

Priming previne a insuficiência renal aguda nefrotóxica através da estimulação do mecanismo de defesa antioxidante

Priming prevent nephrotoxic acute renal failure through stimulation of antioxidant defense mechanism

Autores

Fernanda Duarte ¹
Edson Andrade Pessoa ¹
Luciana Aparecida Reis ¹
Nestor Schor ¹
Fernanda Teixeira Borges ^{1,2}

¹ Universidade Federal de São Paulo.

² Universidade Cruzeiro do Sul.

Data de submissão: 29/09/2015.
Data de aprovação: 25/01/2016.

Correspondência para:

Fernanda Teixeira Borges.
Universidade Federal de São Paulo.
Rua Botucatu, nº 740, São Paulo, Brasil.
CEP: 04023-900
E-mail: ft.borgesft@unifesp.br
FAPESP, CAPES, CNPq, FINEP, FOR.

DOI: 10.5935/0101-2800.20160025

RESUMO

Introdução: Priming é um mecanismo de proteção induzida pela exposição anterior de uma célula ou órgão a baixas ou mesmas concentrações de uma substância tóxica. **Objetivo:** analisar o mecanismo de priming induzido pela exposição a gentamicina em células tubulares proximais humanas e na insuficiência renal aguda (IRA). **Métodos:** Células tubulares foram expostas a 2 mM de gentamicina durante 24 horas, enquanto ratos Wistar foram expostos a 40 mg/kg durante 3 dias. Depois de uma semana, as células foram expostas à mesma concentração durante 24h e os ratos durante dez dias. Os animais condicionados foram comparados com ratos controle e tratados com gentamicina durante 10 dias. Foram analisados parâmetros bioquímicos, o estresse oxidativo foi analisado por hidroperóxidos e proteínas carboniladas urinárias, enquanto a defesa antioxidante foi estudada pela atividade antioxidante do plasma e imunomarcagem e atividade da catalase, superóxido dismutase, heme oxigenase-1 (HO-1) nos rins. Necrose, apoptose, proliferação e expressão da endotelina-1 (ET-1) e HO-1 foram estudadas em células. **Resultados:** o condicionamento dos animais inibiu o aumento da creatinina, ureia, excreção urinária de sódio e de proteína induzida por gentamicina. Bosentana, antagonista do receptor ET-1, e hemin, indutor de HO-1, potencializaram a inibição. O mecanismo de proteção foi mediado pela indução de enzimas antioxidantes HO-1, catalase e SOD atividade e redução do estresse oxidativo. O condicionamento inibiu a morte celular e induziu a proliferação via produção de ET-1. **Conclusão:** o mecanismo de condicionamento é persistente e multifactorial, o estímulo da defesa antioxidante poderia mimetizar o processo de condicionamento e impedir a IRA.

Palavras-chave: antioxidantes; estresse oxidativo; gentamicinas; lesão renal aguda; priming de repetição.

ABSTRACT

Introduction: Priming is the mechanism of protection induced by a previous exposition of a cell or organ to low or equal concentrations of a toxic substance. **Objective:** To analyze the mechanism of priming induced by the previous exposition to gentamicin in human proximal tubular cells and nephrotoxic acute renal failure (ARF). **Methods:** Wistar rats and tubular cells were exposed to gentamicin 2mM during 24h or 40 mg/kg during 3 days and after one rest week were exposed to the same concentration during 24h in cells and additional ten days in rats. The primed animals were compared to control rats receiving vehicle and GENTA animals treated with the gentamicin during the same period. Biochemical parameters were analyzed. The oxidative stress was analyzed by urinary hydroperoxides and carbonylated protein while antioxidant defense was studied by antioxidant activity of the plasma (FRAP), catalase, superoxide dismutase, heme-oxygenase 1 (HO-1) immunostaining and enzymatic activity in kidney. Necrosis, apoptosis, proliferation, endothelin 1 (ET-1) and HO-1 expression were studied in cells. **Results:** Priming of the animals inhibited the increase in creatinine, urea, sodium excretion and urinary protein induced by gentamicin. Bosentan, ET-1 receptor antagonist, and hemin, HO-1 inducer, potentiate the inhibition. The mechanism of protection was mediated by induction of the antioxidant enzymes HO-1, catalase and SOD activity and oxidative stress reduction. Priming inhibited cell death and induced proliferation through ET-1 production. **Conclusion:** Priming is a persistent and multifactorial mechanism, the stimulation of the antioxidant defense could mimics partially the priming process and prevent the ARF.

Keywords: acute renal failure; antioxidants; gentamicins; oxidative stress; repetition priming.

INTRODUÇÃO

Células e tecidos submetidos a estímulos sub-letais dão início a respostas adaptativas que conferem proteção contra outros estímulos de intensidade igual ou superior. Alguns autores já descreveram este fenômeno, dando-lhe o nome de *priming* ou autoproteção. Células tubulares expostas a doses sub-letais de S-(1,2-diclorovinil) L-cisteína ficam protegidas contra doses letais subsequentes deste agente,^{1,3} principalmente através de proliferação celular e reparo renal.⁴ Camundongos tratados com exposição sub-crônica a clorofórmio posteriormente submetidos a dosagem letal do composto demonstraram 100% de sobrevivência e elevação da capacidade antioxidante.⁵

Um mecanismo de proteção semelhante chamado pré-condicionamento foi proposto para lesões induzidas por hipóxia. O pré-condicionamento hipóxico protege o órgão contra outro insulto isquêmico.⁶ Tal efeito foi observado em diferentes órgãos, como rins⁷ e coração.⁸ O mecanismo do pré-condicionamento envolve a modulação da capacidade antioxidante, a inibição do stress oxidativo e da apoptose e a melhora do fluxo sanguíneo para os órgãos.^{7,9}

A gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo endovenoso amplamente utilizado em unidades de terapia intensiva. Seus principais efeitos colaterais são ototoxicidade e nefrotoxicidade, fatores que limitam seu uso.

A nefrotoxicidade por gentamicina é uma causa conhecida de insuficiência renal aguda (IRA), observada em 10-20% dos pacientes tratados com o medicamento.¹⁰ A nefrotoxicidade por gentamicina é caracterizada por necrose tubular proximal em consequência do acúmulo do fármaco em nível celular,¹¹ reduções acentuadas da taxa de filtração glomerular (TFG), do coeficiente de ultrafiltração (Kf) e do fluxo sanguíneo renal.¹² A gentamicina estimula o stress oxidativo e a formação de radicais livres nos rins.¹³ Além disso, o fármaco induz um processo inflamatório significativo que ajuda a amplificar sua citotoxicidade.

Fatores de risco como desidratação, uso concomitante de furosemida, agentes de contraste e envelhecimento podem elevar o risco de IRA nefrotóxica.¹⁴

Várias estratégias foram investigadas para tratar ou prevenir a nefrotoxicidade por gentamicina em modelos animais, sobretudo com o uso de substâncias antioxidantes naturais, contudo sem grande uso na prática clínica.^{15,16}

É razoável sugerir que o *priming* com antibióticos poderia tratar ou prevenir a IRA nefrotóxica, uma vez que eleva o risco de resistência, mas o entendimento do mecanismo atuante no *priming* poderia estimular o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento ou prevenção da intercorrência e talvez aumentar o uso de antibióticos nefrotóxicos, particularmente em unidades de terapia intensiva.

O presente estudo pretende determinar o mecanismo de proteção induzido pelo *priming* de células tubulares proximais humanas e rins de ratos com gentamicina. Observamos que a exposição das células à gentamicina inibiu necrose e apoptose e aumentou a proliferação celular. Estes efeitos foram potencializados pela indução com HO-1 mais HEMINA e o bloqueio do receptor de endotelina-1 com bosentana.

In vivo, o *priming* dos rins de ratos com gentamicina preveniu contra IRA e inibiu o dano oxidativo de lipídios e proteínas no tecido renal. Houve um aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, além de elevação na expressão e na atividade da HO-1 (HSP 32) nos rins.

MATERIAIS E MÉTODOS

EXPERIMENTOS IN VITRO

Cultura celular: as células tubulares proximais humanas (HK-2) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco/mistura nutritiva F12 (DMEM/F12, GIBCO/Life Technologies, EUA) com soro fetal bovino a 10% (SFB, Gibco/Life Technologies), NaHCO₃ (24 mM), HEPES (10 mM) e penicilina/estreptomicina (50.000 U/L) (Gibco/Life Technologies).

Grupos experimentais: no estágio de semiconfluência, o meio foi substituído por DMEM sem SFB e as células foram tratadas como descrito a seguir (quatro culturas por grupo): Controle (CTL): as células foram cultivadas em DMEM por 24 horas. Gentamicina: as células foram tratadas com gentamicina (2 mM) por 24 horas. *Priming* (PI): as células foram tratadas com gentamicina (2 mM) por 24 horas e após oito (PI-8d) ou dezesseis dias (PI-16d) foram novamente estimuladas com gentamicina (2 mM) por 24 horas. PI + HEMINA: as células foram tratadas com gentamicina (2 mM) e concomitantemente expostas a HEMINA (indutor de HO-1, 0,05 ou 25 µM), (Sigma-Aldrich, MO, EUA) por 24 horas e após oito horas foram estimuladas com gentamicina (2 mM) e HEMINA por 24 horas. PI + ZPP: as células foram tratadas com gentamicina (2 mM) e concomitantemente expostas a ZPP (zinco protoporfirina, inibidor de HO-1,

10 µM), (Sigma-Aldrich, MO, EUA) por 24 horas e após oito horas foram novamente tratadas com gentamicina (2 mM) e ZPP por 24 horas. Gentamicina + BOS: as células foram tratadas com gentamicina (2 mM) e bosentana (antagonista não-específico da endotelina-1, 10 nM), (Actelion, Allschwil, Suíça) por 24 horas. PI + BOS: as células foram tratadas com gentamicina (2 mM) e bosentana (antagonista da endotelina-1, 10 nM) por 24 horas, e após oito dias foram novamente tratadas com gentamicina (2 mM) e bosentana por 24 horas.

Experimentos de viabilidade celular: a viabilidade celular foi determinada pela exclusão dos corantes fluorescentes (Sigma-Aldrich, EUA).¹⁷ As suspensões celulares foram incubadas em 0.3 µL de solução de laranja de acridina/brometo de etídio (100 µg/mL). As células que emitiram fluorescência verde (brometo de etídio) foram consideradas viáveis, e aquelas que emitiram fluorescência vermelha (laranja de acridina) foram consideradas inviáveis (necróticas). As suspensões celulares foram observadas sob microscopia de fluorescência em ampliação de 400X, e 200 células por frasco de cultura foram contadas. As células inviáveis foram descritas em função percentual em relação à contagem celular total.

Apoptose: o número de células apoptóticas foi determinado com o uso do corante HOE 33342 [Bisbenzimidazole HOE 33342 (2'-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol) triclórídrico] (Sigma-Aldrich, EUA). As suspensões celulares foram incubadas em with 10 µL de solução de HOE 33342 (1,0 mM) por 15 minutos para corar a cromatina.¹⁸ As células foram observadas sob microscopia óptica. As células azuis foram consideradas não-apoptóticas, enquanto as células com cromatina foram classificadas como apoptóticas. Foram contadas pelo menos 100 células por frasco de cultura. Os resultados foram relatados em função percentual de células apoptóticas.

Ensaio de proliferação: o sal de tetrazólio (MTT - brometo de 3-(4, 5-dimetiliazol-2)-2,5-difenil-tetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA) é reduzido pelas células vivas, resultando em formazana intracelular de cor púrpura que é solubilizada e quantificada por espectrofotometria. Mil células foram semeadas em placas com 96 poços e após 24 horas submetidas aos seus respectivos protocolos. Durante quatro dias, uma solução de MTT (5mg/ml) foi somada à placa com poços e incubada por três horas. Após esse período, 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foram acrescentados para solubilizar o MTT e a leitura de absorvância foi de 540 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Western Blot: córtex renal foi homogeneizado em 200 µl de tampão RIPA. Quarenta microgramas de proteína foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio a 10% e transferidos eletroforéticamente para uma membrana de PVDF com o auxílio de uma célula de transferência eletroforética Trans-Blott SD Semi-Dry (BIO-RAD, Hercules, CA).

Sítios ligantes não específicos foram bloqueados com 5% de albumina de soro bovino em solução TBS. Immunoblots foram incubados durante a noite a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: endotelina-1 (1:500, ABCAM, Cambridge, Reino Unido), tubulina (1:1000), GAPDH (1:1000) (Cell Signaling, MA, EUA) e HO-1 (1:500, Enzo Life Science, EUA). Após a lavagem, as membranas foram incubadas por duas horas a 4°C em anticorpo secundário conjugado a peroxidase de rábano (1:10000, Merk Millipore, MA, EUA). Bandas específicas de proteínas foram visualizadas com reagentes quimioluminescentes Immobilon (Merk Millipore, MA, EUA).

PCR em tempo real: o RNA total foi purificado com o kit TRIZOL (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). Dois microgramas de RNA total foram tratados com DNase (RQ1 RNase-Free DNase; Promega, Madison, WI, EUA). A transcrição reversa foi feita com kit de cDNA de alta capacidade de transcrição reversa (Life Technologies). A amplificação em tempo real foi realizada utilizando kit GeneAmp 7500/ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com iniciadores de reação seletivos para pré-pró endotelina (ppET-1), Heme oxigenase 1 (HO-1) e gene de manutenção β-actina. As sequências de iniciadores foram ppET-1 (sense: 5'-GAG AAA CCC ACT CCC AGT CCG GGA-3' e antisense: 5'-GAT GTC CAG GTG GCA GAA GTC CTA-3'), β-actina (sense: 5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC - 3' e antisense: 5' - ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC - 3') e HO-1 (sense: 5' AGA GGG AAT TCT CTT GGC TGG CTT - 3' e antisense: 5' ATG CCA TAG GCT CCT TCC TCC TTT-3'). A acumulação do produto do PCR em tempo real foi monitorizada através do corante intercalante SYBR Green I (Life Technologies).

Para fins de representação gráfica, a variação da ordem de grandeza foi então determinada pelo método 2-(ΔΔCt) segundo protocolos publicados¹⁹ e recomendações do fabricante.

Concentração de bilirrubina: os níveis de bilirrubina foram determinados com o uso de ácido sulfanílico diazotado, formando azobilirrubina.²⁰ O composto

formado foi mensurado por espectrofotometria a 560 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Ética animal: o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de São Paulo (0132/12). Cada grupo experimental foi composto por três animais e cada grupo experimental foi repetido três vezes.

Grupos experimentais: ratos Wistar machos pesando 200-250 g foram divididos em três grupos: controle (CTL): ratos que receberam injeção intraperitoneal (IP) de PBS por 10 dias. Gentamicina: ratos que receberam injeções IP de gentamicina (40 mg/kg de peso corporal, GARAMYCIN, Schering-Plough, EUA) por 10 dias. *Priming* (PI): animais preparados com injeções IP de gentamicina (40 mg/kg de peso corporal) por três dias e que, após uma semana, receberam injeções de gentamicina por mais 10 dias. PI + HEMINA: animais preparados com injeções IP de gentamicina e HEMINA (0,1 mg/kg de peso corporal) por três dias e que, após uma semana, receberam injeções IP de gentamicina e HEMINA por mais 10 dias. PI + BOS: animais preparados com injeções IP de gentamicina e bosentana (10 nM) por três dias e que, após uma semana, receberam injeções de gentamicina e bosentana por mais 10 dias.

Após 1 (Linha Basal) e 10 dias (Pós-T) do início dos protocolos experimentais, amostras de sangue foram colhidas da veia lateral da cauda. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta de urina. Os animais foram sacrificados 20 dias após o início do protocolo experimental e tiveram seus rins removidos para análise histológica.

Análise bioquímica: os níveis séricos de creatinina, ureia e proteína na urina foram verificados por espectrofotometria segundo os procedimentos descritos para kits diagnósticos comercialmente disponíveis (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil). A creatinina foi determinada por método colorimétrico baseado na reação de Jaffé.²¹ A ureia foi determinada por ensaio colorimétrico baseado na atividade da urease. A proteína urinária foi determinada por método colorimétrico baseado em vermelho de pirogalol/molibdato. Os resultados foram expressos em mg/dl para creatinina e ureia e mg/24 h para proteína urinária. As concentrações urinárias de sódio foram determinadas com um fotômetro de chama Micronal B462 (São Paulo, Brasil). A fração de excreção de sódio (FENa) foi expressa em porcentagem.

Imunoistoquímica: Os tecidos incluídos em parafina foram cortados em seções de 4 μm de espessura em micrótomo rotativo (Leica Microsystems, Herlev, Dinamarca). Os cortes de tecido renal foram então desparafinados e reidratados. Em seguida, foram aquecidos em solução de recuperação (1 mmol/l Tris, pH 9,0, com 0,5 mM EGTA) por 10 minutos para identificação dos antígenos. Ligações não-específicas foram evitadas pela incubação dos cortes em PBS com 1% de BSA, 0,05% de saponina e 0,2% de gelatina. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 5% de H_2O_2 em metanol absoluto por 10 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com anticorpos primários para heme-oxigenase 1 (HO-1, Stressgen, Assay Designs, Michigan, EUA), endotelina-1, catalase e superóxido dismutase 1 (Abcam, Cambridge, Reuni Unido) em diluição de 1:200 para ambos, durante a noite a 4°C. Após a lavagem, os cortes foram incubados em polímero marcado com peroxidase de rábano conjugado a anticorpo secundário (Dako, Dinamarca) por uma hora em temperatura ambiente. Os sítios das reações anticorpo-antígeno foram visualizados com 0,5% de tetracloro de 3,3'-diaminobenzidina (DAKO, Dinamarca) dissolvido em água destilada com 0,1% de H_2O_2 .

Dez cortes por animal ao longo do córtex renal foram analisados e contados a partir da marcação (corados em marrom claro a escuro). Os valores obtidos foram expressos em unidades arbitrárias.

Hidroperóxido urinário: os níveis urinários de hidroperóxido foram medidos por oxidação ferrosa com alaranjado de xilenol e ensaio FOX2 para hidroperóxido lipídico.²² Aliquotas de 100- μl de urina foram prontamente transferidas para frascos de micro-centrifugação com a adição de 900 μl de solução FOX2 compostas por alaranjado de xilenol (100 μM), hidroxitolueno butilado (4,4 mM), ácido sulfúrico (25 mM) e sulfato ferroso de amônia (250 μM). Após incubação, os frascos foram centrifugados a $18,200 \times g$ a 25 °C por 10 minutos. A absorvância do sobrenadante foi então determinada em 560 nm. O teor de hidroperóxido lipídico das amostras de urina foi determinado segundo o coeficiente molar (4,3 $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em $10^{-7} \text{ M}/\text{mg}$ de creatinina.

Atividade da superóxido dismutase: as amostras foram colocadas em 50 mM de tampão TrisHCl (pH 8,2), 1 mM EDTA e 2mM de pirogalol em HCl (10 mM). Elevação da absorvância foi observada em 420 nm por três minutos por espectrofotometria. Uma unidade de atividade enzimática é a taxa que inibe 50% da auto-oxidação do pirogalol conforme determinado

pela mudança da absorvância/min a 420 nm. O teor de proteína do lisado foi estimada e a atividade da SOD foi expressa em unidades/mg de proteína.

Atividade da catalase: a atividade da catalase nas amostras de córtex renal foi determinada segundo protocolo anteriormente descrito.²³ Os lisados de córtex renal foram dispostos em uma cubeta com tampão fosfato (pH 7,0) e H_2O_2 (30 mM). A atividade da catalase foi medida a 240 nm por um minuto utilizando espectrofotometria. O coeficiente de extinção molar da H_2O_2 , 43,6 M cm⁻¹ foi utilizado para determinar a atividade da catalase. Uma unidade de atividade foi considerada como igual a um micromol de H_2O_2 degradado por minuto e foi expressa em unidades por miligrama de proteína.

Análises de poder redutor: o poder redutor do plasma foi avaliado segundo os protocolos publicados.²⁴ Amostras de plasma foram misturadas com reagente FRAP (300 mM tampão acetato, pH 3,6, 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ, 10mM) em 40mM de HCl e $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mM)). A mistura foi incubada a 37°C por cinco minutos e a camada superior da solução foi analisada a 595 nm contra um branco de amostra. A absorvância foi comparada à curva padrão do ácido ascórbico e expressa em mM.

Medição de carbonilação proteica: a determinação da carbonilação proteica foi realizada segundo relatos anteriores.²⁵ Extratos de proteína renal foram ressuspensos em 1ml de 10 mM 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em 2 M HCl por 1h. As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (50%) e centrifugadas a 11, 000 × g por 5 minutos. Depois foram lavadas três vezes com 1 mL de etanol-acetato de etila (1:1; v/v) para remover os resíduos do reagente DNPH. Os precipitados finais foram dissolvidos em soluções 6 N de hidrócloro de guanidina (1 mL) e o teor de carbonila na proteína foi determinado pela medida da absorvância de derivados da proteína 2, 4 dinitrofenilhidrazina a 365 nm, utilizando um coeficiente de absorção molar de 22.000 M⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos em 10⁻⁷ M/mg de creatinina.

Peroxidação lipídica: a peroxidação lipídica foi medida pelo ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). As substâncias reativas se combinam com o ácido tiobarbitúrico, formando um composto avermelhado. A curva do malondialdeído foi utilizada como referência, e os resultados foram expressos em mM de MDA/mg de proteína. As amostras de urina foram colocadas em solução de 0,375% ácido tiobarbitúrico, 15% ácido tricloroacético e 0,25 N HCl (Sigma, Saint Louis, EUA); então elas foram continuamente agitadas

enquanto eram aquecidas a 95°C por 20 minutos e depois foram deixadas para resfriar em temperatura ambiente. A absorvância foi determinada por espectrofotometria em 535 nm.²⁶ O nível de proteínas nas amostras de urina foram avaliadas como descrito anteriormente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média ± EP. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) fator único seguido pelo teste de Tukey. Eventos com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra que o efeito benéfico do *priming* sobre a viabilidade celular é prolongado. O grupo submetido a *priming* teve decréscimo significativo em necrose (PI-16d: 2,3 ± 0,3; Gentamicina: 25,4 ± 1,5%) e apoptose (PI-16d: 2,1 ± 0,3; Gentamicina: 19,4 ± 1,4%) em comparação aos indivíduos do grupo gentamicina. Este efeito foi observado oito ou dezesseis dias após o *priming*.

Os efeitos do *priming* foram explicados por mais de um mecanismo,^{1,4,27,28} que provavelmente interagem entre si em circunstâncias tóxicas. A Figura 2 demonstra a participação da endotelina-1 nesse mecanismo. As células pré-tratadas demonstraram expressão aumentada de pré-pró endotelina (12,0 ± 3,3 UA) (Figura 2A) em comparação às células de controle (1,2 ± 0,4 UA) e ao grupo tratado com gentamicina (5,0 ± 1,3 UA). O tratamento com bosentana bloqueou, pelo menos parcialmente, tal aumento (4,6 ± 0,6 UA). Resultados semelhantes foram observados na síntese de endotelina-1 (Figura 2B).

As células submetidas a *priming* exibiram aumento na proliferação em relação ao grupo gentamicina após três dias em condições de cultura. O bloqueio dos receptores de endotelina-1 com bosentana evitou tal aumento, sugerindo um efeito direto da ET-1 sobre a proliferação observada nas células pré-tratadas (Figura 2C).

Em condições experimentais, as células pré-tratadas exibiram reduções significativas de necrose (14,1 ± 0,8%) e apoptose (12,5 ± 0,8%) em comparação aos níveis de necrose (27,4 ± 0,4%) e apoptose (22,8 ± 0,7%) observados no grupo gentamicina. O tratamento com bosentana potencializou de forma significativa o efeito protetor do *priming* contra necrose (7,3 ± 0,3%) e apoptose (7,1 ± 0,6%) (Figura 2D).

A Figura 3 exhibe a enzima antioxidante heme-oxigenase 1. Não houve diferenças na expressão de HO-1 na maioria dos grupos, exceto pelas células

Figura 1. Viabilidade *in vitro*. Morte celular necrótica (A) e apoptótica (B) de células HK-2 em condições de controle (CTL), células submetidas a *priming* com gentamicina (Gentamicina, 2 mM) por 24 h e novamente expostas ao antibiótico após 8 (PI-8d) e 16 dias (PI-16d). (*) $p < 0,05$ em comparação a CTL. (+) $p < 0,05$ em comparação ao grupo Gentamicina.

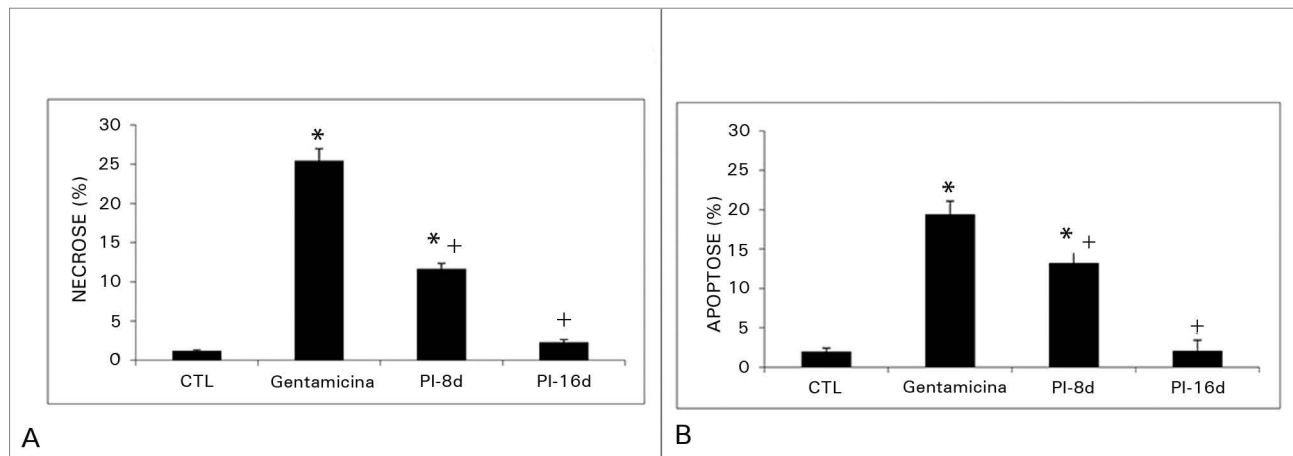


Figura 2. Efeito *in vitro* da ET-1. Expressão de ppET-1 medida por PCR em tempo real (A), síntese de ET-1 avaliada por western blot e quantificação gráfica (B), proliferação celular medida por ensaio MTT (C) e morte celular necrótica e apoptótica (D) em células HK-2 em condições de controle (CTL), estimuladas com gentamicina (Gentamicina, 2 mM), submetidas a *priming* com gentamicina (PI), submetidas a *priming* com gentamicina e concomitantemente tratadas com o antagonista do receptor da ET bosentana (PI+BOS), ou tratadas com bosentana apenas (BOS, 10 nM). (*) $p < 0,05$ em comparação a CTL. (#) $p < 0,05$ em comparação a PI e (+) $p < 0,05$ em comparação a Gentamicina.

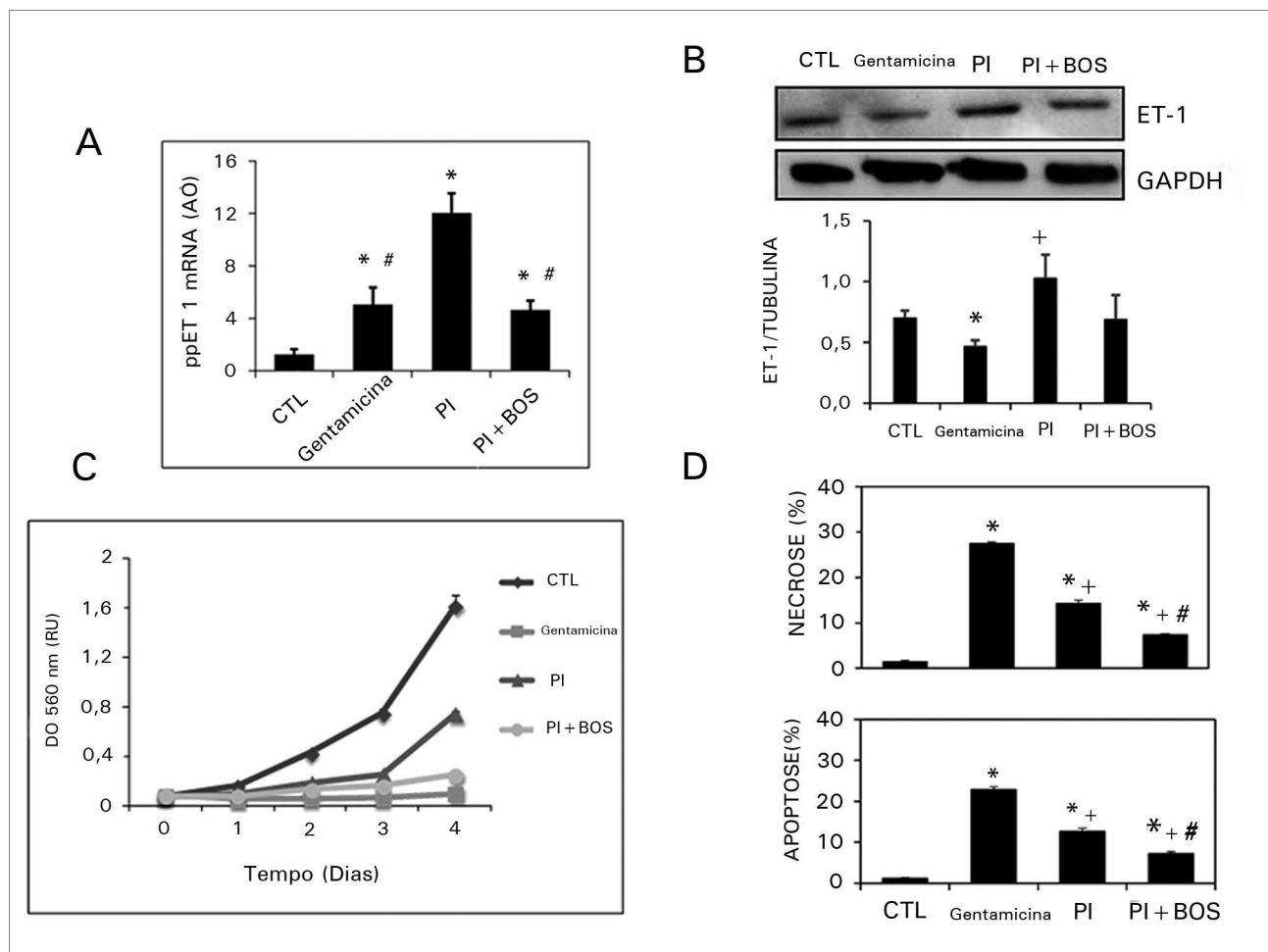
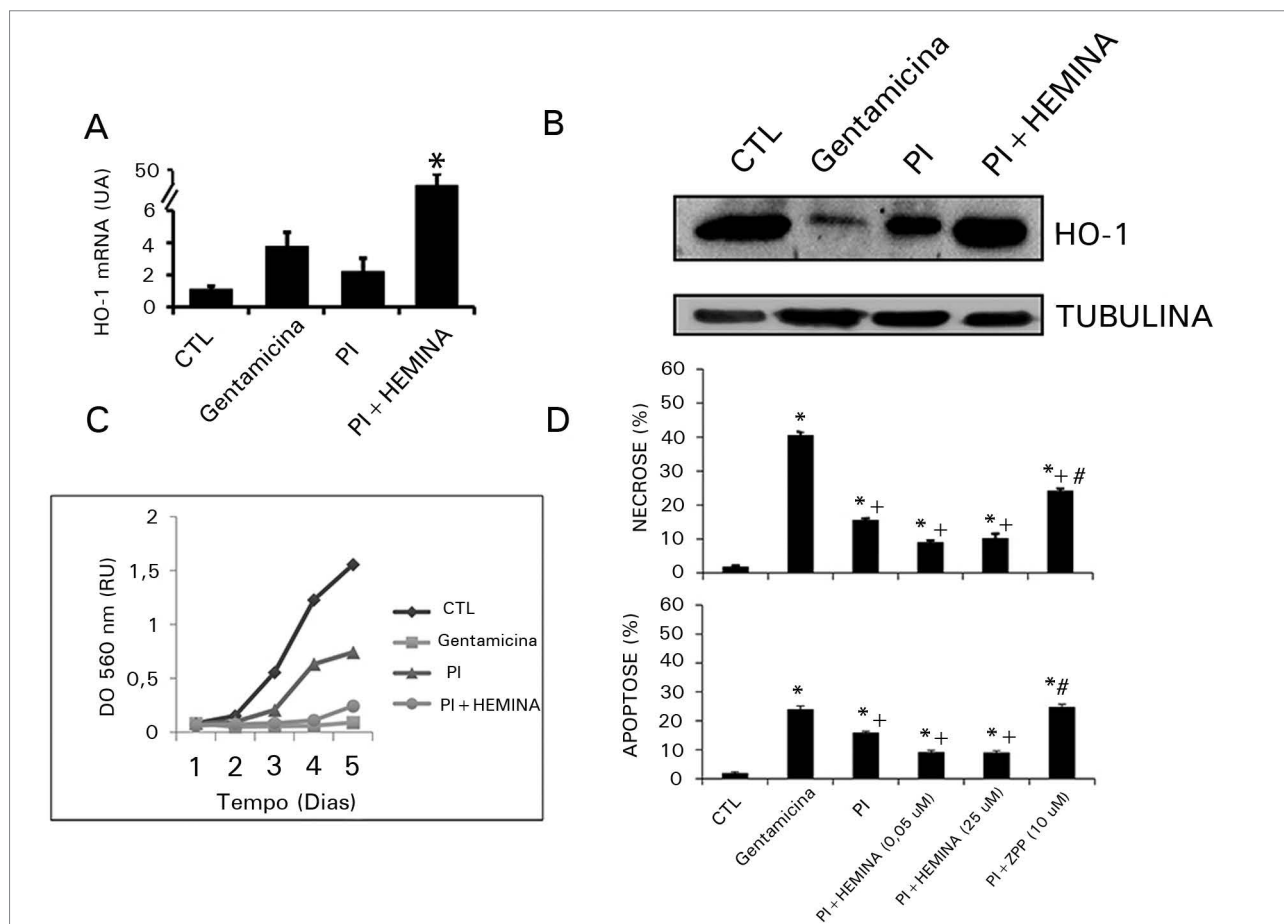


Figura 3. Efeito *in vitro* da HO-1. A expressão da HO-1 foi medida por PCR em tempo real (A), a síntese de HO-1 foi medida por western blot (B), a proliferação celular por ensaio MTT (C) e a morte celular necrótica e apoptótica (D) em células HK-2 sob condições de controle (CTL), estimuladas com gentamicina (Gentamicina, 2 mM), submetidas a *priming* com gentamicina (PI), submetidas a *priming* com gentamicina e concomitantemente tratadas com indutor de HO-1 hemina (PI+HEMINA), ou submetidas a *priming* com gentamicina e concomitantemente tratadas com inibidor de HO-1 ZPP (PI+ZPP). (*) $p < 0,05$ em comparação a CTL. (+) $p < 0,05$ em comparação a Gentamicina; (#) $p < 0,05$ em comparação a PI.



HK-2 pré-tratadas estimuladas com Hemina, como já era esperado (Figura 3A). Não obstante, os níveis da proteína HO-1 estavam reduzidos nas células expostas a gentamicina, condição esta revertida nas células submetidas a *priming* expostas ou não a hemina (Figura 3B).

O efeito da HO-1 sobre a proliferação é analisado na Figura 3C. As células submetidas a *priming* exibiram aumento na proliferação, mas este efeito foi embotado pelo tratamento com Hemina, sugerindo que a atividade da HO-1 não está envolvida na proliferação celular.

Sob tais condições experimentais, o grupo HK-2 pré-tratado exibiu redução de necrose ($15,6 \pm 0,4\%$) e apoptose ($15,9 \pm 0,9\%$) em relação aos níveis de morte celular observados nas células estimuladas com gentamicina. A Hemina (25 µM) potencializa o efeito do *priming* sobre necrose ($10,2 \pm 1,3\%$) e apoptose ($9,0 \pm 0,5\%$). Entrementes, ZPP (10 µM) reverteu o efeito do *priming* sobre necrose ($24,2 \pm 0,6\%$) e apoptose ($24,7 \pm 1,0\%$) (Figura 3D).

Os parâmetros bioquímicos observados nos diferentes grupos na linha basal e pós-T encontram-se na Tabela 1. Não foram observadas diferenças entre os grupos analisados na linha basal.

O grupo gentamicina mostrou aumento significativo em creatinina sérica, ureia, proteína urinária, volume e FENa no período pós-T, mas nenhuma diferença foi observada no peso corporal dos animais. Nos animais pré-tratados com antibiótico, o aumento dos parâmetros bioquímicos foi significativamente embotado. Além disso, o tratamento dos animais submetidos a *priming* com bosentana ou hemina potencializou o efeito protetor do *priming* segundo parâmetros bioquímicos. Houve redução de creatinina sérica, ureia e FENa nos grupos PI+HEMINA e PI+BOS em relação ao grupo PI, mas não em proteína urinária ou volume, como mostrado na Tabela 1. Estes resultados mostram que o tratamento com hemina e bosentana potencializou o efeito do *priming* também em condição *in vivo*.

TABELA 1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

	CTL		Gentamicina		PI		PI + HEMINA		PI + BOS	
	Linha Basal	Pós-T	Linha Basal	Pós-T	Linha Basal	Pós-T	Linha Basal	Pós-T	Linha Basal	Pós-T
Cr (mg/dL)	0,39 ± 0,08	0,45 ± 0,07	0,34 ± 0,01	5,09 ± 0,34*	0,31 ± 0,04	1,55 ± 0,35*	0,31 ± 0,04	0,48 ± 0,03* ⁺	0,53 ± 0,08	0,51 ± 0,04* ⁺
U (mg/dL)	35,32 ± 2,43	34,28 ± 2,52	34,99 ± 3,22	144,25 ± 1,5*	35,45 ± 2,57	101,33 ± 2,7 [#]	35,42 ± 2,53	45,81 ± 1,62* ⁺	42,03 ± 6,19	46,53 ± 3,46* ⁺
Proteinúria (mg/24hs)	7,42 ± 0,41	6,81 ± 0,61	9,11 ± 1,12	34,29 ± 3,44*	4,21 ± 2,32	10,20 ± 2,01 [#]	7,2 ± 1,6	17,0 ± 0,9 [#]	7,24 ± 1,64	17,01 ± 0,91 [#]
FENa (%)	0,43 ± 0,18	0,50 ± 0,11	0,31 ± 0,05	2,97 ± 0,61*	0,22 ± 0,03	1,46 ± 0,33 [#]	0,21 ± 0,06	0,71 ± 0,01* ⁺	0,30 ± 0,05	0,56 ± 0,08* ⁺
VU (ml)	8,15 ± 0,61	8,55 ± 0,73	12,12 ± 1,54	21 ± 2,35*	5,13 ± 2,30	7,81 ± 1,11 [#]	8,82 ± 0,71	13,30 ± 0,82 [#]	7,82 ± 1,74	9,62 ± 2,42 [#]
PC (g)	224 ± 0,51	245 ± 0,62	224 ± 0,87	241 ± 0,7	233 ± 0,54	251 ± 0,59	226,6 ± 0,57	248,3 ± 0,45	226,6 ± 0,41	246,3 ± 0,74

* $p < 0,05$ x CTL; [#] $p < 0,05$ x Gentamicina + $p < 0,05$ x PI; Dados expressos como média ± MEP. Os grupos experimentais foram comparados por análise de variância (ANOVA) fator único e teste de Tukey. O nível de significância para a hipótese de nulidade foi configurado em 5% ($p < 0,05$). PC (peso corporal), VU (volume urinário), Cr (creatinina sérica), U (ureia sérica), FENa (excreção da fração de sódio) foram analisadas nos grupos CTL, Gentamicina, PI, PI + HEMINA e PI + BOS.

A Figura 4 mostra a imunoistoquímica do córtex renal dos diferentes grupos de animais. Nos animais submetidos a *priming* ($17,6 \pm 2,1\%$) e tratados com gentamicina ($54,5 \pm 2,7\%$), como observado nas células tubulares, houve aumento significativo na coloração para endotelina-1 em relação ao grupo de controle ($0,87 \pm 0,39\%$).

Como observado *in vitro*, os animais submetidos a *priming* ($9,7 \pm 3,6\%$) e tratamento com gentamicina ($8,5 \pm 2,5\%$) mostraram elevações na coloração para HO-1 em relação ao grupo de controle ($2,7 \pm 1,1\%$). Curiosamente, outras enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase 1 também apresentaram elevação em relação ao grupo de controle e aos animais tratados com gentamicina, respectivamente.

A heme-oxigenase degrada o grupo heme em CO, ferro livre e biliverdina, que é rapidamente convertida em bilirrubina pela bilirrubina redutase.²⁰ Analisamos indiretamente a atividade da HO-1 pelo teor de bilirrubina no extrato de córtex renal (Figura 5A). O teor de bilirrubina no córtex renal foi mais elevado nos grupos gentamicina ($1,69 \pm 0,16$ µg/mg de proteína) e *priming* ($2,22 \pm 0,22$ µg/mg de proteína) em relação ao grupo de controle ($0,63 \pm 0,11$ µg/mg de proteína).

As Figuras 5B e C mostram as atividades de outras enzimas antioxidantes. Houve aumento significativo na atividade da catalase nos animais submetidos a *priming* ($2,35 \pm 0,03$ U/mg de proteína) em relação ao grupo de controle ($1,49 \pm 0,06$ U/mg de proteína) e aos animais tratados com gentamicina ($1,5 \pm 0,1$ U/mg de proteína) (Figura 5B). A atividade da superóxido dismutase também aumentou apenas nos animais submetidos a *priming* (PI: $7,33 \pm 0,23$ U/mg de proteína) em relação

aos indivíduos tratados com antibiótico e ao grupo de controle (Gentamicina: $4,06 \pm 0,49$; CTL: $4,34 \pm 0,71$ U/mg de proteína). Além disso, a fração antioxidante do plasma mostrou-se aumentada nos animais submetidos a *priming* ($0,48 \pm 0,02$ mM) em comparação ao grupo gentamicina ($0,26 \pm 0,03$ mM) e de controle ($0,26 \pm 0,01$ mM) (Figura 5D). Com efeito, estes resultados reforçam que o *priming* estimula a defesa antioxidante nos rins.

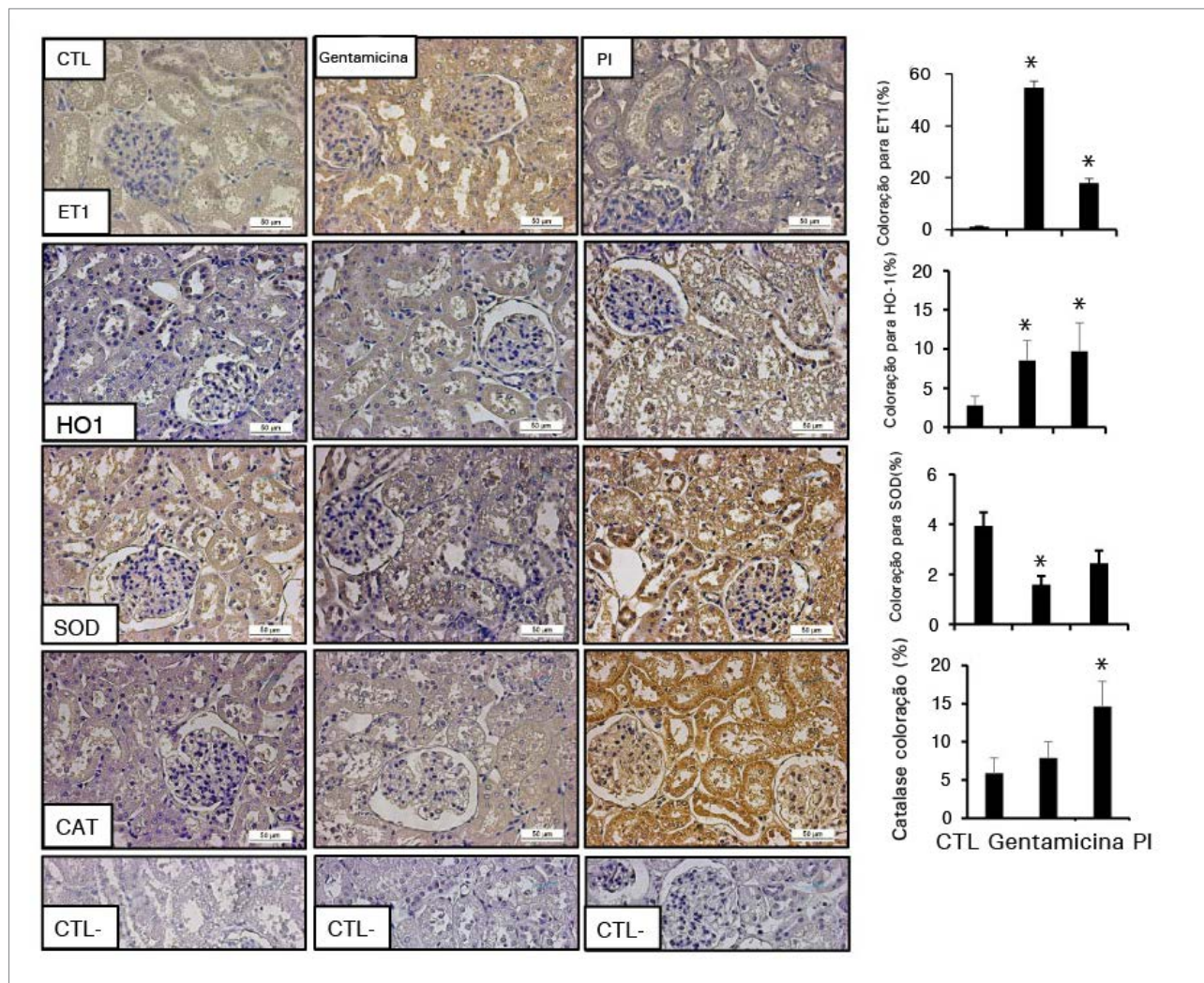
A Figura 6 mostra o stress oxidativo analisado por meio dos peróxidos urinários e proteína carbonilada nos diferentes grupos.

Não houve diferença significativa entre os grupos na linha basal, mas os peróxidos urinários (Gentamicina: $9,0 \pm 1,2$; CTL: $2,1 \pm 0,05 \cdot 10^{-7}$ M/mg de creatinina) e proteína carbonilada (Gentamicina: $14,1 \pm 0,6$; CTL: $3,3 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$ M/mg de creatinina) se elevaram significativamente no período pós-gentamicina. O *priming* dos animais com gentamicina bloqueou a elevação de peróxidos urinários (PI: $4,5 \pm 0,4 \cdot 10^{-7}$ M/mg de creatinina) e proteína carbonilada (PI: $7,2 \pm 0,9 \cdot 10^{-7}$ M/mg de creatinina) induzida pelo antibiótico (Figuras 2A e 2B). A peroxidação lipídica seguiu o mesmo padrão. No período pós-T, houve aumento no grupo gentamicina em relação ao grupo de controle. Nos animais submetidos a *priming*, a peroxidação lipídica foi embotada.

DISCUSSÃO

O estudo do mecanismo do *priming* em células e tecidos pode ajudar a prevenir ou tratar os efeitos tóxicos dos antibióticos aminoglicosídeos e outros agentes nefrotóxicos. Vários estudos demonstraram os efeitos benéficos da estimulação das defesas antioxidantes no tratamento da

Figura 4. Análise imunoistoquímica. Cortes em microscopia óptica (4 µm) de imunoistoquímica renal corada com anticorpos contra heme-oxigenase 1 (HO-1), catalase (CAT), superóxido dismutase 1 (SOD) e endotelina-1 (ET-1) em ratos de controle (CTL), animais estimulados com gentamicina por 10 dias (GENTAMICINA), animais submetidos a priming com gentamicina por 3 dias e, depois de uma semana, estimulados com antibiótico por 10 dias (PI). (*) $p < 0,05$ em comparação ao grupo CTL.



IRA,^{15,16,29} mas até o momento as investigações sobre seu uso na prática clínica não foram suficientemente aprofundadas. Nosso estudo mostra que o mecanismo persistente e multifatorial do *priming* atua através da indução de enzimas antioxidantes, elevações na fração antioxidante do plasma, inibição do stress oxidativo, inibição da produção de endotelina-1^{22,25} e provavelmente outros fatores ainda não determinados. Estratégias baseadas em uma única abordagem talvez não sejam suficientes.

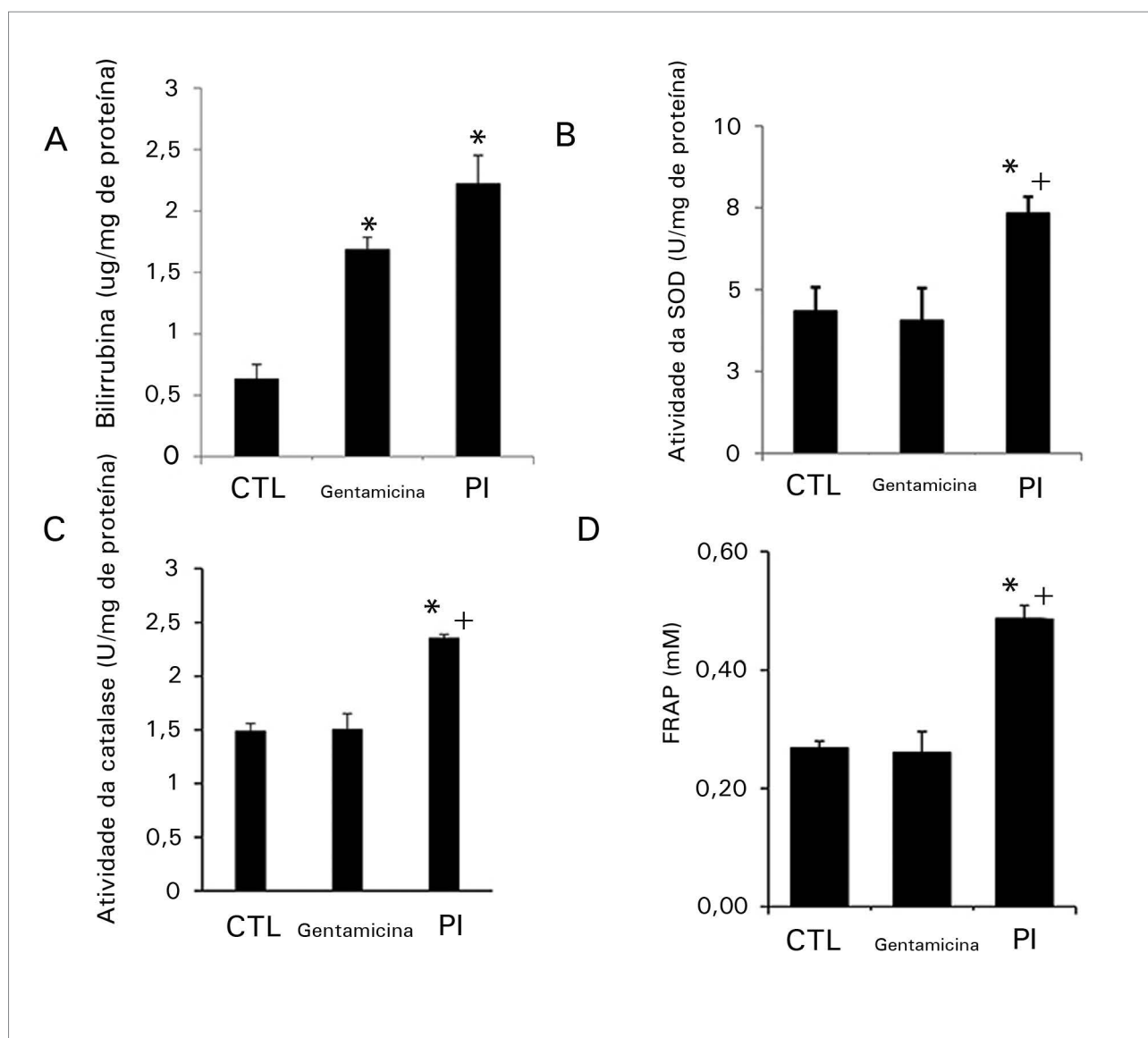
Tanto as células tubulares como os rins de ratos resistiram à toxicidade por gentamicina. Nas células tubulares proximais humanas pré-tratadas com gentamicina, observamos uma redução significativa na necrose e na apoptose 24 horas após o *priming*, em achado que persistiu mesmo 16 dias após o tratamento. Além disso, observamos aumento da proliferação celular por 96 horas em comparação às células tratadas com gentamicina. Com efeito, trabalhos anteriores de nosso

grupo demonstram este mesmo achado em outras linhagens celulares^{30,31} assim como os trabalhos de outros autores.²⁸ Porém, demonstramos que a endotelina-1 está imbricada neste efeito. A produção de endotelina-1 foi aumentada nas células submetidas a *priming*. O bloqueio dos receptores da ET-1 com bosentana inibiu a proliferação, sugerindo efeito direto em exposições por longos períodos como visto no *priming*.

Além disso, a endotelina-1 pode apresentar efeito deletério de curto prazo, uma vez que sua expressão foi elevada no grupo gentamicina. O tratamento com bosentana em 24 horas inibiu a morte celular e potencializou o efeito inibitório do *priming* sobre a morte celular em 24 horas. Este achado sugere que a endotelina-1 esteja envolvida neste mecanismo de proteção, no mínimo através do estímulo da proliferação das células tubulares sobreviventes.

A endotelina-1 é produzida no rim humano principalmente no glomérulo, além de nas células

Figura 5. Atividade antioxidante *in vivo*. (A) Concentração de bilirrubina em unidades de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, (B) atividade da SOD em unidades de U/mg de proteína, (C) atividade da catalase em unidades de U/mg de proteína no rim e (D) quantificação da fração antioxidante do plasma em mM dos animais do grupo de controle (CTL), animais estimulados com gentamicina por 10 dias seguidos (Gentamicina, 40 mg/kg) e animais submetidos a priming com gentamicina por 3 dias e estimulados novamente com gentamicina por 10 dias após uma semana de repouso (PI). Linha basal (barras brancas): valores de todos os grupos antes da estimulação, Pós-T (barras pretas): valores obtidos após estimulação com gentamicina em todos os grupos. (*) $p < 0,05$ em comparação a CTL. (+) $p < 0,05$ em comparação a grupo Gentamicina.



tubulares.³² A ET-1 tem importantes efeitos fibróticos, inflamatórios e proliferativos sobre o tecido renal. No rim, os ratos de ambos os grupos estimulados com gentamicina e submetidos a *priming* com antibiótico apresentaram aumento de endotelina-1 no glomérulo e nos segmentos tubulares parcialmente bloqueados pela bosentana.

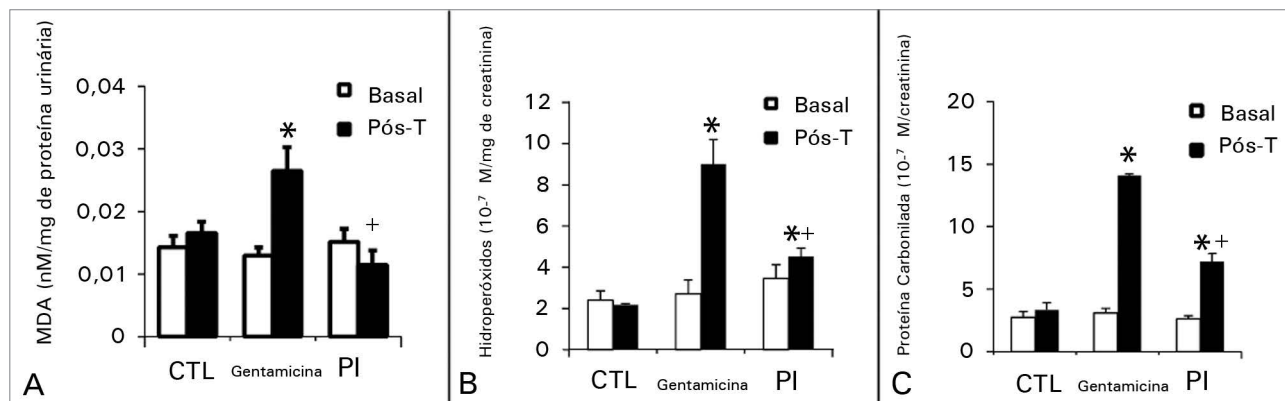
Os rins submetidos a *priming* apresentaram melhora da função renal, como demonstrado pelas reduções de creatinina, ureia, proteinúria e excreção de sódio. O tratamento com bosentana potencializa essa melhora na maioria dos parâmetros, exceto pela proteinúria. Além disso, os rins estimulados

com gentamicina apresentaram aumento nas células inflamatórias intersticiais, em achado não observado nos rins submetidos a *priming*. Quando considerados conjuntamente, estes resultados corroboram a hipótese de que a endotelina-1 está imbricada no mecanismo do *priming* tanto *in vivo* como *in vitro*.

Lesões oxidativas estão presentes em várias causas de insuficiência renal aguda induzida por glicerol,³³ antibióticos aminoglicosídeos¹⁵ e isquemia.³⁴ Não é surpresa que a potencialização das defesas antioxidantes possa agir na prevenção da IRA.

Foi anteriormente demonstrado por nosso laboratório^{30, 31} que o *priming* de células ou tecidos com

Figura 6. Stress oxidativo *in vivo*. (A) Peroxidação lipídica na urina indicada por malondialdeído e expressa em unidades de nM/mg de proteína, (B) hidroperóxidos e (C) proteína carbonilada na urina expressa em unidades de M/creatinina em animais do grupo de controle (CTL), animais estimulados com gentamicina por 10 dias seguidos (Gentamicina, 40 mg/kg) e animais submetidos a *priming* com gentamicina por 3 dias e estimulados com gentamicina por 10 dias após uma semana de repouso (PI). valores de todos os grupos antes da estimulação, Pós-T (barras pretas): valores obtidos após estimulação com gentamicina em todos os grupos. * $p < 0,05$ em comparação a CTL.+ $p < 0,05$ em comparação a grupo Gentamicina.



antibióticos nefrotóxicos estimula as defesas antioxidantes e inibe o stress oxidativo.

Células tubulares estimuladas com gentamicina apresentaram redução de HO-1 que ocorreu apenas parcialmente em células submetidas a *priming*. O tratamento de células tubulares proximais com hemina potencializou e com ZPP inibiu o efeito do *priming* sobre a morte celular, sugerindo que a HO-1 também participa do mecanismo de *priming* das células epiteliais.

Rins estimulados com gentamicina e submetidos a *priming* exibiram aumento da heme-oxigenase 1. A enzima catalisa o grupo heme em CO, ferro livre e biliverdina, que é rapidamente convertida em bilirrubina. O ferro livre é possivelmente sequestrado por indução da ferritina, mas o CO e a bilirrubina podem atuar como antioxidantes.²⁰ A hemina potencializou o efeito protetor nos rins de ratos submetidos a *priming*. Este resultado sugere que a elevação da atividade da HO-1 aprimora o efeito protetor do *priming*, mas não podemos descartar outros mecanismos.

As outras enzimas antioxidantes expressas nos rins incluem a superóxido dismutase, que degrada o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é metabolizado pela catalase e pela glutathione peroxidase em água e oxigênio. Houve elevação da atividade da catalase e da superóxido dismutase nos rins dos animais submetidos a *priming*. O peróxido de hidrogênio é um importante radical livre produzido pela célula sob estímulo de agente tóxico. Nossos resultados mostram que o aumento nos peróxidos urinários e a peroxidação lipídica induzida pela gentamicina foram embotados na urina dos animais submetidos a *priming*.

O principal antioxidante não-enzimático presente no plasma é ácido ascórbico.³⁵ Curiosamente, nossos resultados mostram que animais submetidos a *priming* tiveram elevação na fração antioxidante do plasma, o

que indica que os efeitos do processo de pré-tratamento não se limitaram aos rins e que o estímulo da defesa antioxidante pode proteger outros órgãos. Este resultado sugere que o *priming* dos rins pode conferir resistência a outros órgãos também lesionados pelo antibiótico. Tal hipótese, contudo, ainda carece de confirmação.

Nosso trabalho destacou a importância do mecanismo do *priming* na proteção dos rins contra a IRA nefrotóxica. O pré-tratamento dos rins com gentamicina pode elevar o risco de resistência medicamentosa, mas o estímulo da defesa antioxidante ou o tratamento dos pacientes com agentes quelante pode eficientemente mimetizar o processo de *priming* e, talvez, servir de prevenção contra o desenvolvimento da IRA.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho contou com os apoios financeiros das seguintes instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Oswaldo Ramos (FOR), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Não recebemos incentivos comerciais ou financeiros diretos ou indiretos em associação à publicação do presente artigo. Além disso, os autores declaram não ter conflitos de interesse; as fontes de financiamento extra-institucional estão indicadas no manuscrito.

Todos os autores participaram do delineamento, interpretação, análise e revisão dos dados e do texto do artigo; FD, EAP, LAP realizaram os experimentos, FD e FTB redigiram o manuscrito e NS fez a leitura crítica do mesmo.

REFERÊNCIAS

- Korrapati MC, Lock EA, Mehendale HM. Molecular mechanisms of enhanced renal cell division in protection against S-1,2-dichlorovinyl-L-cysteine-induced acute renal failure and death. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F175-85. PMID: 15741605 DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00418.2004>
- Vaidya VS, Shankar K, Lock EA, Bucci TJ, Mehendale HM. Renal injury and repair following S-1, 2 dichlorovinyl-L-cysteine administration to mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;188:110-21. PMID: 12691729 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-008X\(02\)00080-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-008X(02)00080-7)
- Vaidya VS, Shankar K, Lock EA, Bucci TJ, Mehendale HM. Role of tissue repair in survival from s-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine-induced acute renal tubular necrosis in the mouse. *Toxicol Sci* 2003;74:215-27. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfg111>
- Korrapati MC, Chilakapati J, Lock EA, Latendresse JR, Warbritton A, Mehendale HM. Preplaced cell division: a critical mechanism of autoprotection against S-1,2-dichlorovinyl-L-cysteine-induced acute renal failure and death in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F439-55. PMID: 16495211 DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00384.2005>
- Philip BK, Anand SS, Palkar PS, Mumtaz MM, Latendresse JR, Mehendale HM. Subchronic chloroform priming protects mice from a subsequently administered lethal dose of chloroform. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;216:108-21. PMID: 16815507 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2006.04.012>
- Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2012;7:e32296. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032296>
- Yuan Q, Hong S, Han S, Zeng L, Liu F, Ding G, et al. Preconditioning with physiological levels of ethanol protect kidney against ischemia/reperfusion injury by modulating oxidative stress. *PLoS One* 2011;6:e25811. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025811>
- Zhu SB, Liu Y, Zhu Y, Yin GL, Wang RP, Zhang Y, et al. Remote preconditioning, preconditioning, and postconditioning: a comparative study of their cardio-protective properties in rat models. *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68:263-8. DOI: [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2013\(02\)OA22](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2013(02)OA22)
- Thuret R, Saint Yves T, Tillou X, Chatauret N, Thuillier R, Barrou B, et al. Ischemic pre- and post-conditioning: current clinical applications. *Prog Urol* 2014;24:S56-61. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1166-7087\(14\)70065-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1166-7087(14)70065-X)
- Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* 1995;26:1477-87. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)00049-6](http://dx.doi.org/10.1016/0306-3623(95)00049-6)
- Bennett WM. Comparison of cyclosporine nephrotoxicity with aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 1986;25:S126-9. PMID: 3519022 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(86\)80100-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(86)80100-7)
- Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 1981;19:288-96. PMID: 7014984 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1981.19>
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;450:67-76. PMID: 12176111 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01749-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01749-1)
- Krüger B, Benck U, Singer T, Krämer BK. Drug-induced impairment of renal function. *Dtsch Med Wochenschr* 2012;137:1873-7. PMID: 22971974
- Naidu MU, Shifow AA, Kumar KV, Ratnakar KS. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* 2000;7:191-7. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80003-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80003-3)
- Farombi EO, Ekor M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2006;44:1443-8. PMID: 16814915 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.05.005>
- Coico R. In vitro assays for mouse B and T cell function. Related isolation procedures and functional assays. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, ed. *Current protocols in immunology*. New York: John Wiley & Sons; 1995. p.1-33.
- Filatov MV, Varfolomeeva EY. Active dissociation of Hoechst 33342 from DNA in living mammalian cells. *Mutat Res* 1995;327:209-15. PMID: 7870089 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)00189-C](http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107(94)00189-C)
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Martinek RG. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clin Chim Acta* 1966;13:161-70. PMID: 5941734 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(66\)90290-7](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(66)90290-7)
- Taussky HH. A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. *J Biol Chem* 1954;208:853-61. PMID: 13174594
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994;220:403-9. PMID: 7978285 DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1994.1357>
- Aebi H. Catalase. In: Packer L, ed. *Methods in Enzymology*. Orlando: Academic Press; 1984. p.121-6.
- Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999;299:15-27. PMID: 9916193
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:790-6. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00765-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00765-7)
- Naziroglu M, Cay M. Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Biol Trace Elem Res* 2001;79:149-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/BTER:79:2:149>
- Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischaemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res* 1992;26:226-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/26.3.226>
- Chang CZ, Wu SC, Lin CL, Hwang SL, Howng SL, Kwan AL. Atorvastatin preconditioning attenuates the production of endothelin-1 and prevents experimental vasospasm in rats. *Acta Neurochir (Wien)* 2010;152:1399-406. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-010-0652-3>
- Mitchell T, Rotaru D, Saba H, Smith RA, Murphy MP, MacMillan-Crow LA. The mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone protects against cold storage injury of renal tubular cells and rat kidneys. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;336:682-92. PMID: 21159749 DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.110.176743>
- Pessoa EA, Convento MB, Silva RG, Oliveira AS, Borges FT, Schor N. Gentamicin-induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide production but not the synthesis of heat shock protein. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:614-20. PMID: 19466282 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000005>
- Pessoa EA, Convento MB, Ribas OS, Tristão VR, Reis LA, Borges FT, et al. Preconditioning induced by gentamicin protects against acute kidney injury: the role of prostaglandins but not nitric oxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;253:1-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.02.022>
- Kohan DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kidney Dis* 1997;29:2-26. PMID: 9002526 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(97\)90004-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(97)90004-4)
- Martim EC, Pinto CF, Watanabe M, Vattimo Mde F. Acute kidney injury by glycerol: antioxidant effect of Vitis vinifera L. *Rev Bras Ter Intensiva* 2007;19:292-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2007000300004>
- Dare AJ, Bolton EA, Pettigrew GJ, Bradley JA, Saeb-Parsy K, Murphy MP. Protection against renal ischemia-reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biol* 2015;5:163-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.04.008>
- Gasparetto C, Malinverno A, Culacciati D, Gritti D, Prosperini PG, Specchia G, et al. Antioxidant vitamins reduce oxidative stress and ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005;18:487-96.