão de acordo com outros relatos encontrados na literatura (SAID, 2008; AYGÜN et al., 2011; HUSSAIN et al., 2012; ANANDAN e SUBRAMANIAN, 2012). A Fração ZOE4 teve um potencial considerável em reverter essa depleção basal de GSH. É atribuído ao gengibre uma ação antioxidante considerável (STOILOVA et al., 2007). Este alto potencial é notado tanto em estudos *in vivo*, quanto *in vitro* (AJITH et al., 2007; JUSTO; MORAIS, 2008).

Estudos recentes demostram o efeito benéfico do extrato do gengibre diante do dano oxidativo. Observa-se um papel protetor dessa planta frente à isquemia de reperfusão renal e na melhora no quadro lesivo de drogas e substancias nefrotóxicas (AJITH et al., 2008; MAGHSOUDI et al., 2010; TZENG et al., 2013).

Existe uma interligação entre a redução da atividade e sua disponibilidade de GSH durante o processo de peroxidação de lipídeos (MOTAWI et al., 2011). Esta relação foi reforçada pelos nossos resultados. O tratamento com extratos de gengibre normalizou os

níveis de antioxidantes celulares, através dos flavonoides e de seus compostos fenólicos que têm a capacidade de eliminar os radicais livres (MOTAWI et al., 2011; PENG et al., 2012). Atribuímos o efeito protetor da fração enriquecida com os gíngerois, ao seu composto majoritário [6]-gingerol e ao sinergismo de outros compostos fenólicos [8]- e [10]-gingerol, já que o [6]-gingerol manteve os níveis de GSH durante o dano oxidativo lesivo renal por antineoplásico (KUHAD et al., 2006).

Ao enriquecer os sistemas com sua ação antioxidante, o gengibre e seu derivado (fração ZOEB4) diminuíram a lesão desencadeada pelas EROs, aumentando ou preservando os níveis de GSH. Com isto, favoreceu a redução da ação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outros peróxidos orgânicos.

Além de diminuir os mecanismos de defesa antioxidante por aumentar os níveis de peroxidação lipídica e reduzir a concentração celular da GSH, as EROs, desencadeadas por GM, diminuem a atividade da SOD (MOTAWI et al., 2011; QIAO et al., 2013). Além do exposto, essa enzima previnem a conversão do óxido nítrico em suas formas oxidativas, apresentando efeito sinérgico com a L-arginina (LEITE; SARNI, 2003; PAGLIUSO et al., 2006).

É fato que a GM é capaz de reduzir os níveis de SOD no tecido renal, gerando nefrotoxicidade, conforme descrito na literatura (WATANABE et al., 2004). Os resultados do presente estudo reforçam esse relato ao demonstrar a capacidade dessa droga em diminuir o nível desta enzima no tecido renal. Esse achado confirma dados encontrados em outros estudos (KUHAD et al., 2006; DERAKHSHANFAR et al., 2007; ANANDAN; SUBRAMANIAN, 2012).

Assim como notado para os níveis de GSH, observou-se que a fração ZOEB4 conteve a forte ação da GM em reduzir o aporte antioxidante renal, inibindo a utilização ou, aumentando a atividade da SOD. Esse achado é reportado para o gengibre, já que o extrato éter, clorofórmio e etanólico desta planta teve potencial antioxidante contra a injúria renal induzida por tetracloceto de carbono (CCl_4), inibindo a peroxidação lipídica e aumentando os níveis de GSH e a atividade da SOD, ação protetora atribuídas a sua abundância em antioxidantes naturais, tais os esteróis, flavonoides e alcaloides (HAMED et al., 2012).

O extrato da planta em estudo aumentou os níveis de SOD frente à lesão renal desencadeada por drogas antineoplásica e quimioterápica (AJITH et al., 2007; AJITH et al., 2008).

Outros relatos demonstram esse efeito benéfico do gengibre ao aumentar os níveis desta enzima e em modelo de depósito de colágeno e fibrose (MOTAWI et al., 2011). O Extrato etanólico de *Z. officinale* Roscoe sozinho, ou em combinação com vitamina E, atenuou parcialmente a nefrotoxicidade induzida por cisplatina, como elevação das atividades de SOD, CAT e GPx, nível de GSH, além de diminuir significativamente os níveis de MDA (AJITH et al., 2007; EL-GHANY et al., 2012).

Contudo, a fração ZOEB4 manteve a função da SOD. O [6]-gingerol aumentou a atividade da SOD-1 durante o dano causado pelo tratamento com álcool (YON et al., 2012), efeito similar obtido para o [6]-gingerol diante da lesão renal por cisplatina (KUHAD et al., 2006). Diante disso, este composto majoritário é detentor de grande efeito antioxidante, sendo possivelmente o responsável por todas as ações encontradas para o extrato do gengibre, como também, os encontrados para a fração ZOEB4.

O aumento ou desequilíbrio da produção de EROs e do estresse oxidativo em determinadas circunstâncias, medeiam a resposta inflamatória produzida por GM (QUIROS et al., 2010). A produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio aumentam no rim após a administração do aminoglicosídeo e ambos ativam NFκ-B, um importante mediador de muitas vias inflamatórias que induz a ativação da expressão de citocina pró-inflamatórias e que contribuem para a injúria tubular e a progressão do dano renal (LOPEZ-NOVOA et al., 2011; KALAYARASAN et al., 2009).

O TNF-α é uma potente citocina pró-inflamatória que é produzida por diversos tipos de células, incluindo macrófagos, células mesangiais e epiteliais renais (VITALE et al., 2007). O tratamento com GM aumentou a expressão do mRNA de TNF-α e, em menor escala de MCP-1 no córtex renal, quando administrada juntamente com LPS do que quando ocorre apenas a administração de LPS. Tal aumento foi notável também para os níveis destes mediadores no plasma (ZAGER, 2013). O TNF-α é um mediador importante na ativação do receptor de morte celular e a GM aumenta a sua excreção em células NRK-52E (JUAN et al., 2007).

No presente estudo, a GM elevou a expressão de TNF-α no tecido renal, reforçando assim relatos anteriores (BLEDSOE et al., 2009; KALAYARASAN et al., 2009).

Contudo, foi identificado que a fração ZOEB4 reduziu esta expressão de TNF-α. Entretanto, estudos recentes demonstram que os gingeróis ([6]-, [8]- e [10]-gingerol) reduziram os níveis de TNF-α induzidos por LPS, sendo o [10]-gingerol o mais efetivo nessa redução (HO et al., 2013).

O [6]-gingerol exibiu efeito anti-inflamatório, pois suprimiu a expressão TNF- α e iNOS (LEE et al., 2009). Ressalta-se ainda que o gengibre e seus constituintes, principalmente [6]-gingerol, suprimiu a liberação de mediadores envolvidos com o processo inflamatório, e diminuiu o nível de iNOS, COX-2, e de NF-kB em astrócitos tratados com LPS (LEE et al., 2009; CHARL., et al., 2013).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kD. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteoquinases, dentre as consideradas pro-inflamatórias, além do TNF, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 (OLIVEIRA et al., 2011).

Além do TNF- α , é reportado que a GM aumenta os níveis de IL-1 β (VOLPINI et al., 2006; MARTÍNEZ-SALGADO et al., 2007). Esses relatos estão de acordo com os dados obtidos em nosso estudo. O [6]-gingerol atenuou a produção das citocinas IL-1 β , IL-12, TNF- α , RANTES e MCP-1 estimuladas por LPS em macrófagos murinos peritoneais (TRIPATHI et al., 2007). O extrato do gengibre também conseguiu reduzir todos esses mediadores (TRIPATHI et al., 2008). Estudo recente demonstrou que os compostos do gengibre, dentre eles os gingeróis, inibiram especificamente a expressão de IL-1 β em macrófagos e monócitos (NIEVERGELT et al., 2013).

No presente estudo observou-se uma elevação significativa na expressão de IL-2 desencadeada pelo tratamento com GM. Entretanto, não existem relatos na literatura justificando este aumento. No entanto, é bem reportado que durante o insulto tóxico desencadeado por drogas nefrotóxicas, como a cisplatina, ocorre um aumento da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-2, IL-6, MCP-1, RANTES (ZHANG et al., 2008; MILLER et al., 2010).

A fração ZOEB4 foi hábil para reduzir o aumento da expressão de IL-2. É bem reportado que o gengibre e seus componentes possuem efeito anti-inflamatório diante de algumas enfermidades. Este composto diminuiu a expressão de IL-4, IL-5 e de IFN- γ em modelo de asma (AHUI, et al., 2008). Já o [6]-gingerol, especificamente, diminuiu a eosinofilia neste modelo. Ressalta-se ainda que o extrato do gengibre reduziu os níveis de IL-1 β , IL-2 e TNF- α em um modelo de artrite, com efeito protetor similar ao da indometacina (FOUDA et al., 2009).

A GM aumenta consideravelmente os valores de IFN- γ . Estudos recentes demonstram que além deste mediador, o fármaco aumenta os níveis transcricionais de moléculas de adesão

quimioatraentes (MCP-1 de ICAM-1 e VCAM-1) (BAE et al., 2013). Em outro estudo foi identificado que o antibiótico causava elevação da expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-1- β e iNOs. Estas moléculas pró-inflamatórias participam da patogênese da disfunção túbulo-intersticial através da promoção de atração e adesão de leucócitos ao inflamado nas células tubulares (PARK et al., 2009)

A fração enriquecida de gengerois reduziu os níveis de IFN- γ relevantemente, reforçando assim a ação protetora e antiinflamatória do gengibre. Outros estudos relatam que o extrato desta planta inibiu a transcrição gênica de IFN- γ em sinoviócitos humanos atingidos por atrite (PHAN et al., 2005). Além do que, a IFN- γ a IL-2 tiveram suas expressões reduzidas pelo gengibre diante do LPS (TRIPATHI et al., 2008).

Os achados histopatológicos no presente estudo demonstraram que o os animais controles apresentaram aspecto morfológico normal, com preservação da arquitetura renal e sem alterações. Os animais do grupo ZOEB4 25, grupo controle citotóxico da fração em sua maior dose, não promoveu modificações arquiteturais nos órgãos examinados. Não existiu qualquer indício de citotoxicidade.

No entanto, foi observado que os animais tratados com GM durante sete dias e os que receberam além da GM tratamento oral com solvente diluidor exibiram, em conjunto, indícios de citotoxicidade (degeneração hidrópica) com presença de infiltrado inflamatório, linfohistiocitário multifocal, linfócitos e plasmócitos. Esses achados também foram confirmados em alguns estudos recentes (SAFA et al., 2010; ANANDAN e SUBRAMANIAN, 2012; HUSSAIN et al., 2012).

Em doses menores (6,25 e 12,5) a fração ZOEB4 conseguiu reduzir em cerca da metade alguns dos aspectos apresentados induzidos apenas por GM. Porém, não consideravelmente significativos. Ademais, de acordo com os achados histopatológicos, os animais do grupo GM tratados coma fração ZOEB4-25 não apresentaram alterações arquiteturais, como também não tiveram qualquer indício de citotoxicidade. Somente um animal apresentou pequeno foco linfoplasmocitário. O gengibre detém ação protetora sobre as alterações lesivas histológicas observadas durante a nefropatia diabética (QATTAN et al., 2007; TZENG et al., 2013). Além do que, foi observado um grande efeito protetor deste composto *versus* a lesão renal causada por isquemia de reperfusão (MAGHSOUDI, 2010). O efeito protetivo encontrado em nosso estudo, aqui atribuído aos gengerois, foi semelhante ao observado pelo o extrato do gengibre diante de uma lesão renal por tetracloreto de carbono e GM (HAMED, et al., 2012; NASRI et al., 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação dos efeitos farmacológicos da fração ZOEB4, administrada no modelo de LRA em ratos permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ O modelo utilizado neste trabalho com gentamicina (100mg/Kg/dia i.p., 7 dias), foi eficaz, uma vez que desencadeou alterações nos parâmetros renais que indicam lesão: aumento na concentração plasmática de creatinina, ureia e ácido úrico, redução do Clcr, aumento na FENa e FEK, proteína urinária, hipercalcúria, aumento do dano oxidativo e redução da defesa antioxidante, além da participação de mediadores pró-inflamatórios.
- ✓ A Fração ZOEB4 reverteu às alterações dos parâmetros da função renal causada por GM, tais como: queda do RFG, aumento na concentração plasmática de creatinina, ureia, ácido úrico e proteinúria.
- ✓ O dano tubular desencadeado pelo fármaco foi protegido pela fração ZOEB4, já que esta otimizou o manejo iônico observado por meio na melhora da FENa e FEK.
- ✓ O modelo proporcionou um quadro de LRA não oligúrica, o tratamento com o aminoglicosídeo reduziu a transição de aquaporina-2, que foi revertido ou prevenido pelo tratamento com a fração enriquecida com gengerois. No entanto, sugere-se mais estudos para compreender como os gengerois aumentam o fluxo urinário.
- ✓ O dano oxidativo representado pela elevação dos níveis de MDA urinários e teciduais, como também de nitrito foi protegido pela fração ZOEB4.
- ✓ Conforme a preservação dos níveis basais de GSH e SOD foi confirmado o perfil antioxidante da fração enriquecida dos gengerois diante do estresse oxidativo causado pelo fármaco.
- ✓ O processo pró-inflamatório foi evidenciado pelo aumento da transição genética de TNF- α , IL-1 β , IL-2 e INF- γ após a indução com o aminoglicosídeo. A fração

enriquecida de gíngerois reduziu esta elevação confirmando o seu caráter anti-inflamatório frente à nefrotoxicidade.

- ✓ Os achados histopatológicos demonstraram proteção morfológica dada pela fração em estudo. Identificou-se redução considerável dos níveis de degeneração tubular e diminuição do infiltrado inflamatório.

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir a partir dos dados obtidos que o modelo experimental de LRA por GM proporciona alterações bioquímicas e funcionais sobre a atividade renal, sendo um modelo satisfatório para estudo de possíveis inibidores e protetores de lesão renal.

A fração ZOEB4, conforme relatos anteriores para o gengibre, foi eficiente em bloquear as alterações anormais dos efeitos bioquímicos, o estresse oxidativo e o processo pró-inflamatório induzidos pela GM em ratos.

Como perspectiva futura, desejamos investigar os mecanismos celulares lesivos e protetores, especificando ainda mais os mecanismos moleculares e averiguar qual dos três componentes aqui associados ([6]-, [8]- e [10]-gingerol) apresentaria melhor atividade protetora frente às lesões renais aqui detectadas.

REFERÊNCIAS

- ABUELO, J.G. Normotensive Ischemic Acute Renal Failure. **The New England Journal of Medicine**. v.357 p.797-805, 2007.
- AHUI, M. L. B.; CHAMPY, P.; RAMADAN. A.; VAN, L.P. Ginger prevents Th2-mediated immune responses in a mouse model of airway inflammation. **International immunopharmacology**, v. 8, p. 1626-32, 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.
- AJITH, T.; ASWATHY, M.; HEMA, U. Protective effect of Zingiber officinale Roscoe against anticancer drug doxorubicin-induced acute nephrotoxicity. **Food and chemical toxicology**, v. 46, p. 3178-3181, 2008.
- AL-AMIN, Z. M.; THOMSON, M.; AL-QATTAN, K.K.; PELTONEN-SHALABY, R.; ALI. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (Zingiber officinale) in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, p. 660-666, 2006.
- ALI, B. H.; AL-QARAWI, A. A.; MOUSA, H. M. The effect of calcium load and the calcium channel blocker verapamil on gentamicin nephrotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1843-1847, 2002.
- ALI, B.H.; AL-SALAM, S.; AL-HUSSEINI, I.; NEMMAR, A. Comparative protective effect of N-acetylcysteine and tetramethylpyrazine in rat with gentamicin nephrotoxicity. **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p 302-307, 2009.
- ALI, B. H.; AL ZA'ABI, M.; BLUNDEN, G.; NEMMAR, A. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 109, p. 225-232, 2011.
- 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** : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 46, n. 2, p. 409-420, 2008.
- ALI, B. H. The effect of Nigella sativa oil on gentamicin nephrotoxicity in rats. **The American journal of chinese medicine**, v. 32, n. 1, p. 49-55, 2004.
- ALI, B. H.; AL-QARAWI, A A; MOUSA, H. M. The effect of calcium load and the calcium channel blocker verapamil on gentamicin nephrotoxicity in rats. **Food and chemical toxicology** : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 40, p. 1843-7, 2002.
- ALI, B. H.; AL-SALAM, S.; AL-HUSSEINIA; NEMMARC. A. Comparative protective effect of N-acetyl cysteine and tetramethylpyrazine in rats with gentamicin nephrotoxicity. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 29, p. 302-7, 2009.

AL-MAJED, A. A.; ABD-ALLAH A.R.A.; AL-RIKABI, A.C.; AL-SHABANAH O.; MOSTAFA, A. M. Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 17, p. 146-53, 2003.

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

AL-QATTAN, K.; THOMSON, M.; ALI, M. Garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) attenuate structural nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats . **The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v.12, p. 62-71, 2008.

AYGÜN, F. O.; AKÇAM, F. Z.; KAYA, O.; CEYHAN, B. M.; SÜTÇÜ, R. Caffeic acid phenethyl ester modulates gentamicin-induced oxidative nephrotoxicity in kidney of rats. **Biological trace element research**, v. 145, p. 211-6, 2012.

ALZHRANI, A.; SINNERT, R.; GERNSEIMER, J. Acute kidney injury, sodium disorders, and hypercalcemia in the aging kidney: diagnostic and therapeutic management strategies in emergency medicine. **Clinics in geriatric medicine**, v. 29, p. 275-319, 2013.

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.

BAE, E. H.; KIM, I. J.; JOO, S.Y.; KIM, E.Y.; CHOI, J. S. **Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats.** p.2-24, 2013.

BALAKUMAR, P.; ROHILLA, A.; THANGATHIRUPATHI, A. Gentamicin-induced nephrotoxicity : Do we have a promising therapeutic approach to blunt it ?,**Pharmacological Research** , v. 62, p. 179-186, 2010.

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.

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

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

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

BELLOMO, R .; RONCO, C.; KELLUM, J. A.; MEHTA, R. L.;PALEVSKY, P. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information

technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Critical Care**, v. 8, p.204-212, 2004.

BENNETT, W.; GILBERT, D. N.; DEFEHR, J.; MCCARRON, D. A. M. Reduction of Experimental Gentamicin Nephrotoxicity in Rats by Dietary Calcium Loadin. **Antimicrobial agents and chemotherapy** p. 508-512. 1982.

BERNE; LEVY. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BLEDSON, G.; SHEN, YAO, Y.; HAGIWARA, M.; MIZELL, B.; TEUTON, M.; GRASS, D.; CHAO, L.; CHAO, J. Role of Tissue Kallikrein in Prevention and Recovery of Gentamicin-Induced Renal Injury. **Toxicological sciences**, v 102, p. 433–443, 2008.

BONVENTRE, J. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. **Nephrology Rounds**, v. 6, p. 304-64, 2008.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Science in medicine**, v. 121, p. 4210-4221, 2011.

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.

BRENNER, M.A.; BRADY, H.R.; LIEBERTHAL, W. Acute Renal Failure: Pathogenesis of renal Disease. **In: The Kidney**, v.28, p.1200-38, 1998.

CALIXTO, JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v.55, 2003.

CAMARGO, C. L. S. **Efeito antiinflamatório do extrato de Zingiber officinale aplicado por onoforese sobre edema da pata de ratos**. Dissertação (mestrado). -- Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

CAN, C.; SEM, S.; BOZTOK, N.; TUGLULAR, I.; Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. **European journal of pharmacology**, v. 390, n. 3, p. 327-34, 2000.

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

CHAMBERLAIN, R. M.; SHIRLEY, D. G. Time course of the renal functional response to partial nephrectomy: measurements in conscious rats. **Experimental physiology**, v. 92, p. 251-62, 2007.

CHARI, N. K. L.; MANASA, D.; SRINIVAS, P.; SOWBHAGYAET, H.B. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 509-514, 2013.

CHEN, X.; CHEN, Z.; WANG, H.; XIONG, X.; LIU, X.; HU, C.; HAN, Y.; LU, Y.; WU, Z.; ZHANG, Q.; Plasmid pUDK-HGF encoding human hepatocyte growth factor gene attenuates gentamicin-induced kidney injury in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.10, p.1-7, 2012.

COSENZA, G. P. **Efeito do extrato bruto das folhas das folhas de Echinodorus macrophyllus e de frações semi purificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina**. Dissertação (mestrado). -- Universidade Federal de Minas Gerais-UGMG, 2010.

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

CRONIN, R. E.; THOMPSON, J. R. Role of potassium in the pathogenesis of acute renal failure. *Miner. Electrolyte Metab.*, v. 17, p. 100 - 105, 1991.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DUGO, L.; SERRAINO, I.; PAOLA, R.; BRITTI, D.; SARRO, D. E. S.; PIERPAOLI, S.; CAPUTI, A. P.; MASINI, E.; SALVEMINI, D. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 450, p. 67-76, 2002.

CUZZOCREA, S. et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 450, p. 67-76, 2002.

CHWIERALSKI, C. E.; WELTE, T.; BUHLING, F. Cathepsin-regulated apoptosis. **Apoptosis**, v.11, p.143-149, 2006.

CYNTHIA, A. N. Drug-Induced Nephrotoxicity. **American Family Physician**, v. 78, p. 743-750, 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. **Rev. Bras. Plantas**, v.13, p.79-84, 2011.

DANTAS, A. F. M.; KOMMERS, G. D.; HENNEMANN, C. R. A.; Intoxicação experimental por gentamicina em cães. **Ciências rural**, v.7, p.451-456, 1997.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 17, p. 1503-20, 2006.

DERAKHSHANFAR, A.; BIDADKOSH, A.; KAZEMINIA, S. Vitamin E protection against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: a biochemical and histopathologic study. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 8, p. 231-238, 2007.

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, 3 mar. 2010.

EATON, D.C.; POOLER, J.P. **Fisiologia renal de Vander**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

EL-BAKLY, W. M.; EL-HALAWANY MANAL, M. A.; LOUKA, L.; SCHAALAN, M. F. 6-gingerol ameliorated doxorubicin-induced cardiotoxicity: role of nuclear factor kappa B and protein glycation. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 70, p. 833-41, 2012.

EL-GHANY, M. A. A.; RAMADAN, A. M.; GHOZY, S. F. Nutraceutical Effects of Curcuma , Ginger , Celery , Yeast and Honey on Side Effects of Gentamicin Induced Nephrotoxicity in Rats. **World Applied Sciences Journal**, v. 16, p. 646-655, 2012.

FATIMA, S.; ARIVARASU, N. A.; BANDAY, A. A.; YUSUFI, A. N. K.; MAHMOOD, R. Effect of potassium dichromate on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 24, p. 63-638, 2005.

FAROMBI, E. O.; EKOR, M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. **Food and chemical toxicology** , v. 44, n. 9, p. 1443-8, 2006.

FORSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Arch**, v. 459, p. 923-939, 2010.

FOUDA, A. M.; BERIKA, M. Y. Evaluation of the Effect of Hydroalcoholic Extract of Zingiber officinale Rhizomes in Rat Collagen-induced Arthritis. **Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104 p. 262-271, 2009.

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.

GREEN, L. C.; TANNENBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate syntesis 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.

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.

HAMID, Z.; BUDIN, S.B.; JIE, N. W.; HAMID, A.; HUSAIN; BUDIN, S. B.; HUSAIN, K.; MOHAMED, J. Nephroprotective effects of Zingiber zerumbet Smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Journal of Zhejiang**, v. 13, p. 176-185, 2012.

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.

HERMANN, T. Biomedicine & Diseases: Review Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic Approaches. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 64, p. 1841– 852, 2007.

HEUVEL, M. G. W.; VAN DEN, A.; BAST, G. R. M. M.; HAENEN, A.W.; AMBERGEN, J. F.; MERMANS, R. R.W. J. The role of antioxidants in ischaemia-reperfusion in a human DIEP flap model. **British Journal of Plastic Surgery**, 2012.

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

HSU, D. Z.; LIU, C. T.; LI, Y.; CHU, P.; LIU, M. Protective effect of daily sesame oil supplement on gentamicin-induced renal injury in rats. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 33, p. 88-92, 2010.

HUSSAIN, T.; GUPTA, R. K.; RAO, V.; SWEETY, K.; ESWARAN, B.; JIANG, H.; X.I.E, Z.; KOO, H.J.; MCLAUGHLIN, S.P.; Timmermann, N,T.; Gang, D.R. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal Zingiber species: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rose). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1673-85, 2006.

HUTH, M. E.; RICCI, A. J.; CHENG, A. G. Mechanisms of Aminoglycoside Ototoxicity and Targets of Hair Cell Protection. **International Journal of Otolaryngology**, p.1-19, 2011.

IPPOUSHI, K.; AZUMA, K.; ITO, H.; HORIE, H.; HIGASHIO, H. [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. **Life Sciences**, v. 73, n. 26, p. 3427-3437, nov. 2003.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Appl Microbiol Biotechno**, v. 170, p.140–150, 2006.

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

JOLAD, S. D.; LANTZ A, R. C.; CHEN, G. J.; BATES, R. B.; BARBARA, N. TimmermannCommercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE2 production. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1614-35, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo, 2002.

JU, S. A.; PARK, S. M.; LEE2, Y. S.; BAE, J. H.; YU, R.; SUH, J.; KIM, B. S. Administration of 6-gingerol greatly enhances the number of tumor-infiltrating lymphocytes in murine tumors. **International journal of cancer**, v. 130, p. 2618-28, 2012.

JUAN, S. H.; CHEN, C.; HSU, Y.; HOU2, C.; CHEN, T.; LIN, T.; CHU, SUE, Y. Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 22, p. 732-9, 2007.

JULIEN, N.; KARZAZI, M.; LABRECQUE, G.; BEAUCHAMP, D.; THIBAUT, L. Temporal modulation of nephrotoxicity, feeding, and drinking in gentamicin-treated rats. **Physiology & behavior**, v. 68, p. 533-41, 2000.

JUSTO, O. R et al. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p.1699-1705, 2008.

KALAYARASAN, S.; PRABHU A, N. P.; SRIRAM, N.; MANIKANDAN, R, Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 606, p. 162-71, 2009.

KAMATO, D.; REZAEI, H. B.; GETACHEW, R.; THACH, L. GUIDONE D., OSMAN, N.; ROUFOGALIS, B.; DUKE, C.C., TRAN, V.H.; ZHENG, W.L. (S)-[6]-Gingerol inhibits TGF- β -stimulated biglycan synthesis but not glycosaminoglycan hyperelongation in human vascular smooth muscle cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1026-1036, 2013.

KARAHAN, I.; ATES, S.; AHIN A.; YILMAZ, S.; ERIBAS, A. O. C.; SAKIN, F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 215, p. 198-204, 2005.

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

KHAN, M. R.; BADAR, I.; SIDDIQUAH, A. Prevention of hepatorenal toxicity with *Sonchus asper* in gentamicin treated rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, p. 113, 2011.

KHUNDMIRI, S. J.; ASGHAR, M.; KHAN, F.; SALIM, S.; YUSUFI, A. N. K. Effect of ischemia and reperfusion on enzymes of carbohydrate metabolism in rat kidney. **Journal of Nephrology**, v.17, p.1-7. 2004.

KHUNDMIRI, S. J.; ASGHAR, M.; FARAH KHAN; SALIM, S.; YUSUFI, A. N. K. Effect of reversible and irreversible ischemia on marker enzymes of BBM from renal cortical PT subpopulations Effect of reversible and irreversible ischemia on marker enzymes of BBM from renal cortical PT subpopulations. **American Journal of Physiology Renal**, v. p. 847-56, 2013.

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, S. W. LEE, J.; NAH, M.; GILL KANG,D.; AHN, K.Y.; SUB LEE, H.; CHOI, K. Cisplatin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 12, n. 5, p. 875-82, 2001.

KOUMAN, J. P. Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v.30, p.1341-1346, 2009.

KOTNIS, M. S.; PATEL P.; MENON S. N.; SANE, R. T. Renoprotective effect of *Hemidesmus indicus*, a herbal drug used in gentamicin-induced renal toxicity. **Nephrology. Carlton**, v.9, p.142-52, 2004.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Unifying mechanism for eyetoxicity: electron transfer, reactive oxygen species, antioxidant benefits, cell signaling and cell membranes. **Res Cell Membr FreeRadic**, v. 2, p.56–69, 2008.

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

KUMAR, K. S.; MANASA, B.; RAHMAN, K.; SUDHAKAR, B. Development and validation of hptlc method for estimation of 6-gingerol in herbal formulations and extracts. **International Journal of phamaceutrlical sciences research**, v. 3, p. 3762-3765, 2012.

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

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.; TIMMERMANNB, 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.

LEE, J.; YOO, K. S.; KANG, D. G.; KIM, S. W.; CHOI, K. C. Gentamicin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. **Japanese journal of pharmacology**, v. 85, p. 391-8, 2001.

LEE, T.Y.; LEE, L. C.; CHENA, L. C.; CHANGA, C. 6-Gingerol inhibits ROS and iNOS through the suppression of PKC-alpha and NF-kappaB pathways in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 382, p. 134-9, 2009.

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

LI, P. K. T.; BURDMANN, E. A.; MEHTA, R. Acute Kidney Injury: Global Health Alert. **Transplantation & Volume**, v. 95, p. 653-657, 2013.

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.

LIEBERT, M. A.; MORALES, A. I.; BUITRAGO, J. M.; SANTIAGO, J. M.; AGARRO, M. F.; NOVOA, J. M. L.; BARRIOCANAL, F.P. on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity. **Antioxidants & redox signaling**, v. 4, n. 6, 2002.

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

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

MALDONADO, P. D.; BARRERA. D.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; PANDO, J. H.; RUBIO, M. E. I.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. **Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 2543-2556, out. 2003.

MANIKANDAN, R.; BEULAJA, M.; THIAGARAJAN, R.; PRIYADARSINI, A; SARAVANAN, R.; ARUMUGAM, M. Ameliorative effects of curcumin against renal injuries mediated by inducible nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B during gentamicin-induced toxicity in Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 670, p. 578-85, 2011.

MARTÍNEZ-SALGADO, C.; ELENO, E.; TAVARES, P.; RODRI´GUEZ-BARBERO, A.; CRIADO, J. C.; BOLAN , J. P.; NOVOA, J. L. L. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. **Kidney international**, v. 62, n. 5, p. 1682-92, 2002.

MARKOWITZ, G. S.; PERAZELLA, M. A. Drug-induced renal failure: a focus on tubulointerstitial disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 31-47, 2005.

MAURICE, F.; BROUTIN, I.; PODGLAJEN, I.; BENAS, P.; COLLATZ, E.; DARDEL, F. Enzyme structural plasticity and the emergence of broad-spectrum antibiotic resistance. **EMBO reports**, v.9, p. 344-349, 2008.

MCCARRON, D. A. Reduction of experimental gentamicin nephrotoxicity in rats by dietary calcium loading . Reduction of Experimental Gentamicin Nephrotoxicity in Rats by Dietary Calcium Loading. 1982. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 22, p. 507-12, 1982.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. Clinical Diagnosis and Managementby Laboratory Methods, **Saunders Elsevier**, v.21, 2007.

MELCHERT, A.; LAPOSY, C. B.; MOTTA, Y.P.; GARCIA, A. C. F. Z. Gama-glutamyl transpeptidase urinária como indicador de insuficiência renal aguda induzida por gentamicina em cães. **Arq. Ciên. Vet. Zool**, v. 10, p. 111-116, 2007.

MEHTA, R. L.; CHERTOW, G. M. Acute Renal Failure Definitions and Classification: Time for Change? **American Society of Nephrology**, v. 14 p, 2178-2187, 2003.

MEHTA, R. L.; PASCUA, L. M. T, SOROKO S. et al. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: The PICARD experience. **The Kidney International**. v.66, p.1613-1621, 2004.

METNITZ, P. G.; KRENN, C. G.; STELTZER, H. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. **Crit Care Med**, v.30, p.2051-2058, 2002.

MIHAILOVIC, D. Cytoprotective effect of vitamin C against gentamicin-induced acute kidney injury in rats. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 64, p. 69-74, 2012.

MILLER, R. P. et al. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins**, v. 2, n. 11, p. 2490-518, nov. 2010.

MEHRDAD, M.; MESSRIPOUR, M.; GHOBADIPOUR, M. The effect of ginger extract on blood urea nitrogen and creatinine in mice. **Pakistan J. Biol. Sci.**, v.10, p. 2968-2971, 2007.

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.

MILLER, R. P. et al. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins**, v. 2, n. 11, p. 2490-518, nov. 2010.

MORALES, A. I.; BUITRAGO, J. M.; SANTIAGO, J. M.; FERNÁNDEZ-TAGARRO, M.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; AND PEÑEZ-BARRIOCANAL, F. Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antioxidant Redox Signal**. v.4, p. 893-898, 2002.

MORERA, E.; PETROCELLIS, D.; MORERA, L.; 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.

MOTAWI, T. K.; MOTAWI, T. K.; HAME A.; SHABANA, M. H.; HASHEM, R. M.; NASERET, A. F. A. Zingiber officinale acts as a nutraceutical agent against liver fibrosis. **Motawi et al. Nutrition & Metabolism**, v. 8, p. 1-11, 2011.

MOUEDDEN, E. M. Gentamicin-Induced Apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblast. **Toxicological sciences**, v. 56, p.229-239, 2000.

MUTHURAMAN, A.; SINGLA, S. K.; RANA, A.; SINGH, A.; SOOD, S. Reno-protective role of flunarizine (mitochondrial permeability transition pore inactivator) against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 131, p. 437-443, 2011.

NAGAI, J.; SAITO, M.; ADACHI, Y.; YUMOTO, R.; TAKANO, M. Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 112, p. 43-50, 2006.

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.

NAIDU, M. U. R.; SHIFOW, A. A.; KUMAR, K.V., RATNAKAR, K. S. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 7, p. 191-197, 2000.

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.

NAKAZAWA, T.; OHSAWA, K. Metabolism of [6]-gingerol in rats. **Life Sciences**, v. 70, p. 2165-2175, 2002.

NICOLL R.; HENEIN M. Y. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A hot remedy for cardiovascular disease? **Internatiol Journal of Cardiol**, v.131 p.408-9, 2009.

NITHA, B.; JANARDHANAN, K. K. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3193-3199, 2008.

NIEVERGELT, A.; ALTMANN, K. H.; GERTSCH, G.; S NIEVERGELT, A.; MARAZZI, J.; SCHOOP, R. L. Ginger phenylpropanoids inhibit IL-1 β and prostanoid secretion and disrupt arachidonate-phospholipid remodeling by targeting phospholipases A2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 8, p. 4140-50, 15 out. 2011.

NORDBERG, J.; ARNER, J.; MAMMALIAN, T. H. E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

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.

NURTJAHJA, T.; ROUFOGALIS, A. A. B.; TRAN, H.T.; DUKE, C. C. Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger. **Thrombosis Research**, v. 111, p. 259-265, 2003.

NYKJÆR, A.; SCHAMBYE, H.; ANDERS H. PEDERSEN; NIELSEN, H, Assessing low-dose gentamicin-induced kidney injury in rats by analysis of urine. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.60, p.316-320, 2009.

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, n. May, 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.

OLIVEIRA, F. P.; CIPULLO, P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal Cardiovasr**, v.21, p. 444-452, 2006.

OLIVEIRA, J. F. P. ; SILVA, C.A.; BARBIERI, C. D.; OLIVEIRA, G. M.; ZANETTA, D. M. T.; BURDMANN, E.A. Prevalence and Risk Factors for Aminoglycoside Nephrotoxicity in Intensive Care Units. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, p. 2887–2891, 2009.

ORTEGA, A. RAIMILA, D. IZQUIERDO, A. GONZA LEZ, L. ROLE of the Renin-Angiotensin System on the Parathyroid Hormone – Related Protein Overexpression Induced by Nephrotoxic Acute Renal Failure in the Rat. **The American Society of Nephrology**, p. 939-949, 2005.

OUEDRAOGO, LAMIEN-SANOUB, A.; RAMDÉB, N.; OUÉDRAOGO, A. S.; OUÉDRAOGO, M.; ZONGO, S. P.; GOUMBRIB, O.; DUEZC, P.; GUISSOU, P. I. Protective effect of Moringa oleifera leaves against gentamicin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 65, p. 335-9, 2013.

OZBEK, E. Induction of oxidative stress in kidney. **International journal of nephrology**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

OZEN, S.; ERSAN ODACI, E.; AKYOL, O.; IRAZ, M.; YILDIRIM, Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 24, p. 27-35, 2004.

PAGLIUSO, R. G.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; ABBUD FILHO, M.; PAVARINO-BERTELLI, E. C. Estresse oxidativo e Disfunção Crônica do Enxerto Renal Oxidative stress and Renal Chronic Allograft Dysfunction. **Arq Ciênc Saúde**, v. 13, n. 4, p. 223-227, 2006.

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.

PARLAKPINAR, H.; TASDEMIRA, S.; POLATB, A.; BAY-KARABULUT, N.; VARDID, M.; UCARD, A. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (cape) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. **Toxicology**, v. 207, p. 169-177, 2005.

PARAJULI, N. MacMillan-Crow, L.A. Role of reduced manganese superoxide dismutase in ischemia-reperfusion injury : a possible trigger for autophagy and mitochondrial biogenesis ? Role of reduced manganese superoxide dismutase in ischemia-reperfusion injury : a possible trigger for autophagy and mitochondrial biogenesis ? **American Journal of Physiology - Renal** , v. 304: p. 255-257, 2013.

PARSONS, P. P.; GARLAND, H.O.; HARPUR, OLD S. Acute gentamicin-induced hypercalciuria and hypermagnesiuria in the rat: dose-response relationship and role of renal tubular injury. **British journal of pharmacology**, v. 122, p. 570-6, 1997.

PATIL, N. K.; SABA, H.; MACMILLAN-CROW, L. A. Free Radical Biology and Medicine Effect of S-nitrosoglutathione on renal mitochondrial function : a new mechanism for reversible regulation of manganese superoxide dismutase activity ? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 54-63, 2013.

PANNU, N.; NADIM, M. K. An overview of drug-induced acute kidney injury. **Critical Care Medicine**, v.36, p.216-223, 2008.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p.45, 2001.

PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; GONZÁLEZ-OROZCO, A. E.; MALDONADO, P. D.; BARRERA, D.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; OHERNÁNDEZ-PANDO, R., Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, p. 71-78, 2003.

PESSOA, E. A.; CONVENTO, M. B.; RIBAS, O. S.; TRISTÃO, V. R.; REIS, L. A.; BORGES, F. T.; SCHOR, N. Preconditioning induced by gentamicin protects against acute kidney injury: The role of prostaglandins but not nitric oxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, n. 1, p. 1-6, 2011.

PHAN, P. V.; SOHRABI, A.; POLOTSKY, A.; HUNGERFORD, D.S.; LINDMARK. Ginger extract components suppress induction of chemokine expression in human synoviocytes. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 11, p. 149-54, 2005.

POLAT, A.; PARLAKPINAR, H.; TASDEMIR, S.; COLAK, 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.

PORTELA, V. G.; COSENZA, G.P.; DINIZ, L.R.; PACHECO, L. F.; CASSALI, G.D.; CALIARI, M. D.; BRANDÃO, M.G.L.B.; VIEIRAL, M. A. R. Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on. **Nephron Extra**, v. 901, p. 177-183, 2012.

PRIYAMVADA, S.; PRIYADARSHINI, M.; ARIVARASU, N. A.; FAROOQ, N.; KHAN, S.; KHAN, S. A.; KHAN, W.; A. N. K. Yusuf. Studies on the protective effect of dietary fish oil on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 78, p. 369-81, 2008.

QIAO, X.; LI, R.; LI, H.; ZHU, G.; HUANG, X.; SHAO, S.; BAI, B.I. Intermedin protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of oxidative stress. Intermedin protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of oxidative stress. **American Journal of Physiology - Renal**, v.304, p. 11-119, 2013.

QUIROS, Y.; VICENTE-VICENTE, L.; MORALES, A. L.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; HERNANDES, F. J. L. An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. **Toxicological sciences**, v. 119, n. 2, p. 245-256, 2011.

RAJU, S.; KAVIMANI, S. RAO, U. M.; SREERAMULU, R. K. VASANTH, K.G. Floral extract of *Tecoma stans*: a potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity in vivo. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 4, p. 680-5, 2011.

RAO, S. N. Aminoglycoside use in renal failure. **Indian J. Nephrol.**, v.3, p. 121-124, 2010.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-13, maio 2001.

RIELLA, M. C. **Princípios de neurologia e distúrbios hidrolíticos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2003.

RIYUZO, M. C.; SOARES, V. Papel do infiltrado inflamatório na fibrose túbulo-intersticial e evolução das glomerulopatias Role of inflammatory infiltrate in tubulointerstitial fibrosis and on the outcome of glomerulopathies. **J. Bras. Nefrol** , v. 24, n. 1, p. 40-47, 2002.

ROSA, C.; GONÇALVES, S.; BÉRIA, C.J.U. Representations and use intention of phytoterapyin primary health care. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, p.311-318, 2011.

ROUGIER, F.; CLAUDE, D.; MAURIN, M.; SEDOGLAVIC, A.; DUCHER, M.; CORVAISIER, S.; JELLIFFE, R.; MAIRE, P. Aminoglycoside Nephrotoxicity: Modeling, Simulation, and Control. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, p. 1010-1016, 2003.

SADAKANE, C.; MUTOC, S.; NAKAGAWAA, K.; OHNISHI, S.; SAEGUSA, Y.; NAHATA, M.; HATTORI, T.; ASAKA, M.; TAKEDA, M. 10-Gingerol, a component of rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 412, p. 506-11, 2011.

SAFA, J.; ARGANI, H.; BASTANI, B.; NEZAMI, N.; ARDEBILI, B. R.; GHORBANIHAGHJO, A.; KALAGHEICHI, H.; AMIRFIROUZI, A.; MESGARI, M.; RAD, J.S. Protective Effect of Grape Seed Extract on Gentamicin- Induced Acute Kidney Injury. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 4, p. 285-291, 2010.

SALGADO FILHO, N.; FERREIRA, M. A. A. F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 36, p. 217-221, 2003.

SALEH I. A. Ameliorative effect of 10-gingerol on drug induced hepatotoxicity in albino rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p.1548-1555, 2012.

SAID, M. M. The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 25, p. 708-16, 2011.

SANCHEZ -LOPEZ, E.; RAYEGO, S.; RODRIGUES-DI'EZ, R.; RODRIGUEZ, J. S.; RODRIGUES-DI'EZ, R.; RODRI'GUEZ-VITA, J.; CARVAJAL, G.; AROEIRA, L. S.; SELGAS, R., MEZZANO, S. A. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 20, p. 1513–1526. 2009.

SANTANGELO, F.; WITKO-SARSAT, V, DRUEKE, T.; DESCAMPS, B. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, n. 8, 2004.

SAPTARINI, N. M.; SITORUS, E. Y.; LEVITA, J. Structure-Based in Silico Study of 6-Gingerol, 6-Ghogaol, and 6-Paradol, Active Compounds of Ginger (*Zingiber officinale*) as COX-2 Inhibitors. **International Journal of Chemistry**, v. 5, p. 12-18, 2013.

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.

SATHYAVELU, K. Reddy 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.

SAYED-AHMED, M. M.; NAGI, M. N. Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, p. 399-405, 2007.

SCHMITZ, C.; HILPERT, J.; JACOBSEN.; C.; BOENSCH, C.; CHRISTENSEN, E.I.; LUFT, F.C.; WILLNOW, T.E.et al. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, p. 618-22, 2002.

SCHNELLMANN, R. G. **Toxic responses of the kidney**. 2001. Chapter 14. Disponível em: <www. knovel. com.> .

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.

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.

SERTIÉ, J. A. A. Preventive anti-ulcer activity of the rhizome extract of *Zingibe officinale*. **Fitoterapia**, v.63, n.1, p.55-59, 1992.

SERVAIS, H.; JOSSIN, Y.; BAMBEKE, F.V.; TULKENS, P.M. Gentamicin Causes Apoptosis at Low Concentrations in Renal LLC-PK 1 Cells Subjected to Electroporation
Gentamicin Causes Apoptosis at Low Concentrations in Renal LLC-PK 1 Cells Subjected to Electroporation. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.50, p. 1213–1221, 2006.

SHANMUGAM, K. R.; RAMAKRISHNA, C. H.; MALLIKARJUNAA, K.; SHARMA, R. K.; RAJANI G. P.; VIVEK SHARMA; KOMALA, N. Effect of Ethanolic and Aqueous Extracts of Bauhinia Variegata Linn on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, p. 192-198, 2011

SHIRWAIKAR, A.; ISSAC, D.; MALINI, S. Effect of Aerva lanata on cisplatin and gentamicin models of acute renal failure. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 81-86, 2004.

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

SILAN, C.; UZUN, Ö.; ÇOMUNOGLU, N. Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol. **Pharmaceutical Society of Japan**, v. 30, n. January, p. 79-83, 2007.

SILVA, F. A. N. **Avaliação antioxidante de 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis utilizando o método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio).** Dissertação (mestrado). -- Universidade de São Paulo-USP, 2010.

SILVA, J. A.; BECCENERI, A. B.; MUTTI, H. S.; MARTIN, A. B. M.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; COMINETTI, M. R. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. **Journal of chromatography B**, v. 903, p. 157-62, 2012.

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

SOUSA, C. T.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J.; SIQUEIRA, R. J.; MAGALHÃES, P. J.; LIMA, A. A.; SANTOS, A. A.; HAVT, A. Sildenafil decreases rat tracheal hyperresponsiveness to carbachol and changes canonical transient receptor potential gene expression after antigen challenge. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, p. 562-72, 2011.

SOUZA, V. B. D.E. et al. Alterações Renais por Aminoglicosídeos. **Arquivos de medicina**, v.22, p. 131-135, 2008.

SOUZA, V. B.; OLIVEIRA, R. F.; LUCENA, H. F.; FERREIRA, A. A. A.; GUERRA, G. C. B.; FREITAS, M. L.; QUEIROZ, K. C. S.; DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F. Gentamicin Induces Renal Morphopathology in Wistar Rats. **Int. J. Morphol.**, v. 27, p. 59-63, 2009.

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.

SOHN, E. J.; KANG, D. G.; LEE, H. S. Protective effects of glycyrrhizin on gentamicin-induced acute renal failure in rats. **Pharmacology & toxicology**, v. 93, p. 116-22, 2003.

STOILKOVA, L.; KRASTANO, A.; STOYANOVA, A.; DENEV, P.; GARGOVA, S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 764-770, 2007.

STOJILJKOVIC, N.; STOJILJKOVIC, M.; RANDJELOVICA, P.; VELJKOVICA, S.; SZCZEPAŃSKA, M.; ADAMCZYK, P.; ZIORA, K.; SZCZEPA, S. K. I. T. Rasburicase in the treatment of acute kidney injury in a boy with non-malignancy hyperuricemia. **Pediatrics Polska**, v. 87, n. 5, p. 521-524, 2012.

SUBRAMANIAN, P.; ANANDAN, R.; P. Renal protective effect of hesperidin on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in male Wistar albino rats. **Redox report**, v. 17, p. 219-26, 2012.

SUN, Y.; OBERLEY, L.W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* v. 34, p. 497-500, 1988.

TAVAFI, M.; AHMADVAND, H. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. **Tissue & cell**, v. 43, p. 392-7, 2011.

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.

THOUNAOJAM, M. C.; JADEJA, R. N.; DEVKAR R.V.; RAMACHANDRAN, A. V. Sida rhomboidea Roxb leaf extract ameliorates gentamicina induced nephrotoxicity and renal dysfunction in rats. **J Ethnopharmacol**, v.132, p.365-7, 2010.

TZENG, T.; LIOU, S. S.; CHANG, C. J.; LIU, M. The Ethanol Extract of Zingiber zerumbet Attenuates Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-8, 2013.

TZENG, T. F.; CHANG, C. J.; LIU, I.-M. 6-Gingerol Inhibits Rosiglitazone-Induced Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. **Phytotherapy research : PTR**, v. 1, 2013.

UCHINO, S.; KELLUM JA, BELLOMO R.; DOIG, G. S.; MORIMATSU, H.; MORGERA S. Actue renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. **JAMA**, v. 294, p. 813-818, 2005.

USUBU, A. Nephrology Dialysis Transplantation The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, p. 1175-1182, 2000.

VANBREEMEN, R. B.; TAO, Y.; LI, W. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (Zingiber officinale). **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 38-43, 2011.

VARZI, H. S.; ESMAILZADEH, H.; MOROVVATI, R.; AVIZEH, R.; SHAHRIAR, A.; GIVI, M. E.,. Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin-induced nephrotoxicity in dogs. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 477-81, out. 2007.

VEIGA, J. P. R. ; ROSA, T. R.; KIMACHI, T.; WOLFF, E. R.; SAMPAIO, R.N.;GAGLIARDI, A. R.; JUNQ, L. F. função renal em pacientes com leishmaniose mucocutânea tratados com antimoniais pentavalentes. **Medicina Tropical**, v. 27, p.208-302. 1985.

VERROUST, P.; HBIRN, H.; RIKKE NIELSEN; KOZYRAKI, R.; CHRISTENSEN, E. I. The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. **Perspectives in basic science**, v. 62, p. 745-756, 2002.

VELASCO, A.; TABERNERO, A.; MEDINA, J. M. La megalina es el receptor para la endocitosis mediada por caveolas de la albúmina y se requiere para la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico Megalin is the receptor for caveola-mediated endocytosis of albumin and it ' s required for the synthesi. **Trauma Fund MAPFRE**, v. 20, p. 130-136, 2009.

VIJAYAKUMAR., M.; C. V.; RAO. Nephroprotective activity of Solanum xanthocarpum fruit extract against gentamicin-induced nephrotoxicity and renal dysfunction in experimental rodents. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 5, p. 686-91, 2012.

VOLPINI, R. A.; COSTA R. S.; COIMBRA, T. M. Increased expression of p38 mitogen-activated protein kinase is related to the acute renal lesions induced by gentamicin. **Brazilian journal of medical and biological research**. v. 39, n. 6, p. 817-23, jun. 2006.

WANG, W. Simultaneous determination of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: Application to pharmacokinetics. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 877, n. 8-9, p. 671-9, 2009.

WATANABE, A.; NAGAI, J.; ADACHI, Y.; KATSUBE, T.; KITAHARA, Y.; MURAKAMI, T.; TAKANO, T. Targeted prevention of renal accumulation and toxicity of gentamicin by aminoglycoside binding receptor antagonists. **Journal of controlled release**, v. 95, p. 423-33, 2004.

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.

WALKER, R. J.; ENDRE, Z. H. Cellular Mechanisms of Drug Nephrotoxicity. In.: **Seldin and Giebisch's The Kidney**, 2008. Chapter 87, p. 2507-2535.

WALKER, P. D.; SHAHT, S. V. Evidence Suggesting Renal Failure in Rats Role for Hydroxyl Radical in Gentamicin-induced Acute. **J. Clin. Invest.**, v. 81, p. 334-341, 1988.

WILCOX, C. S. Reactive Oxygen Species : Roles in Blood Pressure and Kidney Function. **Current hypertension reports**, v. 4, p. 160-66, 2002.

WILKINSON, J. M. **Ginger- A review of its medicinal uses**. Disponível em: <http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/MHR/ginger_.htm>. Acesso em: 18 jun. 2004.

YANG, G.; ZHONG, L.; DONG, L.; ZHANG, W.; JIANG, L.; GENG, C.; SUN, X.; LIU, X.; CHEN, X.; MAL. Y. 6-Gingerol induces apoptosis through lysosomal-mitochondrial axis in human hepatoma G2 cells. **Phytotherapy research**, v. 26, p. 1667-73, nov. 2012.

YAMAN, I.; BALIKCI, E. Protective effects of Nigella sativa against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Experimental Toxicologic Pathology**, v. 62, p.183-90, 2010.

YIN, X. M. a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. **Gene**, v. 369, p.7-19, 2006.

YON, J.; BAEK, I.; LEE, S. R.; KIM, M.; HONG, J. T.; YONG, H.; LEE, B. J.; YUN, Y.W.; NAM, S. Protective Effect of [6] -Gingerol on the Ethanol-induced Teratogenesis of Cultured Mouse Embryos. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 1, p. 171-178, 2012.

YOUNG, H.; LUOB, Y.; CHENG, H.; HSIEH, W.C.; LIAO, J.C.; PENG, W. H. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 207-10, 2005.

ZAHEDI, A.; FATHIAZAD, F.; KHAKI, A.; Behnam Ahmadnejad. Protective Effect of Ginger on Gentamicin-Induced Apoptosis in Testis of Rats. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 2, p. 197-200, 2012.

ZHANG, B.; RAMESH, G.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; REEVES, W. B. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 19, n. 5, p. 923-32, maio 2008.

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.

XIE, Y.; NISHI, S.; IGUCHI, S.; IMAI, N.; SAKATSUME, M.; SAITO, A.; IKEGAME, M.; IINO, N.; SHIMADA, H.; UENO, KAWASHIMA, H.; GEJYOE, F. Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. **Kidney international**, v. 59, n. 3, p. 959-74, 2001.

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 & prevention**, v. 17, p. 1930-6, 2008.