

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

NATÁLIA KRYZIA DOS SANTOS LIMA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO TARDIO DA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA
POR ISQUEMIA REPERFUSÃO NO TRANSPORTE DE Na⁺ DEPENDENTE DE
ATP DO TÚBULO PROXIMAL**

Recife
2019

NATÁLIA KRYZIA DOS SANTOS LIMA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO TARDIO DA LESÃO RENAL
AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA REPERFUSÃO NO
TRANSPORTE DE Na⁺ DEPENDENTE DE ATP DO TÚBULO
PROXIMAL**

Dissertação apresentada como requisito para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

Recife
2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Lima, Natália Kryzia dos Santos

Avaliação do impacto tardio da lesão renal aguda induzida por isquemia reperfusão no transporte de Na⁺ dependente de ATP do túbulo proximal / Natália Kryzia dos Santos Lima – 2019.

102 f.: fig., tab.

Orientador: Leucio Duarte Vieira Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2019.

Inclui referências

1. Doença renal 2. Hipertensão 3. Transporte de sódio I. Vieira Filho, Leucio Duarte (orient.) II. Título.

616.6107

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 069

NATÁLIA KRYZIA DOS SANTOS LIMA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO TARDIO DA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA
POR ISQUEMIA REPERFUSÃO NO TRANSPORTE DE Na⁺ DEPENDENTE DE
ATP DO TÚBULO PROXIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 26/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho – Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Claudia Jacques Lagranha – Examinador interno
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes – Examinador externo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Humberto Muzi Filho – Examinador externo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Aos meus pais, com amor, por confiarem
nos meus sonhos e mostrarem o valor da
educação.

Ao meu irmão, para que ele tenha como
exemplo e persista no que acredita,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pela vida, por todas as oportunidades, por me permitir vivenciar e pela proteção ao longo da vida.

Aos meu pais, Demevaldo e Válbia, por todo o incentivo, apoio, amor e dedicação não apenas no quesito estudos, mas sobretudo no meu crescimento pessoal e nas conquistas alcançadas até aqui.

Ao meu irmão, Thauã Mateus, por sempre torcer por mim, estar ao meu lado e saber me distrair.

A todos os membros da família Santos e família Lima, por serem meu porto seguro, acompanharem todos os meus passos e me preencherem com tanto amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leucio Duarte, pelos ensinamentos na vida acadêmica, pela paciência, dedicação, confiança e por ser um exemplo de profissional para mim.

Aos integrantes do LFPR e LFFR, e aos que já passaram por eles, pelo compartilhamento de conhecimentos que proporcionam, pela descontração, e pela amizade além das fronteiras do ambiente acadêmico. Em especial, agradeço a Juliane e Regina, que me acompanham-no laboratório desde o começo da iniciação científica. À Wilka, que compartilhou um de seus projetos de vida comigo. À Fernanda e Marry, por terem sido as melhores companheiras no período do mestrado, desde a seleção até as viagens que ele nos proporcionou.

Ao Laboratório de Físico-Química Biológica da UFRJ, na pessoa do Prof. Dr. Adalberto Vieyra, Humberto Muzi-Filho e todos os integrantes, pelo acolhimento e disponibilidade.

Agradeço pela amizade. Aos que cresceram comigo e permanecem, o grupinho de Vitória, em especial a Gabi que está comigo nessa jornada desde o vestibular. Às minhas Biomédicas, Larissa, Thaysa, Adriana e Jade, presentes da universidade para a vida; Leandro e Caio, agregados da turma que tanto me fazem bem. Em especial agradeço a Adriana Neuman, minha irmã de alma, pelo companheirismo em todos os aspectos.

Aos órgãos de fomento, FACEPE e CNPQ, pelo suporte financeiro.

À Professora Dayane e seus alunos pela disponibilidade e pelo espaço oferecido.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade de contribuir neste trabalho.

*Em tudo dai graças, porque esta é a
vontade de Deus para convosco.
(1Tes 5:18)*

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é um fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão, que pode apresentar como fatores fisiopatológicos subjacentes: elevação do estresse oxidativo, alterações na reabsorção de sódio tubular e ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) intrarrenal. Nesse estudo, investigamos, em ratos, se a LRA induzida por isquemia-reperfusão (IR), induz tardiamente alterações do transporte de sódio proximal dependente de ATP e no conteúdo proteico de componentes do SRA, bem como investigamos o papel da NADPH oxidase nesse processo. Ratos com 120 dias foram submetidos à indução da LRA através de IR bilateral (n=24). Após a IR, os animais foram acompanhados por um período de 30 dias, grupo IR (n=8). Parte dos animais (n=8) recebeu durante esse período tratamento diário com o inibidor da NADPH oxidase apocinina (100 mg/kg), formando o grupo IR + Apocinina Crônica (AC), enquanto que outra parte dos animais (n=8) recebeu apocinina 24 horas antes e depois da IR, formando o grupo IR + Apocinina Agudo (AA). Outro grupo foi submetido apenas a mimetização da cirurgia (Sham, n=8). Após 24 horas de indução da isquemia renal, foi observada elevação dos níveis séricos de creatinina e ureia, enquanto que no grupo tratado com apocinina essa alteração não foi evidenciada. Após 30 dias da isquemia renal, o grupo IR também apresentou elevação da pressão arterial sistólica, bem como aumento da peroxidação lipídica, da atividade da NADPH oxidase, da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e do conteúdo proteico do receptor AT1 da angiotensina II no córtex renal. Por outro lado, foi observado diminuição da atividade da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ e do conteúdo proteico das isoformas 1 e 2 da enzima conversora de angiotensina, do receptor AT2 da angiotensina II, e das isoformas α e ε da proteína cinase C. A maioria dessas alterações foram prevenidas pela inibição da NADPH oxidase por administração de apocinina. Dessa forma, concluímos que a LRA induzida por IR pode induzir alterações na reabsorção do sódio e expressão de componentes do sistema renina-angiotensina, que são compatíveis com a retenção renal de sódio e hipertensão. Esses dados ainda nos indicam que a ativação da NADPH oxidase representa um fator-chave na origem dessas alterações.

Palavras-chave: Isquemia-reperfusão. Hipertensão. Lesão renal aguda. Sistema-renina angiotensina. Transporte de sódio.

ABSTRACT

Acute renal injury (AKI) is a risk factor for the development of hypertension, which involves oxidative stress, changes in sodium tubular and activation of the intrarenal renin-angiotensin system (RAS), as underlying mechanisms. In this study, we investigated in rats whether ischemia-reperfusion (IR)-induced AKI induces changes in proximal tubule ATP-dependent sodium transport and in the intrarenal expression of RAS components, as well as the role of NADPH oxidase in this process. Rats weighing 300-350 g were submitted to AKI by bilateral IR (n=24). After IR injury, the animals were followed for a period of 4 weeks, group IR (n=8). One part (N = 8) received daily treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocynin (100 mg/kg, drinking water), forming the group IR + apocynin chronic (AC), while another part of the animals (n = 8) received apocynin 24 hours before and after IR, forming the group IR + acute apocynin (AA). Another group was submitted to sham surgery (Sham, n = 8). After 24 hours of induction of renal ischemia, it was observed elevation of serum creatinine and urea levels, whereas in the apocynin group this alteration was not evidenced. After 30 days of renal ischemia, the IR group also showed elevated systolic blood pressure, as well as increased lipid peroxidation, NADPH oxidase activity and upregulation of angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) in the renal cortex. On the other hand, there was a decrease in Na⁺-ATPase activity and downregulation of isoforms 1 and 2 of the angiotensin converting enzyme, type 2 angiotensin II receptor (AT₂R), and of the α and ε isoforms of protein kinase C. Most of these alterations were prevented by the inhibition of NADPH oxidase by administration of apocynin. Thus, we conclude that AKI-induced by IR may induce changes in sodium reabsorption and in the expression of RAS that are compatible with renal sodium retention and hypertension. These data still indicate that the activation of NADPH oxidase represents a key factor in the origin of these alterations.

Keywords: Ischemia-reperfusion. Hypertension. Acute kidney injury. Renin-angiotensin system. NADPH oxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio após períodos de isquemia-reperfusão.....	20
Figura 2 –	Principais mecanismos de transporte de sódio no túbulo proximal.....	21
Figura 3 –	Representação do esquema de Post-Albers do mecanismo de diferentes conformações da (Na ⁺ +K ⁺)ATPase.....	23
Figura 4 –	Representação esquemática dos eixos do Sistema Renina-Angiotensina	26
Figura 5 –	Estrutura e Ativação da NADPH oxidase.....	30
Figura 6 –	Representação das isoformas da NADPH oxidase.....	30
Figura 7 –	Representação esquemática da ativação da NADPH oxidase e o mecanismo de ação da apocinina.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ADQI	do inglês, <i>Acute Dialysis Quality Initiative Group</i>
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang (1-7)	Angiotensina (1-7)
Ang (1-9)	Angiotensina (1-9)
ATP	Adenosina trifosfato
AT ₁ R	Receptor do tipo 1 da angiotensina II
AT ₂ R	Receptor do tipo 2 da angiotensina II
DRC	Doença renal crônica
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA1	Isoforma 1 da enzima conversora de angiotensina
ECA2	Isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina, do inglês <i>flavin and adenine dinucleotide</i>
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GSH	Glutationa reduzida
IRA	Insuficiência renal aguda
IR	Isquemia-reperfusão
ISN	Sociedade Internacional de Nefrologia, do inglês <i>International Society of Nephrology</i>

LRA	Lesão renal aguda
MasR	Receptor Mas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NHE3	Isoforma 3 do trocador Na^+/H^+
NOX	NADPH oxidase
$(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$	Bomba de Na^+ e K^+
$\text{Na}^+ - \text{ATPase}$	Bomba de Na^+
NO	Oxido nítrico
NTA	Necrose tubular aguda
OUU	Obstrução ureteral unilateral
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína cinase C, do inglês <i>protein kinase C</i>
PKA	Proteína cinase A, do inglês <i>protein kinase A</i>
PLC β	Fosfolipase C isoforma β , do inglês <i>Phospholipase C isotype β</i>
ROS	Espécies reativas do oxigênio, do inglês: <i>Reactive oxygen species</i>
SHR	Ratos espontaneamente hipertensivos, do inglês <i>spontaneously hypertensive rats</i>
SRA	Sistema renina-angiotensina
TFG	Taxa de filtração glomerular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 DOENÇA RENAL	16
2.2 LESÃO RENAL AGUDA (LRA).....	16
2.2.1 Lesão renal por isquemia-reperfusão	18
2.3 HIPERTENSÃO	20
2.4 TRANSPORTE DE SÓDIO DO TÚBULO PROXIMAL – (Na ⁺ +K ⁺)ATPASE E Na ⁺ -ATPASE	21
2.4.1 Transporte proximal de sódio e hipertensão.....	23
2.5 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	24
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
2.7 NADPH OXIDASE.....	28
2.8 APOCININA	31
3 JUSTIFICATIVA	33
4 OBJETIVOS	34
4.1. Geral	34
4.2. Específicos.....	34
5 RESULTADOS	35
5.1 ARTIGO 1 – Renal ischemia-reperfusion injury leads to hypertension and later changes in proximal tubule Na ⁺ transport and renin-angiotensin system: role of NADPH oxidase.....	35
6 CONCLUSÕES.....	63
7 REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma doença crônica grave, atualmente responsável pelos maiores índices de mortalidade mundial, e está associada com complicações fatais em diversos sistemas do organismo (CHOBANIAN, 2011; DOMBROWSKI et al, 2018). É clara a relação existente entre a pressão arterial e a função renal uma vez que a hipertensão é a comorbidade mais comum entre pacientes com doença renal crônica (DRC) (MATOVINOVIĆ, 2009; HANRAHIAN et al, 2016). A doença renal pode se estabelecer rapidamente através de diversas situações, dentre elas, a instabilidade hemodinâmica. A lesão renal aguda (LRA) ocorre em cerca de 16% de pacientes hospitalizados e apresenta alta taxa de mortalidade em todo o mundo (SAWHNEY; FRASER, 2017), e quando não tratada adequadamente pode predispor a um quadro de desenvolvimento de LRA. Uma das causas mais comuns de LRA, induzida por alterações hemodinâmicas renais, é o processo de isquemia-reperfusão, cuja ocorrência é comum no procedimento de transplante renal (IMIG E RYAN, 2013).

A LRA induzida por isquemia-reperfusão causa, entre outras alterações, dilatação do lúmen tubular, achatamento epitelial (CARDINAL et al, 2018), e está relacionada a alterações no transporte do Na^+ em diversos segmentos tubulares do néfron (CHATTERJEE, 2007). Aproximadamente 65% da reabsorção de sódio ocorre no túbulo proximal e esse transporte está diretamente ligado com a manutenção do volume plasmático e regulação dos níveis pressóricos (AIRES, 2008), bem como seu aumento pode levar ao surgimento de hipertensão arterial (ROOS et al., 1984; BURNIER et al., 1994). O transporte de sódio no túbulo proximal ocorre por transporte dependente de energia, proveniente principalmente da ação de dois transportadores ativos localizados na membrana basolateral das células do túbulo proximal, a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e a $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ (MCDONOUGH et al, 2003).

O transporte tubular proximal de sódio sofre importantes regulações de agentes físicos, hormonais e pelo sistema nervoso, podendo ser inibitórias ou estimulatórias. A ativação do sistema renina-angiotensina tem sido associada ao aumento desse transporte, sobretudo através de vias dependentes de angiotensina II (WANG et al, 2009). A angiotensina II é considerada um potente hormônio retentor de sódio no organismo, além de estar envolvida em situações adversas. Estudos demonstram que a angiotensina II, via seu receptor AT_1 (AT_1R), está envolvida na elevação dos níveis pressóricos através do aumento da atividade das ATPases

transportadoras de sódio do túbulo proximal (ALKHUNAIZI et al., 1996; RANGEL et al., 2005; QUEIROZ-MADEIRA et al., 2010).

O estresse oxidativo também apresenta uma relevante importância na fisiopatologia da LRA induzida por isquemia-reperfusão. Estudos tem demonstrado que o comprometimento no aporte de oxigênio leva a um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e que tratamento antioxidantes previnem o dano renal (LIU et al., 2016). Os túbulos proximais renais são especialmente sensíveis a ação de ROS, em parte, através de seu impacto no transporte de Na^+ dependente de ATP (VIEIRA-FILHO et al., 2014).

A enzima NADPH oxidase é uma importante fonte de produção de ROS no tecido renal. O aumento de sua expressão/atividade é relatada em modelos de hipertensão e alterações da função renal (VIEIRA-FILHO et al., 2014 DOROTEA et al, 2018). A atividade dessa enzima pró-oxidante pode ser estimulada pela Ang II e promover ativação de vias envolvidas com crescimento e migração celular, apoptose e inflamação (JIANG et al, 2011). Podemos encontrar diversos estudos que demonstram que sua inibição apresenta efeitos importantes na proteção de lesões mediadas por mecanismos oxidativos (LI et al., 2013), tornando-a assim um possível alvo-terapêutico.

Nesse contexto, é possível que a LRA, através de vias oxidativas, leve ao surgimento de alterações no transporte tubular de sódio e no SRA, que, tardiamente, contribuam para a elevação dos níveis pressóricos, mesmo que não sejam observadas alterações em marcadores clínicos da função renal. Dessa forma, avaliamos se a lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão promove alterações tardias no transporte de sódio do túbulo proximal dependente de ATP e no sistema renina-angiotensina renal, que podem tornar o indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento de hipertensão. Além disso, investigamos se essas alterações envolvem o aumento do estresse oxidativo via NADPH oxidase.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DOENÇA RENAL

Os rins são órgãos que tem como função a manutenção e regulação do volume extracelular e sua composição, além de apresentar também funções endócrinas (produção de eritropoietina, renina e ativação da vitamina D). Esses eventos são interligados com grande complexidade e alterações na função renal podem levar a um comprometimento multissistêmico. De modo geral, a maioria das funções homeostáticas desempenhadas pelo rim é exercida pelo néfron, através do balanço hidroeletrolítico e excreção de resíduos pelos processos de filtração glomerular e reabsorção e secreção tubular (AIRES, 2008).

A doença renal é reconhecida como um problema global de saúde pública por gerar altos custos de assistência médica e baixa qualidade de vida (DUSSE et al, 2016). A doença renal é tipicamente classificada em aguda e crônica, sendo comum em adultos e associadas a aumento do risco de insuficiência renal. Segundo a Sociedade Internacional de Nefrologia (*International Society of Nephrology* -ISN), a lesão renal aguda afeta 10% a 20% dos adultos hospitalizados e a doença renal crônica (DRC) é encontrada em mais de 10% de adultos não hospitalizados (LEVEY et al, 2017; BELLO et al, 2017). De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, a prevalência de DRC no Brasil é de 595 pessoas por milhão e o número de transplantes renais vem aumentando, em média, 10% a cada ano (CRUZ, 2017).

A LRA é geralmente ocasionada por infecções bacterianas e instabilidade hemodinâmica (por exemplo, injúria por isquemia-reperfusão) enquanto a DRC é resultado principalmente de complicações na diabetes, hipertensão ou doenças autoimunes (IMIG; RYAN, 2013). A LRA possui difícil manejo terapêutico devido a sua especificidade de acordo com a causa subjacente (VALLON, 2016). Cerca de 40% dos pacientes que se recuperam da LRA apresentam disfunção renal persistente e muitos desenvolvem DRC (MEHTA et al, 2015), e ambas, LRA e DRC podem evoluir para doença renal de estágio terminal (LAFRANCE; MILLER, 2010).

2.2 LESÃO RENAL AGUDA (LRA)

Clinicamente, lesão renal aguda é descrita como um grupo heterogêneo de condições caracterizadas por uma queda repentina (horas ou dias) na taxa de filtração glomerular (TFG) seguida por um aumento na concentração sérica de creatinina ou oligúria (LEVEY et al, 2017) levando ao acúmulo de resíduos nitrogenados e desequilíbrio eletrolítico (MAKRIS; SPANOU, 2016; SINGH et al., 2012). É importante destacar que a LRA representa uma situação clínica diferente da insuficiência renal aguda (IRA), na qual se caracterizam indivíduos com LRA que necessitam de terapia de reposição da função renal (SINGH et al., 2012). Dessa forma, a lesão renal aguda pode ser classificada em graus mais sutis e apresentar diagnóstico clínico mais retardado devido à ausência de sinais do prejuízo da função renal.

O *Acute Dialysis Quality Initiative Group* (ADQI) propôs o critério RIFLE, que tem o objetivo de determinar o diagnóstico e estadiamento da LRA de acordo com as seguintes alterações: elevação dos níveis séricos de creatinina maior do que 0,3 mg/dL (ou 26,5 μ mol/L) em período de 48 horas, ou aumento de creatinina sérica maior do que $\geq 1,5$ vezes em relação ao nível basal, nos últimos 7 dias, ou ainda por uma diurese menor do que 0,5 mL/kg/hora em um período maior do que 6 horas (LIU et al., 2016; KOZA, 2016; ADIYANTI; LOHO, 2012).

A LRA é um problema mais grave nos países em desenvolvimento devido aos fatores de risco relacionados ao subdesenvolvimento e à falta de acesso aos cuidados para diagnóstico e tratamento, levando à complicações e risco de vida contribuindo para a alta taxa de mortalidade. Estima-se que mais de 2,3 milhões de pessoas em todo o mundo morram anualmente (MEHTA et al, 2017). Além disso, nos países em desenvolvimento os pacientes com LRA são tipicamente mais jovens e saudáveis do que os pacientes com LRA de países desenvolvidos, que geralmente são mais velhos e têm múltiplas comorbidades (PONCE; BALBI, 2016).

Classicamente, a lesão renal aguda é dividida em pré-renal, renal (ou intrínseca) e pós-renal (SINGH et al., 2012). A pré-renal é consequência de redução da TFG por diminuição do fluxo sanguíneo renal (por exemplo, isquemia-reperfusão, diminuição da pressão arterial, perda de sangue ou fluido, insuficiência cardíaca e cirrose hepática) (ZHOU et al., 2016). Quando a causa é intrínseca ao rim, envolvendo dano diretamente no néfron denomina-se LRA renal (ou intrínseca), sendo a principal causa a necrose tubular aguda (NTA) que resulta de lesão isquêmica ou nefrotóxica advinda, por exemplo, do uso excessivo de antibióticos ou processo séptico. Por fim, a LRA pós-renal se dá pela obstrução do sistema de coleta urinária, com aumento da pressão dentro dos sistemas coletores renais, resultando em redução da taxa de filtração glomerular e insuficiência renal (SINGH et al., 2012). Algumas dessas condições podem coexistir no mesmo paciente (MEHTA et al, 2007)

Dentre inúmeros fatores presentes em alterações agudas da função renal, a maior parte deles ocorrem, sobretudo por indução de situações de instabilidade hemodinâmica, como observado em intervenções cirúrgicas de reparação, transplante renal, administração de contraste, parada cardíaca, choque volêmico (KOZA, 2016). Essas alterações podem induzir importantes danos no tecido renal através da indução de isquemia, sendo esses danos intensificados com o retorno do aporte sanguíneo.

2.2.1 Lesão renal por isquemia-reperfusão

A isquemia-reperfusão renal (IR) é considerada um importante processo de LRA (LIU et al., 2016) e se dá pela interrupção temporária do fluxo sanguíneo e secundariamente, sua restauração. A IR é um processo fisiopatológico comum em um grande número de circunstâncias clínicas que afetam milhões dos pacientes, tanto de maneira inesperada (por exemplo, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, hemorragia), como em cirurgias eletivas (por exemplo, transplantes, cirurgia vascular ou cirurgia em que um torniquete é utilizado) (HALLADIN, 2015).

No tecido renal, a IR está associada a danos tubulares e endoteliais, especialmente nos capilares peritubulares. Além disso, os episódios de rejeição aguda ocorrem em 15 a 20% dos receptores de transplante renal e podem envolver a micro e macrovasculatura do enxerto, levando à lesão endotelial (CARDINAL et al, 2018). Essas alterações podem levar a prejuízo do fluxo e função renal, além de favorecer agudamente ou a longo prazo o estabelecimento da DRC.

O fluxo sanguíneo renal prejudicado leva a diminuição de fornecimento de oxigênio e glicose suficientes para manter a maquinaria necessária à síntese eficiente de adenosina trifosfato (ATP). Com isso, a integridade das mitocôndrias celulares também é alterada, as quais não poderão ser sustentadas sob essas condições, desencadeando uma cascata de eventos que leva a morte celular. Esse processo é observado predominantemente nos túbulos proximais do rim, onde a respiração mitocondrial é sua única fonte de energia (SAIKUMAR; VENKATACHALAM, 2003). O declínio na concentração de ATP pode levar a alterações de mecanismos que dependem da sua energia, como por exemplo, o funcionamento da $(Na^+ + K^+)ATPase$ localizada na superfície basolateral das células do túbulo proximal, permitindo o acúmulo intracelular de íons Na^+ seguido por um influxo de água levando a edema celular, ruptura e eventual morte celular (CHATTERJEE, 2007).

A fase isquêmica, em virtude da diminuição do aporte de nutrientes, sobretudo glicose, estimula o metabolismo anaeróbio e leva a produção de lactato, com consequente acidose intracelular e estimulação do trocador Na^+/H^+ (ADIYANTI; LOHO, 2012). Além disso, o ambiente isquêmico diminui a atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase e superóxido dismutase, e aumenta a atividade de enzimas pró-oxidantes. Nessa fase ainda podemos observar achatamento epitelial, dilatação do lúmen tubular e formação de agregados de descamações celulares (ADIYANTI; LOHO, 2012).

Apesar da fase isquêmica induzir morte celular proveniente da redução do aporte de nutrientes e síntese de ATP, esses danos são ainda mais intensificados com o retorno do fluxo sanguíneo. A reperfusão promove o surgimento de alterações com padrão diferente da isquemia, mas que potencializa a necrose e apoptose tubular, sobretudo por estimulação de fatores inflamatórios (YAP; LEE, 2012) e liberação de espécies reativas do oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (Figura 1). Esse processo resulta no sequestro de diferentes células imunitárias, mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas, entre outros, para a região isquêmica, o que por sua vez facilita a indução de condições inflamatórias nestes tecidos (MINHAS et al., 2016).

A lesão isquêmica é um evento local, entretanto, a formação de ROS e neutrófilos ativados, após a revascularização, pode atingir outros órgãos através da circulação sanguínea, podendo levar a danos sistêmicos (HALLADIN, 2015). A rápida normalização do pH, devido a volta do aporte sanguíneo, aumenta a citotoxicidade na célula. Essa rápida normalização do pH, estresse oxidativo e aumento de Ca^{2+} induz alterações nas mitocôndrias, levando ao seu rompimento. Nesse processo, ocorre o extravasamento da citocromo c, um importante ativador de vias pró-apoptóticas no citoplasma (HALLADIN, 2015).

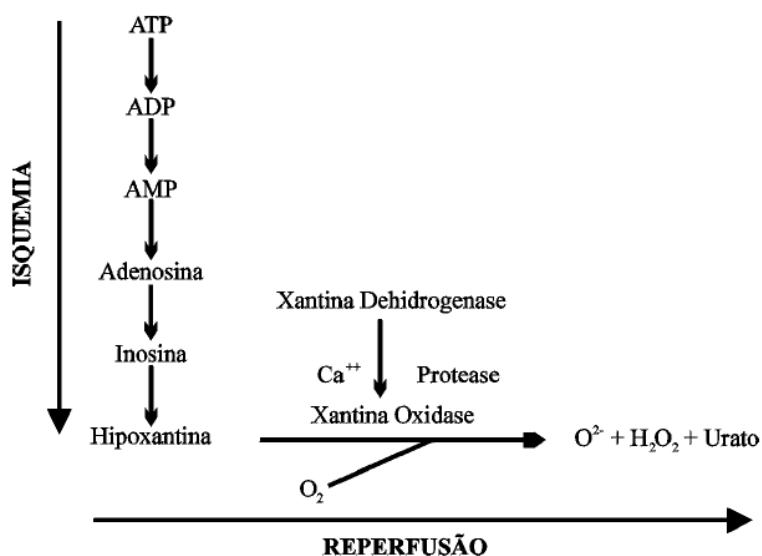


Figura 1. Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio após períodos de isquemia-reperfusão (CASTRO E SILVA JR. et al, 2003).

2.3 HIPERTENSÃO

A hipertensão é uma das principais doenças crônicas da atualidade e afeta aproximadamente 1,13 bilhão de pessoas em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A elevação da pressão arterial está claramente relacionada à diminuição da expectativa de vida e danos a um ou mais órgãos-alvo, sendo importante fator de risco para doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e insuficiência renal. Apesar de um atual aumento na conscientização pela prevenção da hipertensão, estima-se que em 2030 mais de 27 milhões de pessoas serão hipertensas (HANRAHIAN et al, 2016; DOMBROWSKI et al, 2018).

A hipertensão arterial é uma condição clínica complexa e multifatorial que envolve aspectos genéticos, fisiológicos e ambientais, mas que geralmente está associada a distúrbios metabólicos e alteração na morfologia/função de órgãos-alvo (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016). É clinicamente caracterizada por elevação sustentada da pressão arterial sistólica em níveis maiores ou iguais a 140 mmHg e/ou da pressão arterial diastólica 90 mmHg (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

Já é bem conhecida a relação entre a hipertensão e a função renal, tanto em processos fisiológicos quanto em processos patológicos (QIAN, 2018). A DRC e a hipertensão possuem uma ligação peculiar, de maneira que uma pode ser causa ou consequência da outra, tornando

difícil determinar quem precede quem. A hipertensão é a comorbidade mais comum em pacientes com DRC, cerca de 80% apresentam hipertensão e sua prevalência aumenta à medida em que diminui a função renal (SANTOS et al, 2012, HANRAHIAN et al, 2016). Múltiplos mecanismos renais atuam na regulação da pressão arterial e podem estar diferentemente alterados nos indivíduos hipertensos (BANKIR et al, 2010). A reabsorção tubular do sódio alterada representa um mecanismo base para o aumento dos níveis pressóricos arteriais. Burnier e colaboradores (1994) mostraram que a reabsorção de sódio no túbulo proximal é maior em indivíduos hipertensos não tratados.

2.4 TRANSPORTE DE SÓDIO DO TÚBULO PROXIMAL – $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ E $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$

O túbulo proximal tem papel significativo no balanço corpóreo de Na^+ , em virtude de ser o segmento responsável pela maior proporção de transporte do íon, seja de forma ligada a outros íons (por exemplo, Cl^- , HCO_3^-) ou por co-transporte com solutos orgânicos (glicose, aminoácidos). Esse fluxo de transporte é dado através de transportadores específicos, localizados na membrana apical da células do túbulo proximal (Figura 2).

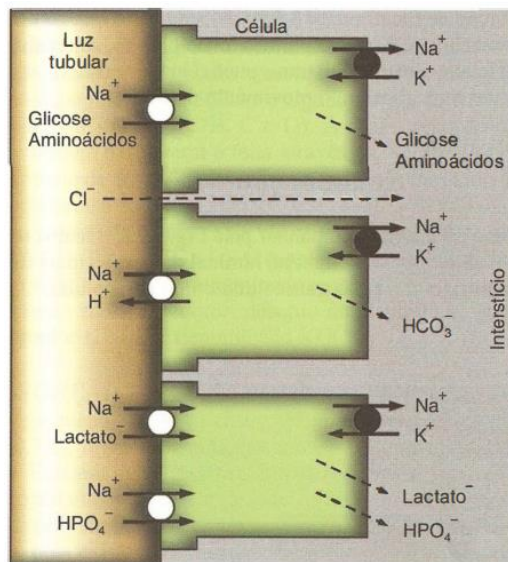


Figura 2. Principais mecanismos de transporte de sódio no túbulo proximal. (Fisiologia - Margarida Aires, 3ª edição, 2008)

A energia utilizada para o transporte do sódio na membrana luminal, é proveniente da bomba de Na^+ e K^+ , a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, presente na membrana basolateral das células do túbulo proximal. Utilizando uma molécula de ATP, a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ transporta três Na^+ para o ambiente extracelular e dois K^+ para o ambiente intracelular, contra seus respectivos gradientes de concentração. Esse transporte ativo fornece um gradiente de difusão para outros

transportadores que mantêm a homeostase tubular (APERIA et al, 2016). A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ é parte da família de ATPases do tipo P, juntamente com a $\text{H}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ e a $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$, que possuem como principal semelhança um resíduo aspartil em seu sítio catalítico, além de apresentarem dois estados conformacionais distintos durante o ciclo catalítico (APERIA et al, 2016).

A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ é um complexo proteico-enzimático transmembrana ubíquo estruturalmente formado por duas subunidades, α e β , que, entretanto, podem apresentar pequenas proteínas acessórias da família FXYD. A subunidade α é formada por cerca de 1000 aminoácidos e tem peso molecular de aproximadamente 110 kDa. Nesta subunidade estão presentes o sítio de ligação ao ATP, o sítio de ligação aos cátions, o sítio de fosforilação, além de apresentar também o sítio de ligação aos seus inibidores (glicosídeos cardiotônicos, a exemplo da ouabaína), sendo, portanto, a unidade funcional catalítica dessa enzima. São conhecidas quatro isoformas dessa subunidade ($\alpha 1 - \alpha 4$), que possuem diferentes níveis de expressão a depender do tipo celular em que são encontradas. A subunidade β possui três diferentes isoformas ($\beta 1 - \beta 3$), com cerca de 300 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Ela funciona como uma chaperona e sua associação com a subunidade α facilita a sua inserção na membrana, e é fundamental para a adequada atividade da enzima. (HAUCK, 2012; FERAILLE; DIZIN, 2016).

A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ possui dois estados conformacionais, E1 e E2. Essas transições conformacionais medeiam a interação entre os domínios citoplasmáticos e os sítios transmembranares onde os cátions irão se ligar. Essas conformações transitórias acoplam os processos de ligação, fosforilação e desfosforilação do ATP e consequentemente a extrusão dos íons Na^+ e intrusão dos íons K^+ (JORGENSEN et al, 2003). Esse esquema de diferentes conformações durante o ciclo catalítico foi proposto pelos pesquisadores R. L. Post e R. W. Albers, em 1969, e também se aplica aos outros membros da família de ATPases do tipo P (Figura 3) (CUI; XIE, 2017). Além disso, uma série de estudos mostraram que a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ pode apresentar, além da sua função de transportador ativo de íons, função de sinalização (XIE; CAI, 2003; LI; XIE, 2009; LIU; XIE, 2010). A interação dessa enzima com a ouabaína ativa diferentes vias de sinalização, incluindo várias cascatas de proteínas cinases e aumento da produção de ROS (LIU et al, 2018). Vale salientar que a função sinalizadora da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ é independente de alterações nas concentrações dos íons Na^+ e K^+ .

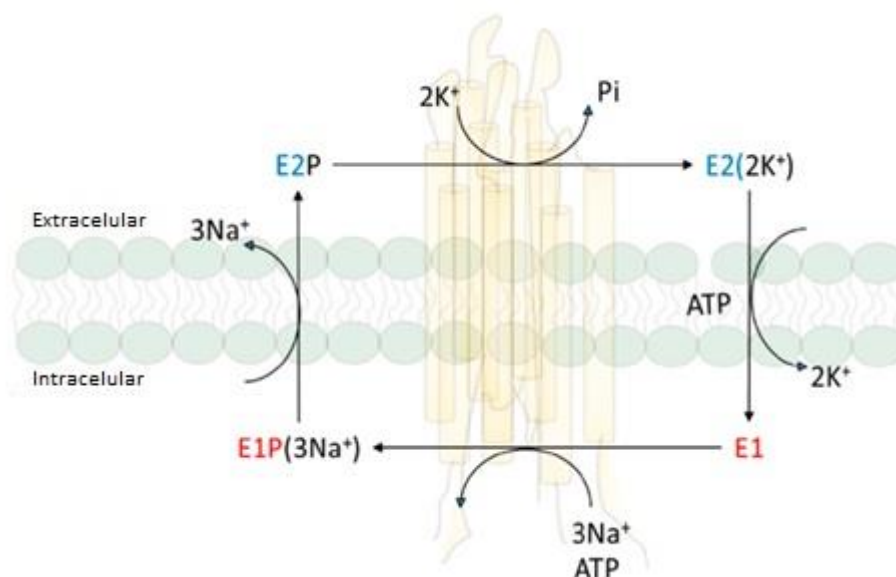


Figura 3. Representação do esquema de Post-Albers do mecanismo de diferentes conformações da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. (modificado de CUI, 2017).

Uma outra ATPase também presente na membrana basolateral das células do túbulo proximal é conhecida pelo seu papel no ajuste fino da regulação da reabsorção do sódio, a Na^+ -ATPase (LARA et al, 2008). Sua atividade é estimulada pela presença apenas do íon Na^+ , não requerendo o íon K^+ , diferentemente da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. Além disso, as duas ATPase apresentam pH ótimo e afinidade ao sódio ligeiramente distintos. A Na^+ -ATPase é um complexo proteico formado por duas subunidades, a subunidade α que tem peso de aproximadamente 90 kDa e a subunidade β com cerca de 50 kDa. Também é parte da família das ATPase do tipo P, como a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, contudo é insensível a ouabaína, porém inibida pela furosemida (ROCAFULL et al, 2012).

2.4.1 Transporte proximal de sódio e hipertensão

Segundo Guyton et al (1974), devemos considerar a regulação da pressão arterial a longo prazo como sendo função de um sistema de equilíbrio de fluidos, tendo a natriurese como um mecanismo que mantém a constância do conteúdo de íon Na^+ no ambiente extracelular. A partir dessa ideia, é sugerido que a hipertensão sensível ao sal está ligada a alterações no transporte de sódio no tecido renal (TITZE et al, 2010). O balanço de sal pode ser em partes regulado pela ingestão, contudo, o modo de vivência da atualidade dificulta cada vez mais esse controle. Consequentemente, a sobrecarga para essa regulação fica por responsabilidade dos rins. Mesmo com ausência evidente da redução na hemodinâmica renal, distúrbios no mecanismo de

transporte tubular podem levar a hipertensão (NAVAR, 2005). Na hipertensão essencial humana poligênica, é visto aumento da reabsorção de sódio no segmento tubular proximal e ramo ascendente espesso da alça de Henle (ORTIZ; GARVIN, 2001; STAESSEN et al, 2008).

Estudos apontam correlação entre os transportadores proximais e a hipertensão. Reduções coordenadas na distribuição de NHE3 (isoforma 3 do trocador Na^+/H^+) ao longo da superfície apical das células proximais, bem como redução na atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ podem ser importantes para uma resposta na hipertensão (ZHANG et al, 1999; MCDONOUGH, 2010). Além disso, foi visto que variação genética de uma proteína do citoesqueleto que regula a atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$, a α -aducina, mostrou-se relacionada com prevalência de hipertensão arterial em diferentes populações. A presença da variante estava ligada a aumento da atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ e aumento na reabsorção de sódio em pacientes hipertensos (IWAMOTO et al, 2006).

Em animais da linhagem SHR (ratos espontaneamente hipertensos, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ não responde a sinalização inibitória dopaminérgica, apesar de haver produção aumentada de dopamina (RACZ et al., 1986; ALBRECHT et al., 1996). Os SHR apresentam aumento na reabsorção de sódio precocemente, quando ainda não apresentam aumento nos níveis pressóricos (CRAJOINAS et al., 2010). Além disso, Rocafull et al (2012) mostrou que essa linhagem de ratos apresenta atividade da $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ aumentada no córtex renal, mas não no intestino delgado, e sugere que a $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ pode ser importante na patogênese da hipertensão essencial.

2.5 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O SRA é conhecido como um sistema hormonal criticamente envolvido na regulação da homeostase e hemodinâmica renal e cardiovascular. Seu principal efetor é a angiotensina II (Ang II), que desencadeia uma ampla gama de efeitos em todos os sistemas, incluindo coração, rins, sistema nervoso e sistema imunológico. Entretanto, sua função primária é a de homeostase circulatória, e sua suprarregulação pode levar ao desenvolvimento de hipertensão, insuficiência cardíaca (SPARKS et al, 2014) e alterações na função renal (YANG, 2017). O SRA é classificados em dois eixos principais: convencional e não convencional.

O eixo convencional consiste na formação de Ang II a partir do angiotensinogênio produzido no fígado. Este é clivado em pH neutro pela enzima renina, uma protease sintetizada no aparelho justaglomerular de cada néfron, sendo essa síntese sensível principalmente a diminuição nas concentrações de Na^+ circulante. A renina converte o angiotensinogênio em

angiotensina I (Ang I) que passa por uma segunda clivagem e é transformada em Ang II por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A Ang II medeia suas funções fisiológicas através de dois receptores dependentes do tecido-alvo que apresentam efeitos contrários, o receptor do tipo 1 de angiotensina II (AT₁R) e o receptor do tipo 2 de angiotensina II (AT₂R). Pela via do AT₁R, a Ang II apresenta efeitos vasoconstritores, pró-inflamatórios, apoptóticos e pró-oxidativos. Por outro lado, agindo via AT₂R, estimula vasodilatação, angiogênese, efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes (ARROJA et al, 2016). A Ang II possui maior afinidade pelo AT₁R, que tem sua via de sinalização clássica mediada pela proteína Gq, levando a liberação de Ca²⁺ e ativação dos sistemas mediados pela PKC (BOOZ et al., 1994), enquanto o AT₂R atua via proteína Gi (KANG et al., 1994; ZHANG; PRATT, 1996).

O eixo não convencional do SRA tem a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) como molécula chave. Essa enzima cliva a Ang I em Ang-(1-9) e a Ang II em Ang-(1-7), peptídeo que, através do receptor Mas (MasR), desencadeia efeitos anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e anti-fibróticos. Dessa forma, o aumento da atividade da ECA2 desloca o eixo de formação de Ang II para o eixo que forma peptídeos com ações contrárias. Além da Ang-(1-7), outros peptídeos podem ser formados pelo eixo não convencional do SRA, como por exemplo Ang III e Ang IV (SHARMA et al, 2019). Na Figura 4 temos uma representação esquemática de ambos os eixos do SRA.

Outro aspecto mais atual relacionado ao SRA envolve a localização de seus componentes. Além do SRA sistêmico, alguns órgãos possuem um SRA próprio com produção local de seus componentes, a exemplo do rim. Alterações na ativação do SRA intrarrenal tem sido relatada como um mecanismo importante para hipertensão e doença renal (YANG; XU, 2017). Ativação intra-renal desse sistema e altos níveis de Ang II via AT₁R são apontados como principais fatores de risco para LRA (KONTOGIANNIS; BURNS, 1998), assim como a LRA foi associada a uma elevação significativa dos níveis de Ang II, porém Ang I ou Ang-(1-7) tecidual não foram alteradas (SHARMA et al, 2019). Além disso, a ativação do SRA pode persistir mesmo após recuperação da função renal na LRA, e essa superativação prolongada pode desencadear DRC por diversos mecanismos (CHOU et al, 2018). Ohashi et al (2019), mostrou que o SRA intrarrenal é ativado no rim transplantado imediatamente após a remoção do mesmo e esses resultados podem ter relação com o aumento do risco de doença renal em transplantados.

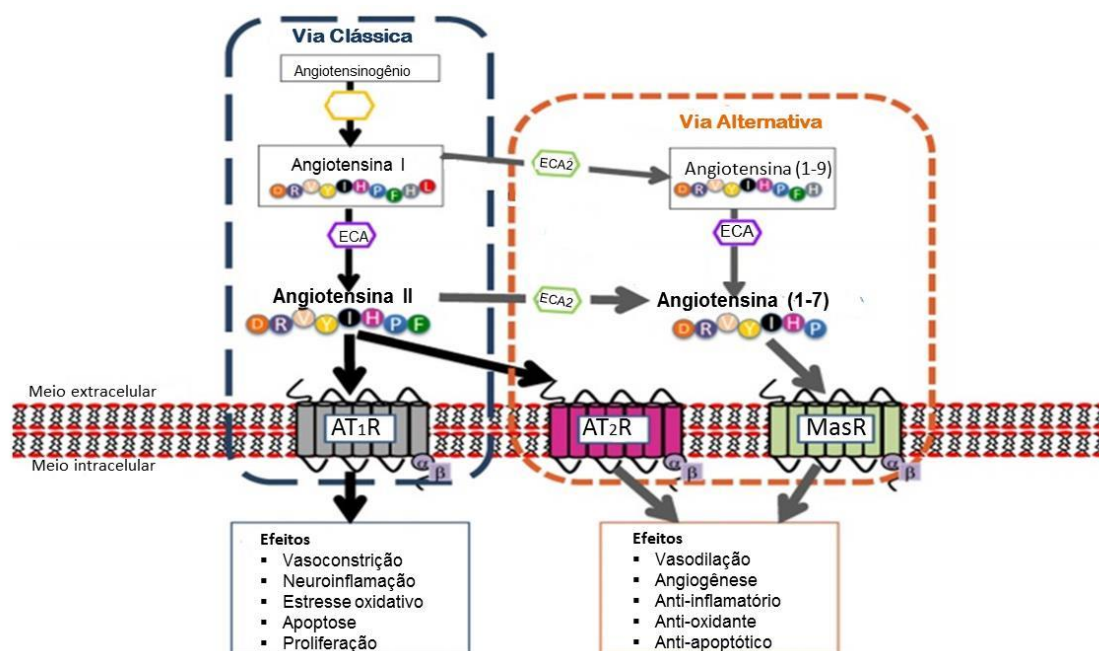


Figura 4. Representação esquemática dos eixos do Sistema Renina-Angiotensina (Modificado de ARROJA MM et al, 2016).

A Ang II possui efeitos diretos e indiretos no transporte renal de sódio em diferentes segmentos tubulares e através de diferentes receptores. É responsável por cerca de 50% da regulação do transporte de sódio proximal, sendo considerada um potente hormônio retentor de sódio do organismo (WANG et al., 2009). É capaz de estimular a atividade do NHE3 entre outros efeitos, via AT₁R, por outro lado, a ativação do AT₂R inibe a reabsorção de sódio por internalização do NHE3 e (Na⁺+K⁺)ATPase (CRAJOINAS et al, 2016; CAREY, 2017).

Ambas as ATPases citadas anteriormente sofrem influências regulatórias positivas ou negativas pela Ang II (WANG et al, 2009), além disso regula o trocador Na⁺/H⁺ da membrana apical e o co-transporte basolateral de NaHCO₃ nas células do túbulo proximal (NAVAR, 2015). Adicionalmente, Ang II estimula a liberação de aldosterona no córtex da glândula adrenal, podendo levar a retenção de sódio e aumento no volume sanguíneo circulante (NANGAKU; FUJITA, 2008).

Segundo Xu et al (2006) a ativação do receptor do tipo 1 de angiotensina II aumenta a atividade de NHE3, além de aumentar sua expressão na membrana apical de células do túbulo proximal. Um estudo de Grande e colaboradores (2011) mostrou que a superexpressão de um gene específico nas células do túbulo proximal induziu hipertensão via estresse oxidativo com ativação do sistema renina-angiotensina. A atividade da Na⁺-ATPase pode ser estimulada pela

Ang II mediada pelo receptor AT_1 via PI-PLC β / PKC (De Souza et al, 2004). Por outro lado, De Souza et al (2007), demonstrou que Ang II pode inibir a Na^+ -ATPase mediada pelo AT_2R via PKA.

O sistema renina-angiotensina intrarrenal parece amplificar as ações da angiotensina II sistêmica no transporte de sódio proximal e pressão arterial. O aumento na síntese de Ang II é um frequente achado em pacientes com doença renal crônica (GONZALEZ-VILLALOBOS et al, 2013).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de espécies reativas do oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) é conhecida como um mecanismo de defesa contra hospedeiros, utilizada pelos neutrófilos para destruir patógenos exógenos, além de apresentarem importante papel como segundo mensageiros em diversas vias de sinalização intracelular. Em condições fisiológicas a produção de ROS permanece em um equilíbrio dinâmico, sua produção é regulada por processos celulares e ação das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase, principais componentes do sistema antioxidante (ZHANG et al, 2016) além da ação não enzimáticas, como ácido ascórbico e tocoferóis. Quando ocorre um desequilíbrio entre os níveis de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, define a ocorrência de estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode resultar em dano celular, lesão tecidual e inflamação por oxidação de proteínas, lipídeos e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; SENA et al, 2018).

A produção de ROS pode ocorrer de maneira endógena a partir da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e no citoplasma por enzimas oxidantes, como a xantina oxidase, ciclooxigenases, lipooxigenase, mieloperoxidases, citocromo p450, óxido nítrico sintase desacoplada, peroxidases e NADPH oxidase, durante reações biológicas normais (LIOU et al., 2010). Por outro lado, fontes exógenas podem induzir sua produção, como radiação ultravioleta, álcool, cigarro e xenobióticos (PALIPOCH, 2013). As principais moléculas de espécies reativas do oxigênio produzidas são o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LOREN; YAZAN, 2012).

No rim, as principais e mais comuns fontes de ROS são a cadeia respiratória mitocondrial e a NADPH oxidase (NOX) (SURESHBABU et al, 2015). O aumento de estresse oxidativo pode acarretar em vasoconstrição, remodelamento vascular, inflamação e fibrose (RODRIGUEZ-PORCEL et al., 2017). Na LRA, além do dano tubular e a inflamação, um componente predominantemente envolvido é o estresse oxidativo, principalmente por lesão por

I/R. Durante a reperfusão, há conversão de hipoxantina em xantina (catalisada pela xantina oxidase formada a partir da xantina desidrogenase), levando a formação de peróxido de hidrogénio e superóxido (DEVARAJAN, 2006).

O túbulo proximal contém um alto número de mitocôndrias e é particularmente bastante susceptível a ação de ROS geradas por hipóxia que podem induzir lesão tubular promovendo morte celular por apoptose ou necrose. Chien et al (2001), demonstraram que o excesso de radicais livres produzidos no epitélio do túbulo proximal pode ser responsável pela apoptose de células renais em ratos sujeitos à isquemia-reperfusão. Além disso, ROS atuam em diversos processos de sinalização intracelular via oxidação de proteínas cinases, incluindo PKA e PKC. Essas proteínas cinases ativadas fosforilam outras proteínas que estão envolvidas em diversas vias para diferentes mecanismos fisiológicos ou patológicos (ZHANG et al, 2016).

A proteína cinase A (PKA, do inglês *protein kinase A*), é também conhecida como proteína cinase A dependente de AMP_c e sua atividade pode ser dada pela ligação de duas moléculas de AMP_c a sua subunidade regulatória. ROS influenciam na fosforilação da PKA, entretanto, a fosforilação da PKA também influencia na homeostase do ROS (ZHANG et al, 2016). A via AMP_c/PKA atua na regulação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e pode determinar a síntese e acúmulo de ROS (PAPA, 2013).

A proteína cinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*) faz parte da família da serina-tirosina cinase e atualmente são conhecidas onze isoformas, divididas em três grupos: convencionais, *novel* e atípicas. As PKCs convencionais (α , β I, β II e γ) são caracterizadas por usarem Ca²⁺, diacilglicerol/éster de forbol e fosfatidilserina para sua ativação, enquanto que as PKCs do grupo *novel* (δ , ϵ , θ e η) são ativadas pelo diacilglicerol / éster de forbol mas não pelo Ca²⁺. Por outro lado, as PKCs atípicas (isoformas ζ e λ) não são ativadas por diacilglicerol e Ca²⁺, entretanto usualmente são ativadas por fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) e PDK1 (DAS, 2016). Os domínios reguladores da PKC são regiões que possuem abundância em cisteínas, que são altamente susceptível a ação de ROS, que podem influenciar de maneira dupla a atividade dessas cinases, ativando-as ou inibindo-as (ZHANG et al, 2016).

2.7 NADPH OXIDASE

Dentre as enzimas envolvidas na síntese de ROS, a NADPH oxidase é uma das principais responsáveis pela alta produção em diversos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos. Essa enzima tem a capacidade de gerar ânions superóxido por meio da

transferência de elétrons através da membrana e se encontra em praticamente todos os tecidos, células fagocíticas e não-fagocíticas (BEDARD et al., 2007).

A NADPH oxidase (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) é um complexo multiproteico, cujo arquétipo é formado por dois elementos ligados a membrana (gp91^{phox} e p22^{phox}), três componentes citosólicos (p67^{phox}, p47^{phox} e p40^{phox}) e uma GTPase de baixo peso molecular (rac1 ou rac2) (BEDARD et al, 2007). Sua ativação depende da translocação dos componentes citosólicos e fosforilação de vários desses componentes e da Rac, para resultar em um complexo totalmente integrado e ativado (Figura 5). O balanço entre a forma inativa (GDP-ligada) e ativa (GTP-ligada) da Rac regula a junção das subunidades membranares e citosólicas da NADPH oxidase (BEDARD et al., 2007).

Até o momento a família NOX é formada por sete isoformas, NOX1-NOX5, DUOX1 e DUOX2. Possuem estruturas semelhantes e seis α hélices transmembranares, a exceção das DUOX que possuem ainda uma sétima α hélice (Figura 6). Cada uma delas apresenta um sítio de ligação para heme, dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) e NADPH (MA et al, 2017). Vale salientar que apesar de semelhanças estruturais a distribuição e regulação dessas isoformas varia de acordo com o tecido (onde diferem em percentual de expressão), requisitos de ativação e co-fatores, taxa de formação de superóxido e funções fisiológicas aparentes (CLARK et al., 2004), além disso possuem atividade regulada por diversos hormônios (incluindo Ang II), citocinas e forças mecânicas, que estimulam uma maior produção de superóxido (CAI et al., 2003). A NOX4, por exemplo, é abundantemente expressa no rim e é uma importante fonte renal de ROS (SEDEEK, 2013).

A Ang II estimula a enzima NADPH oxidase a produzir espécies reativas do oxigênio e isso leva a modificações oxidativas nas subunidades das ATPases do túbulo proximal, podendo regular suas atividades ou até mesmo degradá-las (LIU et al, 2017). A estimulação crônica na produção de ROS pode estimular modificações oxidativas na (Na⁺+K⁺)ATPase, causando alterações na reabsorção de sódio e pressão arterial (LIU, 2017). Em diferentes modelos animais a administração de antioxidantes mostra efeitos benéficos no controle da pressão sanguínea (TOUYZ, 2004). Vieira-Filho e colaboradores (2011) demonstrou que a desnutrição materna induz alterações nos componentes do SRA e na reabsorção de sódio dependente deste sistema, entretanto, o tratamento antioxidante conseguiu prevenir essas alterações, mostrando envolvimento do estresse oxidativo e sistema renina-angiotensina na regulação do transporte de sódio.

A NADPH oxidase (NOX) é uma possível via envolvida na produção de ROS na lesão renal aguda. Newaz e Yousefipour (2014) demonstraram que a isoforma 2 da NADPH oxidase

(NOX2) contribui para o aumento da geração de radicais livres mediado na lesão renal aguda induzida por glicerol. Dorotea et al (2018) mostrou que um pan-inibidor da NOX melhorou lesão tubular e podocitária, função renal, atenuou inflamação, fibrose e estresse oxidativo no rim diabético. Hannken et al. (1998) mostrou que a Ang II medeia a ativação da NADPH oxidase e leva a hipertrofia das células tubulares renais. Dada a importância da NADPH oxidase na produção de ROS, que por sua vez apresenta papel-chave no mecanismo de lesão renal induzido pela IR, a sua inibição pode representar uma importante estratégia terapêutica.

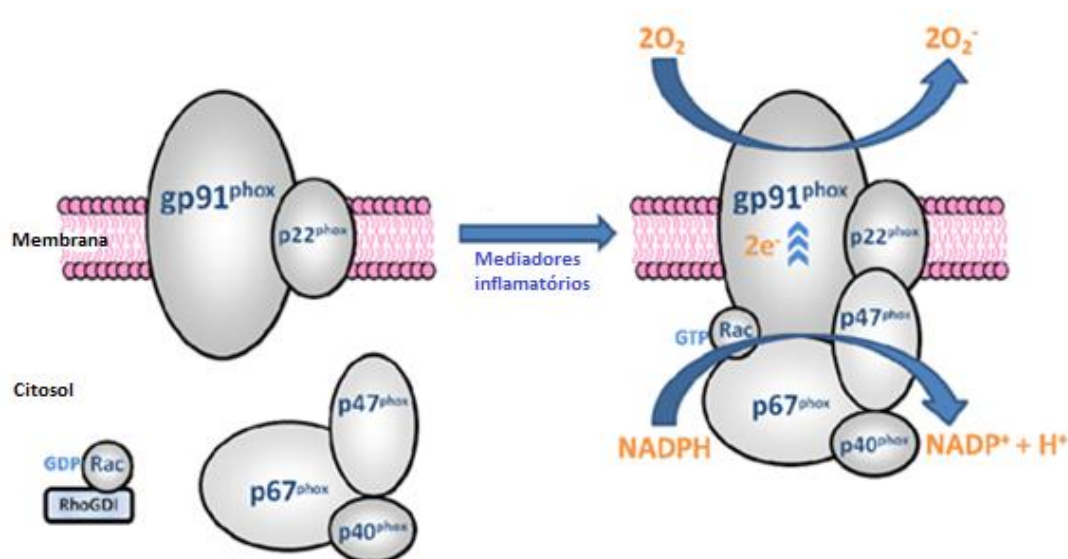


Figura 5. Estrutura e Ativação da NADPH oxidase (Modificado de MCCANN et al., 2013)

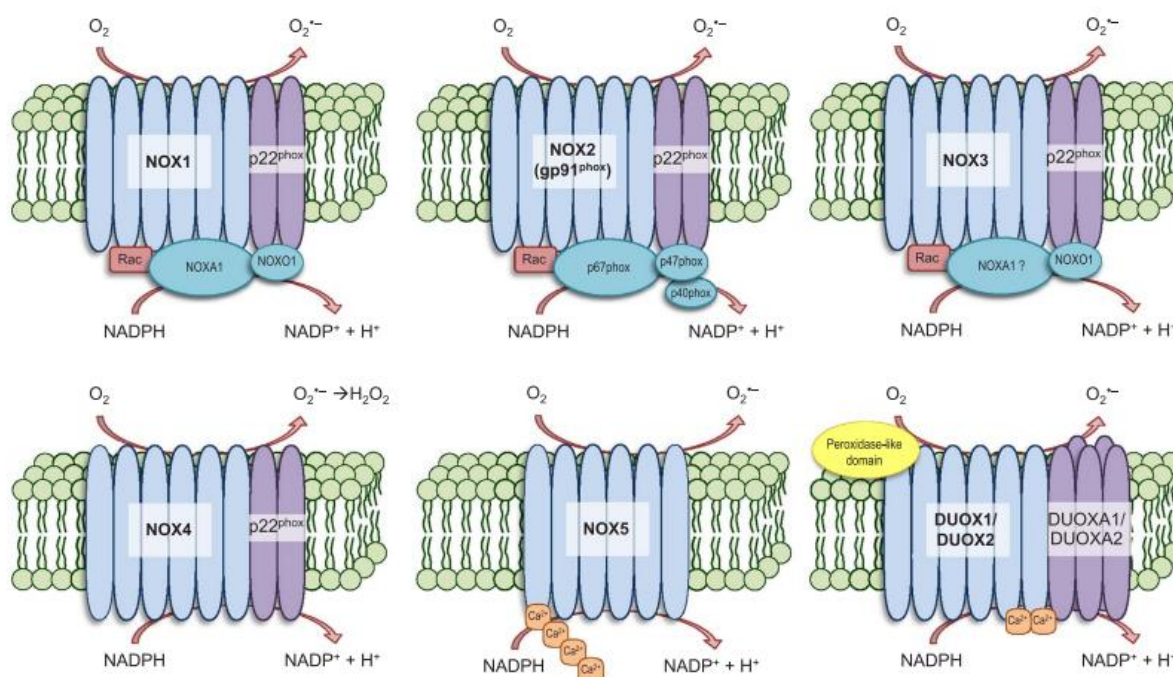


Figura 6. Representação das isoformas da NADPH oxidase. (MA, 2018)

2.8 APOCININA

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona ou acetovanilona), é um catecol metoxi que ocorre naturalmente e foi isolada da planta *Picrorhiza kurroa* e descrita pela primeira vez por Schmiedeberg em 1883 (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). É conhecida experimentalmente por ser um eficiente inibidor da NADPH oxidase em vários modelos envolvendo células fagocíticas ou não fagocíticas *in vivo* e *in vitro* (XIMENES et al., 2007). A apocinina atenua a liberação de superóxido proveniente da NOX por bloquear a migração da p47^{phox} (subunidade citosólica) para a membrana, impedindo a montagem do complexo que é crucial para a ativação da enzima (Figura 7) (TOUYZ, 2008; T'HART et al, 2014; VIRDIS et al, 2016).

Para obter sua capacidade de inibidor da NOX a apocinina precisa ser oxidada, e essa oxidação é garantida na presença de H₂O₂ e mieloperoxidase, levando a produção de um intermediário reativo que se estabiliza com ligação a grupos tiol livres, por exemplo, GSH, ou por dimerização, resultando em diapocinina, composto metabolicamente ativo da apocinina. (T'HART et al, 2014).

Um número considerado de estudos trazem a apocinina como um protetor eficaz para diversas situações adversas, o que a torna uma possível e potencial abordagem terapêutica. Alguns estudos demonstram que o tratamento com apocinina pré-injúria leva a uma inibição agudo da NOX e pode ser benéfico de maneira similar ao knockdown (MA et al, 2018). Em modelo animal de injúria cerebral, Zhang et al (2012) mostraram que o pré-tratamento com apocinina resultou em neuroproteção do córtex, bem como já foi demonstrado que o tratamento com apocinina pode apresentar efeito protetores contra IR renal, reduzindo estresse oxidativo, reação inflamatória (Hoi et al., 2015) e danos histológicos (Hu et al., 2016), protegendo a função renal. Virdis e colaboradores (2016) concluíram que o tratamento com apocinina pode reverter as alterações funcionais e estruturais vasculares na hipertensão experimental, levando a reduzir ou prevenir a elevação da pressão arterial, podendo seu efeito estar associado ao aumento da expressão e atividade do óxido nítrico (NO). Em 2015, Liu e colaboradores mostraram que NOX é a principal contribuinte na produção de ROS no modelo obstrução ureteral unilateral (OUU) e que essa produção é provavelmente responsável pela regulação adicional da expressão da (Na⁺+K⁺)ATPase no túbulo proximal, entretanto, o tratamento com apocinina foi capaz de melhorar esse efeito.

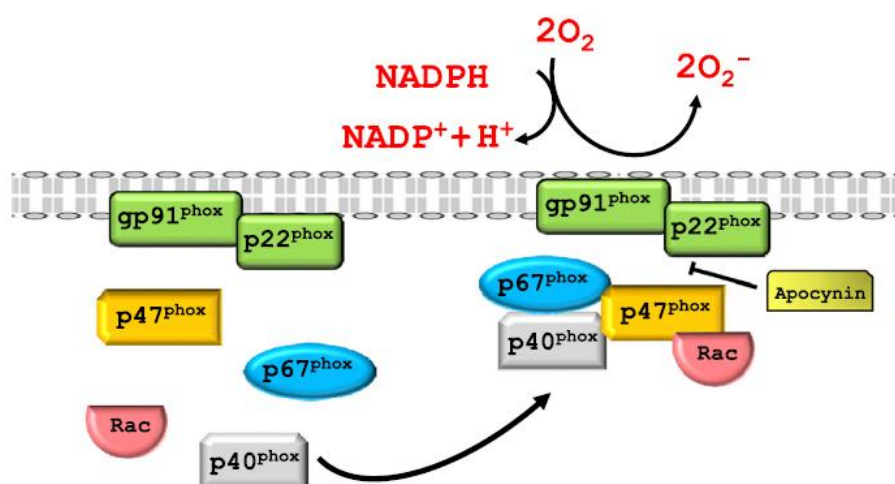


Figura 7. Representação esquemática da ativação da NADPH oxidase e o mecanismo de ação da apocinina (VIRDIS et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

É clara a relevância que a produção de radicais livres do oxigênio pode apresentar na integração de diversos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da doença renal (crônica/aguda), fazendo com que a enzima pró-oxidante NADPH oxidase seja um promissor alvo terapêutico. Contudo, devido as suas participações em diversas respostas fisiológicas no tecido renal e vascular, a inibição inadvertida dessas enzimas também podem comprometer a função renal. Dessa forma, é fundamental investigarmos o papel dessa enzima em mecanismos subjacentes a lesão renal aguda, investigando sua possível participação no desenvolvimento da hipertensão, através da modulação do sistema renina angiotensina e do transporte de sódio proximal.

4 OBJETIVOS

4.1. Geral

Investigar, em ratos, se a lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão, em situações tardias, induz alterações do transporte de sódio proximal dependente de ATP e de sua modulação dependente do sistema renina-angiotensina. Secundariamente, investigar o papel da NADPH oxidase nesse processo.

4.2. Específicos

Avaliar em ratos submetidos a isquemia-reperfusão, sob presença ou ausência de tratamento com apocinina:

- i) Pressão arterial sistólica;
- ii) Peroxidação lipídica renal;
- iii) Produção renal de ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase;
- iv) Atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase sensível à ouabaína em frações de membrana do túbulo proximal;
- v) Atividade da Na^+ -ATPase sensível a furosemida em frações de membrana do túbulo proximal;
- vi) Conteúdo proteico:
 - do receptor AT_1 da angiotensina II;
 - do receptor AT_2 da angiotensina II;
 - da enzima renina e seu precursor pró-renina;
 - de angiotensinogênio;
 - das isoformas 1 e 2 da enzima conversora de angiotensina;
 - das isoformas α , λ e ϵ da proteína cinase C;
 - da proteína cinase A;
 - da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1 – Renal ischemia-reperfusion injury leads to hypertension and later changes in proximal tubule Na⁺ transport and renin-angiotensin system: role of NADPH oxidase

Natália K.S. Lima^a, Wilka R.S. Araújo^a, Angélica G. Oliveira^a, Juliane S. Farias^a, Regina S. Aires^a, Humberto Muzi-Filho^{b,c}, Ana D. O. Paixão^{a,c}, Adalberto Vieyra^{b,c,d,e}, Leucio D. Vieira^{a,c,*}

^a *Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

^b *Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

^c *National Center for Structural Biology and Bioimaging/CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

^d *National Institute of Science and Technology in Regenerative Medicine-REGENERA, Rio de Janeiro, Brazil*

^e *Graduate Program of Translational Biomedicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Brazil*

* Corresponding author: Department of Physiology and Pharmacology, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego Av., s/n, University City, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail address: leucio.vieirafo@ufpe.br

ABSTRACT

Acute renal injury (AKI) is a risk factor for the development of hypertension, which involves oxidative stress, changes in Na^+ tubular and activation of the intrarenal renin-angiotensin system (RAS) as underlying mechanisms. In this study, we investigated in rats whether ischemia-reperfusion (IR)-induced AKI induces changes in proximal tubule ATP-dependent Na^+ transport and in the intrarenal content of RAS components, as well as the role of NADPH oxidase in this process. Rats weighing 300–350 g were submitted to AKI by bilateral IR (n=25). After IR injury, the animals were followed for a period of 4 weeks. One part (n=7) received daily treatment with apocynin, a NADPH oxidase inhibitor (100 mg/kg, drinking water), while another part of the animals (n=9) received apocynin 24 hours before and after IR. Another group was submitted to sham surgery (n=8). After 30 days of renal ischemia, the rats submitted to IR showed elevated systolic blood pressure, as well as increased lipid peroxidation, NADPH oxidase activity, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity, and upregulation of type 1 angiotensin II receptor (AT_1R) in the renal cortex. On the other hand, there was a decrease in Na^+ -ATPase activity and downregulation of the isoforms 1 and 2 of the angiotensin converting enzyme (ACE1 and ACE2), type 2 angiotensin II receptor (AT_2R), and of the α and ϵ isoforms of protein kinase C. Most of these alterations were prevented by the NADPH oxidase inhibition by both apocynin treatment protocols. Thus, we conclude that AKI-induced by IR may induce changes in proximal tubule ATPases and RAS components that are compatible with renal Na^+ retention and hypertension. These data still indicate that the activation of NADPH oxidase represents a key factor in the origin of these alterations.

Keywords:

Acute kidney injury

Hypertension

Ischemia-reperfusion

NADPH oxidase

Renin-angiotensin system.

1. Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a common clinical issue associated to a sudden, rapid and reversible renal function decrease, which leads to diminution of nitrogen metabolic waste and loss of body fluids and electrolytes homeostasis [1]. AKI is associated to elevated hospital mortality rate, which can reach 50% in the most severe injuries [2], however, mild forms account for the most common cases [3]. Recently, increasing number of evidences indicates that AKI has been neglected as a potentially preventable risk factor for chronic kidney disease (CKD) [4–6] and cardiovascular diseases (CVD) [7–9]. However, even in the presence of renal function indices recovery, AKI patients are more likely to develop CKD and CVD. Therefore, global burden of AKI may be much more impacting than expected, as survivors of AKI are prone to develop hypertension [10], which is currently responsible for the highest mortality rates in the world and have its morbidity associated to clinical issues in several organic systems [11,12].

The leading cause of AKI is the ischemia-reperfusion (IR) injury, which is present in several clinical issues related to renal hemodynamic instability [13]. IR-induced AKI leads to altered Na^+ transport in several tubular segments [14], as well as structural changes, including lumen dilation and brush-border diminishment [15]. Proximal tubule is responsible for the bulk reabsorption of filtered Na^+ and is tightly linked to plasma volume maintenance and regulation of blood pressure levels [16] and hypertension onset [17–21]. Na^+ transport in the proximal tubules relies on energy-dependent Na^+ gradient, which depends of two Na^+ pumps located on basolateral membrane: ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase [22] and furosemide-sensitive, ouabain-resistant Na^+ -ATPase [23]. Previous studies had showed ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase mRNA and protein expression downregulation in IR renal injury in early periods [24–26], as well as of Na^+/H^+ -exchanger 3 [27]. However, at later periods, IR-induced AKI is linked to impaired pressure natriuresis and development of Na^+ -dependent hypertension [28].

The renin-angiotensin system (RAS) is a central element in the regulation of proximal tubule Na^+ reabsorption. RAS activation has been associated with increased Na^+ transport, especially through angiotensin II-dependent pathways [19]. Angiotensin II exerts a biphasic action on proximal ATP dependent Na^+ transport by stimulating ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase and Na^+ -ATPase activities, via type 1 angiotensin II receptor (AT_1R), and inhibiting, via type 2 angiotensin II receptor (AT_2R) [22,29]. Furthermore, intrarenal RAS is also involved in several cellular processes underlying renal injury, such as cellular proliferation, inflammation and fibrosis via its various receptors in the kidney [30,31]. In renal IR, it is recognized the role of

many renal RAS components in the mechanism of renal injury [32–34]. Soon after IR, it is observed elevation of renal angiotensin II levels and renal renin activity [32]. It had been also that losartan treatment prevents salt-induced renal fibrosis in rats exposed to elevated dietary salt following renal IR-induced AKI [35].

Reactive oxygen species (ROS) also present a relevant importance in IR-induced AKI [36,37], and proximal tubule cells are especially sensitive [26,38]. NADPH oxidase is an important source of ROS production in renal tissue and the increase of its expression/activity is reported in models of hypertension and renal dysfunction [20,39,40]. Indeed, NADPH oxidase activity may be stimulated by angiotensin II, leading to activation of pathways involved with growth and cell migration, apoptosis and inflammation [41].

Once AKI may lead to later renal dysfunction and hypertension onset, even when is observed recovery of normal clinical markers, it is possible that proximal tubule Na^+ transport and RAS have a key role in this process. Moreover, NADPH oxidase may be an underlying mechanism linking early to later AKI-associated alterations. Therefore, this study evaluated whether IR-induced AKI could provoke alterations in the activity of proximal tubule ATP-dependent Na^+ transporters and in the renal content of RAS components, which could trigger the hypertension development. In addition, we investigated whether these alterations could have the NADPH oxidase as underlying factor.

2. Methods

2.1. Animals

This study used Wistar rats maintained in groups of 3-4 per cage at $21\pm 2^\circ\text{C}$, 12 hours light/dark cycle and with free-access to water and chow. The experimental protocol was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation from Federal University of Pernambuco (No. 23076.11764/2015-37).

Male rats (300–350 g body weight) were submitted to bilateral renal ischemia-reperfusion (IR) procedure to induce AKI. For this procedure, rats ($n=25$) were anesthetized (ketamine/xylazine; 80/10 mg/kg body weight, ip) to allow access to renal pedicles, and the renal blood flow was ceased during 45 minutes by the placement of microaneurysm clamps around renal artery and vein from both kidneys. During this period, the body temperature of the rats was intensely controlled by constant measurement of rectal temperature and control of a thermostatic surgical table. After ischemia period, renal perfusion was restored by removal of

the clamps and confirmed by the observation of change in kidney color. Then, the laparotomy incision was closed using 4-0 nylon monofilament suture thread. One part of the rats was submitted to IR procedure in the presence of apocynin treatment (100 mg/kg body weight) in the drinking water 24 hours before and 24 hours after surgery (IR + apocynin in acute treatment, IR+AA group; n=9). Another part of the animals received daily apocynin treatment (100 mg/kg body weight in drinking water) starting 24 hours after IR induction (IR + apocynin in chronic treatment, IR+AC group; n=7), while another group remained untreated (IR group; n=9). The data of these groups were compared to a Sham group (n=8) that underwent to surgical procedure similar to the previously described, except for the positioning of the clamps.

All groups were followed up during 4 weeks. After this period, rats were anesthetized (ketamine/xylazine; (80/10 mg/kg body weight, ip) and submitted to removal of both kidney and one liver sample. The samples were snap frozen in liquid nitrogen and was stored in aliquots at -80°C .

2.2. Systolic blood pressure

After 2 and 4 weeks of surgery, measurement of systolic blood pressure (SBP) was performed in conscious rats by tail-cuff plethysmography (IITC Life Science B60-7/16, Life Science Instruments) as described previously [20,42]. Previously to acquire tail-cuff SBP, the rats were trained to measurement procedures for three consecutive days.

2.3. Evaluation of lipid peroxidation

The evaluation of lipid peroxidation was performed by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as previously described [20]. Kidney and liver samples were homogenized in a solution containing KCl 1, 15% and 3mM EDTA (5 mL per gram of tissue) and kept in an ice bath. Then one volume of the homogenate was added to 10 volumes of a reaction medium containing SDS (0.4%), acetic acid (7.5%), and thiobarbituric acid (0.3%) with pH 3.5. The reaction tubes were sealed and incubated at 95°C for 60 minutes. After cooling in running water, one volume of n-butanol was added for each reaction volume, and the tubes were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 minutes. The absorbance of the organic phase was measured at 535 nm. Concentration was obtained by comparison to a standard malonildialdehyde curve. The result was corrected by the protein concentration of the homogenate.

2.4. Evaluation of basal superoxide production and NADPH oxidase activity

Basal superoxide production and NADPH oxidase activity were assessed using lucigenin-derived chemiluminescence. Aliquots of the renal cortex maintained in the ultrafreezer were thawed and immediately homogenized (7 mL per gram of tissue) in (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and 50 mM Tris, pH 8.0) supplemented by a protease inhibitor cocktail (2 mM AEBSF, 1 mM EDTA, 130 μ M bestatin, 14 μ M E-64, 1 μ M leupeptin and 0.3 μ M aprotinin). Then, the homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 12 min at 4°C, and the supernatant was used in the following steps. Basal superoxide production was evaluated by adding one volume of supernatant to nine volumes of reaction medium containing 10 μ M lucigenin and 0.02M PBS (pH 7.4) in a 96-well white plate. The chemiluminescence was captured by measuring cycles of 3s, performed every 30 seconds, during an interval of 5 minutes (that is, 10 cycles), with the aid of a luminometer (Varioskan Flash, Thermo Scientific). The result was expressed in relative light unit per second and corrected by the concentration of protein in the supernatant. NADPH oxidase activity was evaluated by the same protocol, however the reaction medium contained 100 μ M NADPH, in addition to 10 μ M lucigenin and 0.02 M PBS (pH 7.4)

2.5. Evaluation of ATP-dependent Na^+ transport

The measurements of ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase and furosemide-sensitive, ouabain-resistant Na^+ -ATPase activities were performed in *cortex corticis*, which represents the outermost portion of renal cortex [43] where >90% corresponds to proximal tubule cells [44]. Frozen renal cortical samples were thawed in an ice bath and 0.5 mm slices were obtained using a Stadie-Riggs microtome. The cortical outermost fragments were homogenized in an ice cold 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 0.15 mg/mL trypsin inhibitor (type II-S) and 1 mM PMSF. The protein content in each sample was measured by Folin-phenol method [45].

The ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase and Na^+ -ATPase activities were evaluated by measurement of ATP hydrolysis sensitive to specific inhibitors, ouabain and furosemide respectively, according to the method described previously [20,46]. The inorganic phosphate (P_i) released from ATP hydrolysis was measured at 620 nm after molybdenum reaction.

2.6. Western blotting

Cortex cortices samples were also used for evaluation of protein abundance by immunoblotting as previously described [20,47]. Protein extraction was performed by homogenizing the samples in ice-cold radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and 50 mM Tris, pH 8.0) supplemented by a protease inhibitor cocktail (2 mM AEBSF, 1 mM EDTA, 130 μ M bestatin, 14 μ M E-64, 1 μ M leupeptin and 0.3 μ M aprotinin). Proteins were separated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking non-specific binding sites in bovine serum albumin solution (5%), nitrocellulose membranes were appropriately incubated with primary and secondary antibodies. The immunoblotting images were acquired using chemiluminescent reagent (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and an image acquisition system (ChemiDoc MP, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Immunoblotting densitometry was evaluated through Image Lab software (version 5.2.1, Bio-Rad Laboratories Inc.) and normalized according to β -actin bands densitometry.

The primary antibodies were: anti-(pro)renin/renin, 1:500 dilution (sc-133145, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-ACE1, 1:100 dilution (sc-23908, Santa Cruz Biotechnology); Anti-ACE2, dilution 1:1000 (ab108252, Abcam, Cambridge, UK); anti-AT₁R, dilution 1:500 (sc-57036, Santa Cruz Biotechnology); anti-AT₂R, dilution 1:250 (sc-9040, Santa Cruz Biotechnology); anti-angiotensinogen, dilution 1:500 (NBP1-30027, Novus Biologicals, Centennial, CO); anti-PKC α , dilution 1:500 (sc-208, Santa Cruz Biotechnology); anti-PKC ϵ , 1:500 dilution (sc-214, Santa Cruz Biotechnology); anti-PKC ζ , dilution 1:500 (sc-216, Santa Cruz Biotechnology); anti-PKC λ , dilution 1:250 (sc-1091, Santa Cruz Biotechnology); anti-PKA, 1:500 dilution (sc-903, Santa Cruz Biotechnology); anti-(Na⁺+K⁺) ATPase, dilution 1:1000 (A276, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO); anti- β -actin, dilution 1:5000 (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology).

2.7. Statistical analysis

Results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Gaussian distribution of each data was evaluated using Shapiro-Wilk normality test. As it was not observed no gross deviations from normal distribution, differences between the four groups were compared using one-way analysis of variance, followed by the Tukey test. Statistical analysis and figure

drawing were performed using GraphPad Prism 6 software (version 6.01, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *Effect of ischemia-reperfusion in renal function and tail-cuff systolic blood pressure*

To confirm the impact of IR in renal function, BUN and serum creatinine levels were measured 24 hours after the surgical procedure. It was observed that the animals submitted to IR presented an increase of more than 4 times ($P < 0.001$) in serum creatinine levels when compared to sham group (Sham: 3.00 ± 0.32 vs. IR: 0.71 ± 0.08 mg/dL; $P < 0.001$). On the other side, rats submitted to IR treated with apocynin presented lower serum creatinine than non-treated rats (IR+AA: 1.75 ± 0.38 vs. IR: 3.00 ± 0.32 mg/dL; $p < 0.05$). BUN was also higher in rats submitted to IR than sham group and apocynin-treated rats (IR: 227 ± 19 vs. Sham: 47 ± 3 and IR+AA: 144 ± 12 mg/dL; $p < 0.01$).

Previously to IR, tcSBP was similar between groups (Figure 1A). On the other side, after 2 weeks, IR group presented tcSBP nearly 10% higher ($p < 0.01$) than sham rats and apocynin-treated rats, which were not different between each other (Figure 1A). At 4 weeks, these changes were still observed (Figure 1 A and B).

3.2. *Later effects of IR injury: lipid peroxidation, superoxide anions levels and NADPH oxidase activity*

Four weeks after renal IR injury, we evaluated the IR effects in the lipid peroxidation, superoxide anions production and NADPH oxidase activity. Initially, Fig. 2 shows that IR dramatically increased the MDA levels in renal cortex (230% if compared to Sham group, panel A) and in liver (175% if compared to Sham group, panel B). In both cases, acute and chronic apocynin-treatments were effective in restoring MDA to Sham levels.

Furthermore, superoxide anions production (Fig. 3A) and NADPH oxidase activity (Fig. 3B) were increased by IR (250% and 165% if compared to Sham levels, respectively). In the same way, acute and chronic apocynin administrations were able to prevent the increase of these two parameters.

3.3. Later effects of IR injury in proximal tubule ATP dependent Na^+ -transporters

In order to investigate whether renal injury due to IR could induce late changes in proximal tubule Na^+ transport, we evaluated the activity of Na^+ -transporting ATPases, ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase (Fig. 4A) and furosemide-sensitive, ouabain-resistant Na^+ -ATPase (Fig. 4C), which are pivotal in Na^+ gradient generation. The ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity was 60% higher ($p < 0.01$) in *cortex cortices* from animals submitted to IR when compared to Sham group (Fig. 4A). In rats submitted to IR that received apocynin treatment, ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity was restored to the Sham group levels. The ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase $\alpha 1$ subunit protein abundance was not different between experimental groups (Figure 4B).

Regarding Na^+ -ATPase activity, it was observed that IR induced opposite changes to that seen in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase (Figure 4C). The furosemide-sensitive Na^+ -ATPase activity was 45% lower ($p < 0.05$) in *cortex cortices* from IR rats in comparison to Sham group. Again, this alteration was completely prevented by both protocols of apocynin treatments.

3.4. Later alterations of renal RAS components expression induced by IR

As proximal Na^+ reabsorption is characteristically modulated by angiotensin II, we evaluated the effects of IR injury in the renal content of RAS key components (Fig. 5). There was no difference in angiotensinogen, prorenin and renin content between experimental groups (Fig. 5A, B and C). However, the 1 and 2 angiotensin II converting enzymes (ACE1 and ACE2) were downregulated by IR (30% and 35% if compared to Sham group, respectively) (Fig. 5D–E), as type 2 angiotensin II receptor (AT_2R) (30% lower in comparison to Sham group) (Fig. 6G). Lastly, type 1 angiotensin II receptor (AT_1R) was upregulated by IR injury (30% in comparison to Sham group) (Fig. 5F). In all analysis (Fig. 5B–G), acute and chronic apocynin treatments reverted the protein contents to the Sham levels.

3.5. Later effects of IR-induced renal injury on PKC and PKA abundances in proximal tubule

Finally, it was evaluated PKC and PKA abundances in *cortex cortices*, as these kinases may be involved in tubular Na^+ transport regulation downstream to AT_1R and AT_2R activation. The rats submitted to IR presented lower PKC α and PKC ϵ contents in comparison to Sham group (25% and 35%, respectively) (Fig. 6A–B). Apocynin treated rats also presented lower

levels of PKC α content in comparison to Sham group (Fig. 6A), while the PKC ϵ abundance was similar to Sham group (Fig. 6B). The α -catalytic subunit PKA (Fig. 6D) contents were similar between all experimental groups, whereas PKC λ presented higher abundance in chronically apocynin treated rats in relation to Sham and non-treated IR groups (Fig. 6C).

4. Discussion

Overall, the present study demonstrated that AKI induces later changes in proximal tubule ATP dependent Na⁺ transport and content and activity of RAS components, which could explain systolic arterial pressure (SAP) elevation (Fig. 1). It was observed that AKI led to increased (Na⁺+K⁺)ATPase activity (Fig. 3A) in *cortex corticis*, simultaneously to upregulation of the pro-hypertensive RAS component AT₁R (Fig. 5F), and downregulation of anti-hypertensive ones, such as ACE2 (Fig. 5E) and AT₂R (Fig. 5G). Furthermore, apocynin-treatment data indicates ROS production mediated by NADPH oxidase (Fig. 3B) as underlying mechanism of several changes induced by AKI.

AKI is a condition associated to a rapid loss of renal function and retention of metabolic waste. Renal IR is one of the most frequent underlying causes of AKI, which leads to damage by apoptosis, oxidative stress, inflammatory factors and changes in renal vascular reactivity [48]. Ischemia leads to ATP depletion, mitochondrial dysfunction and apoptosis [49]. The reperfusion potentiates the injury process as it is a strong stimuli to ROS generation [50]. Proximal tubule injury seems to be an initial factor in pathophysiology of renal IR injury. NADPH oxidase inhibition is already recognized to be an important protective mechanism over oxidative stress-induced injuries [39]. However, it is noteworthy that ROS production may also occurs through other pro-oxidative pathways [51].

Proximal tubule cells metabolism is highly dependent of oxidative phosphorylation as energy source, therefore, ATP depletion due to ischemia and ROS generation due to reperfusion is particularly noticed by these cells [26,38,49]. ATP depletion affects the maintenance of cell polarization and (Na⁺+K⁺)ATPase activity, leading to urinary Na⁺ loss, worsen of renal perfusion and decrease of glomerular filtration rate. In part, protective effects of NADPH oxidase inhibition may be related to improvement of renal blood flow impairment induced by IR injury [52,53]. Furthermore, the increased superoxide anions levels observed in IR group (Fig. 3A) supports the hypothesis that oxidative stress is permanently raised after AKI, and lowering of superoxide anions in chronic apocynin treated rats, indicates the participation of NADPH oxidase (Fig. 3B).

Predisposal of kidneys to chronic disease following acute injury may occur due to inappropriate restoration of tubular epithelial function and renal microvascularization [1,54]. Moreover, postischemic kidneys may have sustained hypoxia, as it is observed that renal blood flow stay diminished for up to 2 weeks after IR injury [55]. It may be supposed that the protective effects of NADPH oxidase inhibition could occur by early recovery of renal blood flow through regulation of renal vascular resistance [56].

Renal ischemic injury is a local event. However, ROS generation due to reperfusion may reach other organs and lead to systemic damage [57]. Evidences of organ crosstalk following AKI also points this disease as risk factor to CVD, as heart failure, stroke and hypertension [10]. It was observed that AKI induced later SAP elevation that was already observed two weeks after IR, and persisted until 4 weeks (Fig. 1). It is likely that the ROS produced by NADPH oxidase also have a direct influence on vascular reactivity and thus contribute to hypertension, as apocynin treated rats did not present SAP elevation. Several studies have demonstrated the antihypertensive effect of apocynin administration in others models of hypertension [40,58,59].

On the other hand, it is also conceivable that the increase in SAP occurs through Na^+ retention, due to a lower glomerular filtration rate or increased tubular reabsorption. The increased $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity observed in *cortex corticis* (Fig. 4A) from rats submitted to IR supports the hypothesis that increased proximal Na^+ reabsorption accounts to increased blood pressure levels. Similarly, experiments using IR-induced AKI demonstrated an increased susceptibility of postischemic rats to increased dietary salt, which was accompanied by kidney damage, impaired natriuresis pressure and hypertension [28,60].

Proximal tubule Na^+ reabsorption is central in the regulation of Na^+ homeostasis and in the onset of hypertension. Co-ordinate regulation of isoform 3 (Na^+/H^+) exchanger distribution along luminal microvillous, as well as $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity decrease are important natriuretic response in hypertension [16,61]. Moreover, in spontaneously hypertensive rats, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ does not respond to dopaminergic inhibitory signaling, although there is increased dopamine production [62,63], as well as they present an increased proximal Na^+ reabsorption previously to increase of blood pressure levels [64].

Renal RAS presents a central role in regulation of Na^+ transport and is also tightly linked to renal damage [65]. Increased local angiotensin II formation in the proximal tubules may provide a powerful feedforward mechanism for promoting Na^+ retention and hypertension onset [66]. In 24 hours postischemic kidneys, it is observed increased levels of tissue angiotensin II [32]. Considering renal content of RAS components in this study (Fig. 5), it may be suggested

that proximal tubule in later periods post ischemia are also exposed to enhanced effects of angiotensin II. First, even in the presence of ACE1 downregulation (Fig. 5D), it was observed upregulation of the pro-hypertensive and anti-natriuretic AT₁R (Fig. 5F), as previously described [65]. On the other way, it may be observed AT₂R downregulation (Fig. 5G), suggesting a decrease in the natriuretic actions of angiotensin II, as well as an ACE2 downregulation (Fig. 5E), which may be related to the lower Ang-(1–7) availability. Likewise, it has been demonstrated that NADPH oxidase has a pivotal role in the IR-induced blood pressure elevation. Furthermore, NADPH oxidase inhibition was also effective in preventing the (Na⁺+K⁺)ATPase activity stimulation and changes in expression of various components of the RAS.

It was observed that postischemic kidneys presented lower content of PKC α and PKC ϵ (Fig. 6A–B) and unaltered PKA abundance (Fig. 6D), while chronic apocynin treatment induced PKC λ upregulation (Fig. 6C). PKC α is a conventional isoform of PKC that participates of podocyte injury mechanisms leading to proteinuria [67,68]. On the other side, PKC ϵ represents a novel PKC isoform that has been linked to protective responses to renal injury [69,70]. Interestingly, PKC λ is essential for the establishment of epithelial polarity and the normal assembly of tight junctions, and may have an important role in podocyte foot process maintenance effects [71,72], that could be explain apocynin protection on renal injury. These kinases also have key role in angiotensin II signaling and interacting cascades that start with AT₁R and AT₂R and culminate in the Na⁺ transporters [73,74]. Therefore, IR-induced effects on PKC α content seems to be compensatory to renal injury, while the changes in PKC ϵ may be an underlying mechanism. It is noteworthy that decrease furosemide-sensitive, ouabain resistant Na⁺-ATPase (Fig. 4C) may be also accounted as counterregulatory mechanism to limit the AKI-induced SAP increase.

In conclusion, the present data show that IR-induced AKI leads to persistent changes in ATP-dependent Na⁺ transport and intrarenal RAS, which may facilitates hypertension onset. In addition, we concluded that the mechanisms involved in these late alterations are dependent on the increase of oxidative stress mediated by NADPH oxidase, which may be characterized as a potential therapeutic target for prevention of AKI-induced changes.

Author contribution

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) conception and design of the study: HM-F, ADOP, AV, LDV; (2) acquisition of data: NKSL,

WRSA, AGO, JSF, RSA, HM-F; (3) analysis and interpretation of data: NKSL, WRSA, AGO, JSF, RSA, HM-F, ADOP, AV, LDV; (4) drafting the paper: NKSL, LDV; (5) critical revision of the paper: HM-F, ADOP, AV, LDV; and (6) final approval of the version to be submitted: NKSL, WRSA, AGO, JSF, RSA, HM-F, ADOP, AV, LDV.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Dayane Aparecida Gomes for providing access to the apparatus located in her lab (Multiuser Platform in Cellular and Molecular Biology – FACEPE 16/2012; process no 1133-2.07/2012). We also thank Nielson T. Mello, Danielle Dutra and Glória Costa Sarmiento for technical support. This work was supported by research grants from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil (474004/2013-9 and 432468/2016-1) and by the Pernambuco State Foundation (FACEPE), Pernambuco, Brazil (APQ-1072-2.07/15).

References

- [1] Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* 2012;2:1303–1353. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110041>.
- [2] Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8:1482–1493. <https://doi.org/10.2215/CJN.00710113>.
- [3] Aitken E, Carruthers C, Gall L, Kerr L, Geddes C, Kingsmore D. Acute kidney injury: outcomes and quality of care. *QJM* 2013;106:323–332. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcs237>.
- [4] Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* 2012;81:442–448. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.379>.

- [5] Heung M, Chawla LS. Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21:628–634. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283588f24>.
- [6] Jones J, Holmen J, De Graauw J, Jovanovich A, Thornton S, Chonchol M. Association of complete recovery from acute kidney injury with incident CKD stage 3 and all-cause mortality. *Am J Kidney Dis* 2012;60:402–408. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.03.014>.
- [7] Goldberg A, Kogan E, Hammerman H, Markiewicz W, Aronson D. The impact of transient and persistent acute kidney injury on long-term outcomes after acute myocardial infarction. *Kidney Int* 2009;76:900–906. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.295>.
- [8] Chawla LS, Amdur RL, Shaw AD, Faselis C, Palant CE, Kimmel PL. Association between AKI and long-term renal and cardiovascular outcomes in United States veterans. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:448–456. <https://doi.org/10.2215/CJN.02440213>.
- [9] Wu VC, Wu CH, Huang TM, Wang CY, Lai CF, Shiao CC, et al. Long-term risk of coronary events after AKI. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:595–605. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013060610>.
- [10] Hsu CY, Hsu RK, Yang J, Ordonez JD, Zheng S, Go AS. Elevated BP after AKI. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:914–923. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111114>.
- [11] Chobanian AV. Mixed messages on blood pressure goals. *Hypertension* 2011;57:1039–1040. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.170514>.
- [12] Dombrowski M, Mannozi J, O'Leary DS. Neural control of cardiovascular function during exercise in hypertension. *Front Physiol* 2018;9:1829. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01829>.
- [13] Imig JD, Ryan MJ. Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol* 2013;2:957–976. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120028>.
- [14] Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007;376:1–43. <https://doi.org/10.1007/s00210-007-0183-5>.
- [15] Cardinal H, Dieudé M, Hébert MJ. Endothelial dysfunction in kidney transplantation. *Front Immunol* 2018;9:1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01130>.
- [16] McDonough AA. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298:R851–R861. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00002.2010>.

- [17] Roos JC, Kirchner KA, Abernethy JD, Langford HG. Differential effect of salt loading on sodium and lithium clearance in Dahl salt-resistant and -sensitive rats. *Hypertension* 1984;6:420–424. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.6.3.420>.
- [18] Chiolerio A, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Proximal sodium reabsorption: An independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension* 2000;36:631–637. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.36.4.631>.
- [19] Wang X, Armando I, Upadhyay K, Pascua A, Jose PA. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:412–420. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32832f5775>.
- [20] Vieira-Filho LD, Cabral EV, Farias JS, Silva PA, Muzi-Filho H, Vieyra A, et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na^+ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr* 2014;111:1932–1944. <https://doi.org/10.1017/S0007114513004236>.
- [21] D'Elia L, Cappuccio FP, Iacone R, Russo O, Galletti F, Strazzullo P. Altered renal sodium handling and risk of incident hypertension: Results of the Olivetti Heart Study. *PLoS One* 2017;12:e0171973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171973>.
- [22] Féraille E, Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* 2001;81:345–418. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.345>.
- [23] Rocafull MA, Romero FJ, Thomas LE, del Castillo JR. Isolation and cloning of the K^+ -independent, ouabain-insensitive Na^+ -ATPase. *Biochim Biophys Acta* 2011;1808:1684–1700. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.02.010>.
- [24] Van Why SK, Mann AS, Ardito T, Siegel NJ, Kashgarian M. Expression and molecular regulation of Na^+ - K^+ -ATPase after renal ischemia. *Am J Physiol* 1994;267:F75–F85. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1994.267.1.F75>.
- [25] Wang Z, Rabb H, Haq M, Shull GE, Soleimani M. A possible molecular basis of natriuresis during ischemic-reperfusion injury in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:605–613.
- [26] Kwon TH, Frøkiaer J, Han JS, Knepper MA, Nielsen S. Decreased abundance of major Na^+ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F925–F939. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.6.F925>.
- [27] Di Sole F, Hu MC, Zhang J, Babich V, Bobulescu IA, Shi M, et al. The reduction of Na/H exchanger-3 protein and transcript expression in acute ischemia-reperfusion injury is

- mediated by extractable tissue factor(s). *Kidney Int* 2011;80:822–831. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.229>.
- [28] Pechman KR, De Miguel C, Lund H, Leonard EC, Basile DP, Mattson DL. Recovery from renal ischemia-reperfusion injury is associated with altered renal hemodynamics, blunted pressure natriuresis, and sodium-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297:R1358–R1363. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.91022.2008>.
- [29] Vieyra A, Silva PA, Muzi-Filho H, Dick CF, Araujo-dos-Santos AL, Dias J, et al. The role of the second Na⁺ pump in mammals and parasites. In: Chakraborti S, Dhalla NS, editors. *Regulation of membrane Na⁺-K⁺ ATPase, Advances in biochemistry in health and disease*, Winnipeg, Manitoba, Canada: Springer International Publishing; v. 15, 2016, pp. 93–112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24750-2_6.
- [30] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet* 2012;380:756–766. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61454-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61454-2).
- [31] Sharma N, Anders HJ, Gaikwad AB. Fiend and friend in the renin angiotensin system: An insight on acute kidney injury. *Biomed Pharmacother* 2019;110:764–774. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.018>.
- [32] Allred AJ, Diz DI, Ferrario CM, Chappell MC. Pathways for angiotensin-(1–7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F841–F850. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.5.F841>.
- [33] da Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LRL, Carmona AK, Cassali GD, Bruna-Romero O, et al. ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond)* 2010;119:385–394. <https://doi.org/10.1042/CS20090554>.
- [34] Ono M, Sakao Y, Tsuji T, Ohashi N, Yasuda H, Nishiyama A, et al. Role of intrarenal (pro)renin receptor in ischemic acute kidney injury in rats. *Clin Exp Nephrol* 2015;19:185–196. <https://doi.org/10.1007/s10157-014-0979-9>.
- [35] Mehrotra P, Patel JB, Ivancic CM, Collett JA, Basile DP. Th-17 cell activation in response to high salt following acute kidney injury is associated with progressive fibrosis and attenuated by AT-1R antagonism. *Kidney Int* 2015;88:776–784. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.200>.
- [36] Aksu U, Ergin B, Bezemer R, Kandil A, Milstein DM, Demirci-Tansel C, et al. Scavenging reactive oxygen species using tempol in the acute phase of renal ischemia/reperfusion and its effects on kidney oxygenation and nitric oxide levels. *Intensive Care Med Exp* 2015;3:57. <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0057-y>.

- [37] Rovcanin B, Medic B, Kocic G, Cebovic T, Ristic M, Prostran M. Molecular dissection of renal ischemia-reperfusion: oxidative stress and cellular events. *Curr Med Chem* 2016;23:1965-1980. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160112122858>.
- [38] Gobe GC, Johnson DW. Distal tubular epithelial cells of the kidney: Potential support for proximal tubular cell survival after renal injury. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1551–1561. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.04.025>.
- [39] Li YQ, Li XB, Guo SJ, Chu SL, Gao PJ, Zhu DL, et al. Apocynin attenuates oxidative stress and cardiac fibrosis in angiotensin II-induced cardiac diastolic dysfunction in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:352–359. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.164>.
- [40] Vieira LD, Farias JS, de Queiroz DB, Cabral EV, Lima-Filho MM, Sant'Helena BRM, et al. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864:3577–3587. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.019>.
- [41] Sachse A, Wolf G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2439–2446. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007020149>.
- [42] Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume–pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens* 2008;21:1288–1291. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.301>.
- [43] Vieyra A, Nachbin L, de Dios-Abad E, Goldfeld M, MeyerFernandes JR, de Moraes L. Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 1986;261:4247–4255.
- [44] Whittembury G, Proverbio F. Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflugers Arch* 1970;316:1–25.
- [45] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- [46] Grubmeyer C, Penefsky HS. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1981;256:3718–3727.
- [47] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
- [48] Singh AP, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep* 2012;64:31–44.

- [49] Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 2003;23:511–521. [https://doi.org/10.1053/S0270-9295\(03\)00130-X](https://doi.org/10.1053/S0270-9295(03)00130-X).
- [50] Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology* 2012;116:1139–1148. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31824f951b>.
- [51] Sinha N, Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. *Curr Hypertens Rev* 2015;11:132–142. <https://doi.org/10.2174/1573402111666150529130922>.
- [52] Persson P, Hansell P, Palm F. NADPH oxidase inhibition reduces tubular sodium transport and improves kidney oxygenation in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;302:R1443–R1449. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00502.2011>.
- [53] Liu C, Song Y, Qu L, Tang J, Meng L, Wang Y. Involvement of NOX in the regulation of renal tubular expression of Na/K-ATPase in acute unilateral ureteral obstruction rats. *Nephron* 2015;130:66–76. <https://doi.org/10.1159/000381858>.
- [54] Basile DP. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing to progressive nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:1–7. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000109576.66112.70>.
- [55] Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int* 2007;72:151–156. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002312>.
- [56] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006;69:213–217. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000054>.
- [57] Halladin NL. Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries. *Dan Med J* 2015;62:B5054.
- [58] Ciarcia R, Damiano S, Florio A, Spagnuolo M, Zacchia E, Squillacioti C, et al. The protective effect of apocynin on cyclosporine A-induced hypertension and nephrotoxicity in rats. *J Cell Biochem* 2015;116:1848–1856. <https://doi.org/10.1002/jcb.25140>.
- [59] Perassa LA, Graton ME, Potje SR, Troiano JA, Lima MS, Vale GT, et al. Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR. *Vascul Pharmacol* 2016;87:38–48. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.06.005>.
- [60] Spurgeon-Pechman KR, Donohoe DL, Mattson DL, Lund H, James L, Basile DP. Recovery from acute renal failure predisposes hypertension and secondary renal disease

- in response to elevated sodium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F269–F278. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00279.2006>.
- [61] Zhang Y, Norian JM, Magyar CE, Holstein-Rathlou NH, Mircheff AK, McDonough AA. In vivo PTH provokes apical NHE3 and NaPi2 redistribution and Na-K-ATPase inhibition. *Am J Physiol* 1999;276:F711–F719. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.276.5.F711>.
- [62] Racz K, Kuchel O, Buu NT, Tenneson S. Peripheral dopamine synthesis and metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1986;58:889–897. <https://doi.org/10.1161/01.RES.57.6.889>.
- [63] Albrecht FE, Drago J, Felder RA, Printz MP, Eisner GM, Robillard JE et al. Role of the D1A dopamine receptor in the pathogenesis of genetic hypertension. *J Clin Invest* 1996;97:2283–2288. <https://doi.org/10.1172/JCI118670>.
- [64] Crajoinas RO, Lessa LMA, Carraro-Lacroix LR, Davel APC, Pacheco BPM, Rossoni LV, et al. Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299:F872–F881. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00654.2009>.
- [65] Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007;59:251–287. <https://doi.org/10.1124/pr.59.3.3>.
- [66] Li XC, Zhuo JL. Recent updates on the proximal tubule renin-angiotensin system in angiotensin II-dependent hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2016;18:63. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0668-z>.
- [67] Menne J, Park JK, Boehne M, Elger M, Lindschau C, Kirsch T, et al. Diminished loss of proteoglycans and lack of albuminuria in protein kinase C- α -deficient diabetic mice. *Diabetes* 2004;53:2101–2109. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.8.2101>.
- [68] Lei CT, Wei YH, Tang H, Wen Q, Ye C, Zhang C, et al. PKC- α triggers EGFR ubiquitination, endocytosis and ERK activation in podocytes stimulated with high glucose. *Cell Physiol Biochem* 2017;42:281–294. <https://doi.org/10.1159/000477329>.
- [69] Meier M, Menne J, Park JK, Holtz M, Gueler F, Kirsch T, et al. Deletion of protein kinase C- ϵ signaling pathway induces glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis *in vivo*. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1190–1198. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005070694>.
- [70] Duong M, Yu X, Teng B, Schroder P, Haller H, Eschenburg S, et al. Protein kinase C ϵ stabilizes β -catenin and regulates its subcellular localization in podocytes. *J Biol Chem* 2017;292:12100–12110. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.775700>.

- [71] Hartleben B, Widmeier E, Suhm M, Worthmann K, Schell C, Helmstädter M, et al. α PKC λ/ι and α PKC ζ contribute to podocyte differentiation and glomerular maturation. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:253–267. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012060582>.
- [72] Lu R, Dalgalan D, Mandell EK, Parker SS, Ghosh S, Wilson JM. PKC ι interacts with Rab14 and modulates epithelial barrier function through regulation of claudin-2 levels. *Mol Biol Cell* 2015;26:1523–1531. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-12-1613>.
- [73] Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, Santos FTJ, Luzardo R, Oliveira FST, et al. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys* 2011;505:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.025>.
- [74] Silva PA, Monnerat-Cahli G, Pereira-Acácio A, Luzardo R, Sampaio LS, Luna-Leite MA, et al. Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. *PLoS One* 2014;9:e100410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100410>.

Figure legends

Fig. 1. *Systolic arterial pressure (SAP) evaluated before and after rats had been submitted to acute kidney injury by ischemia-reperfusion (IR).* Sham group: rats were submitted to surgery procedures similar to group submitted to IR; IR group: rats were submitted to 45 minutes of bilateral renal ischemia through clamping of renal pedicle, followed by reperfusion; IR+AA group: rats were submitted to IR injury, however were maintained treated with apocynin (100 mg/kg of body weight, drinking water) during 24 hours before and after surgical procedure; IR+AC group: rats submitted to IR injury that received apocynin treatment (100 mg/kg of body weight, drinking water) starting 24 hours after surgery. (A) Time course of SAP evaluated 2 and 4-weeks after rats had been submitted to IR (B) SAP evaluated 4 weeks after IR procedure. The experimental n was in the range of 6–9 per group. Data is presented as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 vs. Sham (one-way ANOVA followed by Tukey test).

Fig. 2. *Tissue lipid peroxidation evaluated in renal cortex (A) and hepatic tissue (B).* Lipid peroxidation was evaluated by measurement of thiobarbituric acid reactive substances. MDA = malondialdehyde. The experimental n ranged between 5–8. The results are expressed as mean $\pm$ SEM. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. Sham; † p < 0.05 and ††† p < 0.001 vs. IR (one-way ANOVA followed by Tukey test).

Fig. 3. (A) *Basal superoxide anions production and (B) NADPH oxidase activity.* The assays were performed using renal cortex after rats had been submitted to acute kidney injury by ischemia-reperfusion (IR). RLU = relative light units. The experimental n ranged between 4–6. The results are expressed as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. Sham; † p < 0.05 vs. IR (one-way ANOVA followed by Tukey test).

Fig. 4. (A) *Ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity, (B) ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase ($\alpha 1$ subunit) immunodetection and (C) furosemide-sensitive, ouabain-resistant Na^+ -ATPase activity.* The assays were performed in cortex corticis 4-weeks after rats had been submitted to acute kidney injury by ischemia-reperfusion (IR). P_i : inorganic phosphate measured from ATP hydrolysis. The experimental n was in the range of 4–7 per group. Data is presented as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. Sham; † p < 0.05, †† p < 0.01 and ††† p < 0.001 vs. IR (one-way ANOVA followed by Tukey test).

Fig. 5. *Immunodetection of renal cortical renin-angiotensin system (RAS) components.* The upper part of each panel shows a representative immunodetection in a single gel and the lower part of each panel shows a graphic representation of the protein content for each RAS component. (A) angiotensinogen; (B) prorenin; (C) renin; (D) isoform 1 of angiotensin-converting enzyme (ACE1); (E) isoform 2 of angiotensin-converting enzyme (ACE2); (F) type 1 angiotensin II receptor (AT₁R); (G) type 2 angiotensin II receptor (AT₂R). The experimental n was in the range of 4–12 per group. Data is presented as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. Sham; † p < 0.05, †† p < 0.01 and ††† p < 0.001 vs. IR; ‡ p < 0.05 vs. IR+AA (one-way ANOVA followed by Tukey test).

Fig. 6. *Immunodetection of protein kinase C (PKC) isoforms and of the α -catalytic subunit of protein kinase A (PKA) evaluated in renal cortex.* The upper part of each panel shows a representative immunodetection in a single gel and the lower part of each panel shows a graphic representation of the protein content for each PKC isoform. (A) PKC α , a conventional PKC isoform; (B) PKC ϵ , a novel PKC isoforms; (C) PKC λ and (D) α -catalytic subunit of PKA. The experimental n was in the range of 5–6 per group. Data is presented as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. Sham; † p < 0.05 vs. IR (one-way ANOVA followed by Tukey test).

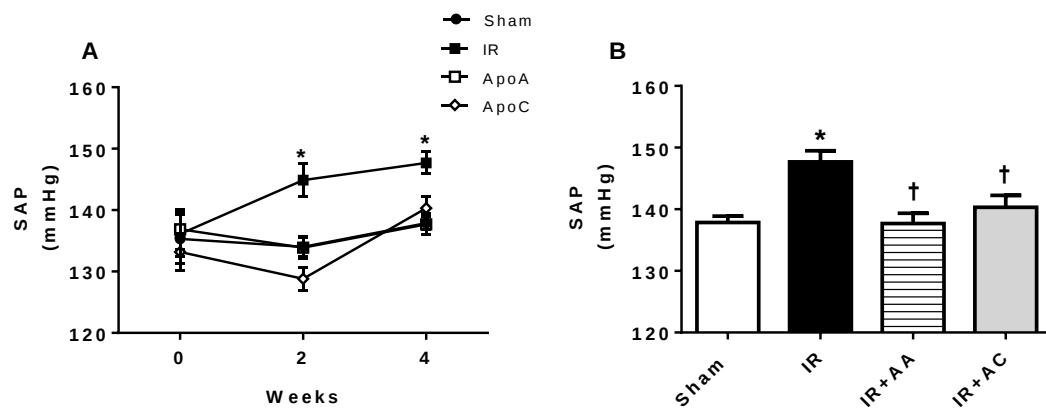
**Fig. 1**

Fig. 2.

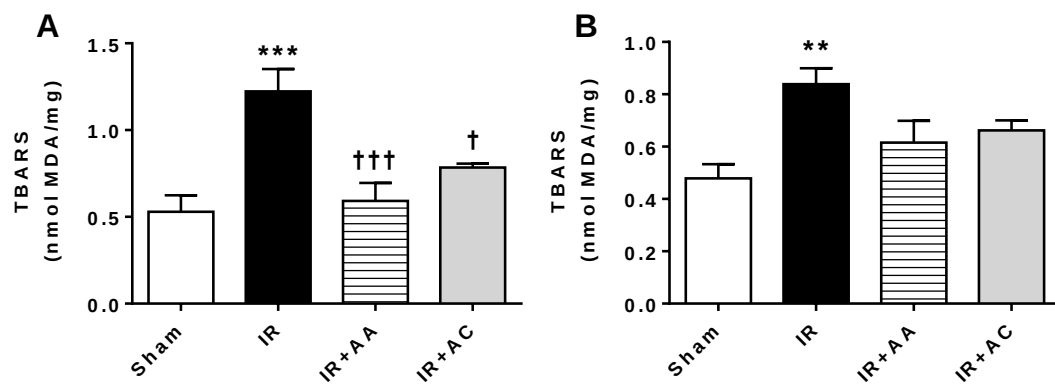


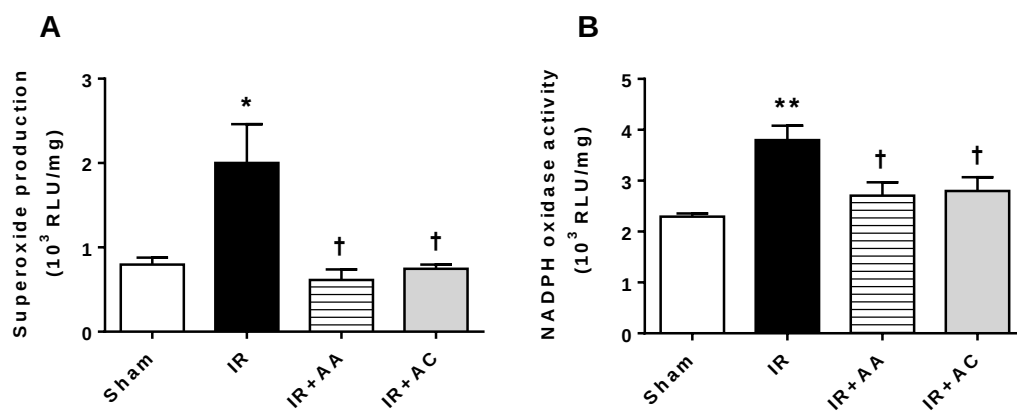
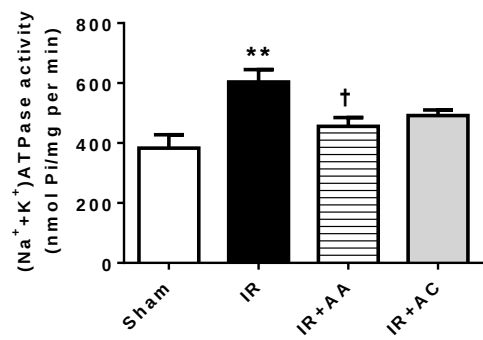
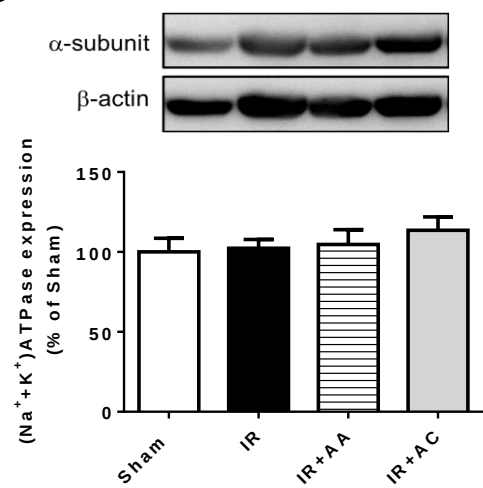
Fig. 3.

Fig. 4.

A



B



C

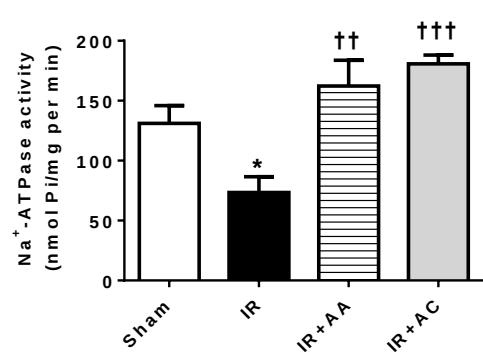


Fig. 5.

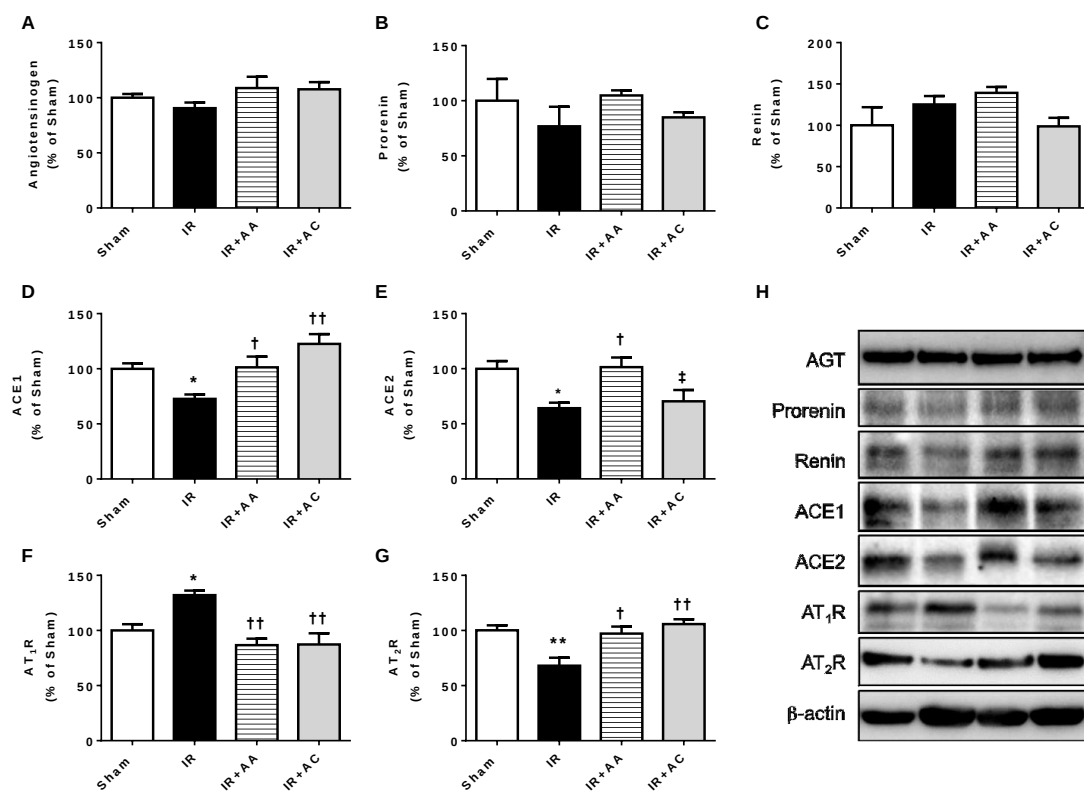
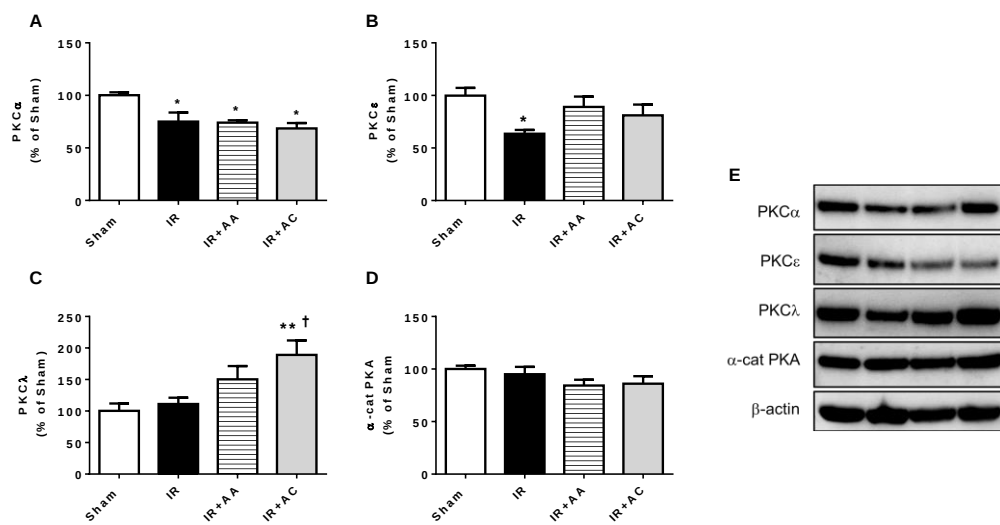


Fig. 6.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo nos permite concluir que, mesmo que a taxa de filtração glomerular se recupere após um episódio de lesão renal aguda (LRA) induzida por isquemia-reperfusão, alterações no transporte de sódio e componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) do túbulo proximal persistem e podem repercutir tardiamente através da facilitação para o estabelecimento da hipertensão. Além disso, concluímos que os mecanismos envolvidos nessas alterações tardias são dependentes do aumento de estresse oxidativo mediado por estimulação da enzima NADPH oxidase, o que a caracteriza com um potencial alvo terapêutico para prevenção das alterações provenientes da LRA.

7 REFERÊNCIAS

- 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v.107, nº 3, Supl. 3, 2016.
- ADIYANTI, S.S.; LOHO, T. Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. **Acta medica Indonesiana**, v.44, p.246-55, 2012.
- AIRES, MARGARIDA. Fisiologia. 3ª edição. **Guanabara Koogan**, 2008.
- ALBRECHT, F.E. et al. Role of the D1A dopamine receptor in the pathogenesis of genetic hypertension. **J Clin Invest**, v.97, p.2283–2288, 1996.
- ALKHUNAIZI, A.M. et al. Arachidonic acid protects against hypoxic injury in rat proximal tubules. **Kidney Int.**, v.49, p.620–625, 1996.
- APERIA, A. et al. Na⁺-K⁺-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. **Am J Physiol Cell Physiol** v.310, p.C491–C495, 2016.
- ARROJA, M.M.C. et al. Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke. **Exp & Trans Stroke Med**, v.8, p.8-22, 2016.
- BANKIR, L. et al. Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? **Am J Physiol Renal Physiol**, v.299, p.F917–F928, 2010.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v.87, p.245–313, 2007.
- BELLO, A.K et al. Global Kidney Health Atlas: A report by the International Society of Nephrology on the current state of organization and structures for kidney care across the globe. **International Society of Nephrology**, 2017.
- BURNIER, M. et al. Renal sodium handling in patients with untreated hypertension and White coat hypertension. **Hypertension**, v.23, p.496–502, 1994.
- CAI, H. et al. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v.24, p.471–478, 2003.
- CARDINAL, H. et al. Endothelial Dysfunction in Kidney Transplantation. **Front. Immunol**, v.9, p.1-8, 2018.
- CAREY, R.M. Blood Pressure and the Renal Actions of AT2 Receptors. **Curr Hypertens Rep** v.19, p.21-23, 2017.
- CASTRO E SILVA JR, O. et al. Aspectos Básicos Da Lesão De Isquemia e Reperfusão e do Pré-Condicionamento Isquêmico. **Acta Cir Bras**, v.17, p.96-100, 2002.
- CHATTERJEE, P.K. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal challenges in developing countries. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v.9, p.193-200, 2016.

CHATTERJEE P. K. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.376, p.1–43, 2007.

CHOBANIAN, A.V. Mixed messages on blood pressure goals. **Hypertension**, v.57, p.1039–1040, 2011.

CHOU, Y.H. et al. Role of renin-angiotensin system in acute kidney injury-chronic kidney disease transition. **Nephrology**, v.23, p.121–125, 2018.

CLARK, R. A. et al. Mechanisms of activation of NADPH oxidases. **Jpn J Infect Dis**. v.57, p.S22–S23, 2004.

CRAJOINAS R.O. et al. Angiotensin II counteracts the effects of cAMP/PKA on NHE3 activity and phosphorylation in proximal tubule cells. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.311, p.C768-C776, 2016.

CRAJOINAS, R.O. et al. Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. Young prehypertensive SHR. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. v.299, p.F872–F881, 2010.

CRUZ, F. Pacientes com doença renal crônica triplicam em 16 anos no Brasil. **Agência Brasil**, 2017. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2017-06/pacientes-com-doenca-renal-cronica-triplicam-em-16-anos-no-brasil>. Acesso em: 18 de dezembro de 2018.

CUI, X.; XIE Z. Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction. **Molecules**, v.22, p. 990, 2017.

DE SOUZA A.M. et al. Angiotensin II and angiotensin-(1–7) inhibit the inner cortex Na⁺-ATPase activity through AT₂ receptor. **Regul Pept**, v.120, p.167–175, 2004.

DE SOUZA A.M.D. et al. Entamoeba histolytica: ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity. **Exp Parasitol**, v.117, p.195–200, 2007.

DEVARAJAN, P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.17, p.1503–1520, 2006.

DOMBROWSKI, M. et al. Neural Control of Cardiovascular Function During Exercise in Hypertension. **Front Physiol**, v.9, p.1829, 2018.

DOROTEA, D. et al. A pan-NADPH Oxidase Inhibitor Ameliorates Kidney Injury in Type 1 Diabetic Rats. **Pharmacology**, v.102, p.180–189, 2018.

DUSSE, L.M.S. et al. Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente? **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2016

FERAILLE, E.; DIZIN, E. Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting Duct. **J Am Soc Nephrol**, v.27, p.2554-2563, 2016.

GONZALEZ-VILLALOBOS R.A. et al. The absence of intra-renal ACE protects against hypertension. **J Clin Invest**, v.123, p.2011–23, 2013.

GUYTON A.C., et al. A systems analysis approach to understanding long-range arterial blood pressure control and hypertension. **Circ Res**, v.35, p.159–176, 1974.

<https://sbn.org.br/publico/>, acessado em 18 de dezembro de 2018.

HALLADIN, N. L. Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries. **Danish Medical Journal**, v.62, p.B5054, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **NY: Oxford University Press**, v.188, p.170-171, 1999.

HAMRAHIAN S.M.; FALKNER, B. Hypertension in Chronic Kidney Disease. **Adv Exp Med Biol - Advances in Internal Medicine**, v.956, p.307-325, 2016.

HANNKEN T, et al. Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. **Kidney Int**, v.54, p.1923-33, 1998.

HAUCK C.; FRISHMAN, W.H. Systemic Hypertension: The Roles of Salt, Vascular Na⁺/K⁺ ATPase and the Endogenous Glycosides, Ouabain and Marinobufagenin. **Curr Cardiol Rev**, v.20, p.130–138, 2012.

HU, B. et al. Apocynin Alleviates Renal Ischemia/Reperfusion Injury Through Regulating the Level of Zinc and Metallothionein. **Biol Trace Elem Res**, v.178, p.71-78, 2017.

IMIG, J.D.; RYAN, M.J. Immune and inflammatory role in renal disease. **Compr Physiol**, v.2, p.957-76, 2013.

IWAMOTO, T.; KITA, S. Hypertension, Na⁺/Ca²⁺ exchanger, and Na⁺, K⁺-ATPase. **Kidney Int**, v.69, p.2148–2154, 2006.

JORGENSEN, P.L. et al. Structure And mechanism Of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. **Annu Rev Physiol**, v.65, p.817–49, 2003.

KANG, J. et al Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. **Am J Physiol**, v.267, p.C1389–C1397, 1994.

KONTOGIANNIS, J.; BURNS, K.D. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. **Am J Physiol**, v.274, p.F79-90, 1998.

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

LAFRANCE J-F.; MILLER, D.R. Acute Kidney Injury Associates with Increased Long-Term Mortality. **J Am Soc Nephrol**, v.21, p.345–352, 2010.

LARA, L.S. et al. The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidyl inositol phospholipase C-protein kinase C pathway is involved in activation of proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1-7) in pig kidneys. **Exp. Physiol**, v.93, p.639–647, 2008.

LEVEY A.S.; JAMES M.T. Acute Kidney Injury. **Ann Intern Med**, v.168, p.065-079, 2017.

LI, Y. et al. Apocynin attenuates oxidative stress and cardiac fibrosis in angiotensin II-induced cardiac diastolic dysfunction in mice. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v.34, p.352–359, 2013.

LI, Z.; XIE, Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. **Pflugers Arch**, v.457, p. 635–44, 2009.

LIU, G.Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free radical research**, v. 44, p.479–96, 2010.

LIU, J. et al. Shapiro. Na/K-ATPase Signaling and Salt Sensitivity: The Role of Oxidative Stress. **Antioxidants**, v.6, p.18, 2017.

LIU, C. et al. Involvement of NOX in the regulation of renal tubular expression of Na/K-ATPase in acute unilateral ureteral obstruction rats. **Nephron**, v.130, p. 66-76, 2015.

LIU, J.; XIE, Z.J. The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking. **Biochim Biophys Acta**, v.1802, p.1237-1245, 2010.

LIU, J. et al. Targeting Na/K-ATPase Signaling: A New Approach to Control Oxidative Stress. **Curr Pharm Des**, v.24, p.359–364, 2018.

LIU, X. et al. Early Predictors of Acute Kidney Injury: A Narrative Review. **Kidney Blood Press Res**, v. 41, p. 680-700, 2016.

MA M.W. et al. NADPH oxidases in traumatic brain injury - Promising therapeutic targets? **Redox Biol**, v.16, p.285-293, 2018.

MA, M.W. et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. **Mol Neurodegener**, v.12, p.7-35, 2017.

MATOVINOVIĆ, M.S. Fisiopatologia e classificação de doenças renais. **EJIFCC**, v.20, p.2-11, 2009.

MCCANN, S. K.; ROULSTON, C. L. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. **Brain Sciv**. v.3, p.561-598, 2013.

MCDONOUGH, A.A.; BIEMESDERFER, D. Does membrane trafficking play a role in regulating the sodium/hydrogen exchanger isoform 3 in the proximal tubule? **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.12, p.533–541, 2003.

MCDONOUGH, A.A. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.298, p.R851–R86, 2010.

MEHTA R.L. et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Crit Care**, v.11, p.R31, 2007.

MEHTA R.L. et al. International Society of Nephrology's 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. **The Lancet**, v.385, p.2616-43, 2015.

MEHTA, R. et al. Detection and Management of AKI in the Developing World: The 18th Acute Disease Quality Initiative (ADQI) International Consensus Conference. **Kidney Int Rep**, v.2, p.515–518, 2017.

MINHAS, G. et al. Cellular Stress Response and immune Signaling in Retinal ischemia–Reperfusion injury. **Front Immunol**, v.7, p.444, 2016.

NANGAKU, M.; FUJITA T. Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. **Hypertens Res**, v.31, p.175-84, 2008.

NAVAR, L.G. The Role of the Kidneys in Hypertension. **J Clin Hypertens**, v.7, p.542-549, 2005.

NEWAZ, M.; YOUSEFIPOUR, Z. PPAR γ and NAD(P)H oxidase system interaction in glycerol-induced acute renal failure: role of gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase. **Renal failure**, v.36, p.567–74, 2014.

OHASHI, N. et al. The Intrarenal Renin-angiotensin System is Activated Immediately after Kidney Donation in Kidney Transplant Donors. **Intern Med Advance Publication**, v.17, p.1-6 2018.

ORTIZ, P.A.; GARVIN, J.L. Intrarenal transport and vasoactive substances in hypertension. **Hypertension**, v.38, p.621–624, 2001.

PALIPOCH, S. A Review Of Oxidative Stress In Acute Kidney Injury: Protective Role Of Medicinal Plants-Derived Antioxidants. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v.10, p.88-93, 2013.

PAPA, S.; DE RASMO, D. “Complex I deficiencies in neurological disorders,” **Trends Mol Med**, v.19, p.61–69, 2013.

PONCE, D.; BALBI, A. Acute kidney injury: risk factors and management proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1-7) in pig kidneys. **Exp Physiol**, v.93, p.639–647, 2008.

PONCE, D.; BALBI, A. Acute kidney injury: risk factors and management challenges in developing countries. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v.9, p.193-200, 2016.

QIAN, Q.I. Salt, water and nephron: Mechanisms of action and link to hypertension and chronic kidney disease. **Nephrology**, v.23, p.44–49, 2018.

QUEIROZ-MADEIRA, E.P. et al. Na⁺-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT1 receptor target in the development of hypertension. **Biochim Biophys Acta**, v.1798, p.360–366, 2010.

RACZ, K. et al. Peripheral dopamine synthesis and metabolism in spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**, v.58, p.889–897, 1986.

RANGEL, L.B. et al. PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. **Regul Pept**, v.127, p.177–182, 2005.

ROCAFULL, M.A. et al. The second sodium pump: from the function to the gene. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**, v.463, p.755–777, 2012.

ROOS, J.C. et al. Differential effect of salt loading on sodium and lithium clearance in Dahl saltresistant and sensitive rats. **Hypertension**, v.6, p.420–424, 1984.

SAIKUMAR P.; VENKATACHALAM M.A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. **Semin Nephrol**, v.23, p.511–21, 2003.

SANTOS, P.C. et al. Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. **J Pharmacol Sci**, v.120, p.77–88, 2012.

SAWHNEY, S.; FRASER, S.D. Epidemiology of AKI: Utilizing Large Databases to Determine the Burden of AKI. **Adv Chronic Kidney Dis**, v.24, p.194–204, 2017.

SAXENA, T. et al. Pathophysiology of essential hypertension: an Update. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v.16, p.879–887, 2018.

SEDEEK, M. et al. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe. **Am Soc Nephrol**, v.24, p.1512–1518, 2013.

SENA, C.M. et al. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. **Front Physiol**, v.9, p.1668, 2018.

SHARMA, N. et al. Friend and foe in the renin angiotensin system: An insight on acute kidney injury. **Biomed Pharmacother**, v.110, p.764–774, 2019.

SINGH, A. P. et al. Animal models of acute renal failure. **Pharmacol Rep**, v.64, p.31–44, 2012.

SPARKS, M.A. et al. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. **Compr Physiol**, v.4, p.1201–1228, 2014.

STAESSEN J.A. et al. Blood pressure and renal sodium handling in relation to genetic variation in the DRD1 promoter and GRK4. **Hypertension**, v.51, p.1643–1650, 2008.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: Molecular Aptitudes. **Mediators Inflamm**, v.2008, p.106507, 2008.

SURESHBABU, A. et al. Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury. **Redox Biology**, v.4, p.208–214, 2015.

T' HART, B.A. et al. Apocynin, a Low Molecular Oral Treatment for Neurodegenerative Disease. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

THOMPSON, L.P.; AL-HASAN, Y. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. **Journal of Pregnancy**, v. 2012, p.582748, 2012.

TITZE, J.; MACHNIK, A. Sodium sensing in the interstitium and relationship to hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.19, p.385–392, 2010.

TOUYZ, R. M. Apocynin, NADPH Oxidase, and Vascular Cells A Complex Matter. **Hypertension**, v.51, p.172-174, 2008.

TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? **Hypertension**, v.44, p.248–252, 2004.

VALLON, V. Tubular Transport in Acute Kidney Injury: Relevance for Diagnosis, Prognosis and Intervention. **Nephron**, v.134, p.160–166, 2016.

VIEIRA-FILHO, L.D. et al. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. **Arch Biochem Biophys**, v.505, p.91–97, 2011.

VIEIRA-FILHO, L.D. et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **Br J Nutr**, v.111, p.1932–1944, 2014.

VIRDIS, A. et al. Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. **Vascul Pharmacol**, v.87, p.1-5, 2016.

WANG, X. et al. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.18, p.412–420, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory (GHO) data, 2017. Disponível em: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence/en/. Acesso em 18 de dezembro de 2018.

XIE, Z.; CAI T. Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. **Mol Interv**. v.3, p.157–68, 2003.

XIMENES, V.F. et al. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch Biochem Biophys**, v.457, p.134-141, 2007.

XU L. et al. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger-NHE3 by angiotensin-II in OKP cells. **Biochim Biophys Acta**, v.1758, p.519–526, 2006.

YANG, T.; XU, C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. **J Am Soc Nephrol**, v.28, p.1040-1049, 2017.

YAP, S.C.; LEE, H.T. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. **Anesthesiology**, v.116, p.1139–1148, 2012.

ZHANG, J.; PRATT, R.E. The AT₂ receptor selectively associates with G_{I2} and G_{i3} in the rat fetus. **J Biol Chem**, v.271, p.5026–15033, 1996.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxid Med Cell Longev**, v.2016, p.4350965, 2016.

ZHANG, Y. et al. In vivo PTH provokes apical NHE3 and NaPi₂ redistribution and Na-K-ATPase inhibition. **Am J Physiol**, v.276, p.F711–F719, 1999.

ZHOU, P. et al. Roles of Non-Coding RNAs in Acute Kidney Injury. **Kidney Blood Press Res**, v.41, p.757-769, 2016.

CHOU, Y.H. et al. Role of renin-angiotensin system in acute kidney injury-chronic kidney disease transition. **Nephrology**, v.23, p.121–125, 2018.