

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISILOGIA

MARRY ANEYTS DE SANTANA CIRILO

**O ESTRESSE OXIDATIVO RENAL MODULA A
ATIVIDADE DO TRANSPORTE TUBULAR DE Na⁺
DEPENDENTE DE ATP EM UM MODELO DE INJÚRIA
RENAL INDUZIDO PELO PARAQUAT**

Orientador: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Co-Orientador: Prof. Dra. Ana Durce Oliveira Paixão

RECIFE
2019

MARRY ANEYTS DE SANTANA CIRILO

**O ESTRESSE OXIDATIVO RENAL MODULA A
ATIVIDADE DO TRANSPORTE TUBULAR DE Na⁺
DEPENDENTE DE ATP EM UM MODELO DE INJÚRIA
RENAL INDUZIDO PELO PARAQUAT**

Dissertação apresentada para a conclusão do curso de
Mestrado em Bioquímica e Fisiologia, Centro de
Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Bioquímica e fisiologia.

Orientador: Prof.Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

Co-Orientadora: Prof.Dra. Ana Durce O. da Paixão

RECIFE

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Cirilo, Marry Aneyts de Santana

O estresse oxidativo renal modula a atividade do transporte tubular de Na⁺ dependente de ATP em um modelo de injúria renal induzido pelo Paraquat / Marry Aneyts de Santana Cirilo. – 2019.

72 f. : il., fig., tab.

Orientador: Lêucio Duarte Vieira Filho

Coorientadora: Ana Durce Oliveira da Paixão

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

Inclui referências.

1. Doença renal aguda 2. Sistema renina- angiotensina 3. Paraquat I. Vieira Filho, Lêucio Duarte (orient.) II. Paixão, Ana Durce Oliveira da (coorient.) III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-072

MARRY ANEYTS DE SANTANA CIRILO

O ESTRESSE OXIDATIVO RENAL MODULA A ATIVIDADE DO
TRANSPORTE TUBULAR DE Na⁺ DEPENDENTE DE ATP EM UM
MODELO DE INJÚRIA RENAL INDUZIDO PELO PARAQUAT

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

Aprovado por:

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho - Orientador

Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão – Co-orientadora

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira – Membro interno

Prof. Dr. Humberto Muzi Filho – Membro externo

Prof. Dr. Edjair Vicente Cabral – Membro externo

Data: 26/02/2019

Com orgulho finalizo essa etapa e a
dedico com muito amor aos meus pais,
Ailton José da Silva Cirilo e Lucineide
de Santana Cirilo e à minha irmã,
Marry Aléxia de Santana Cirilo.
Concretizo essa etapa graças à seus
esforços, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos professores que contribuíram com plena orientação durante todo o processo de trabalho: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho e Prof. Dra. Ana Durce O. Paixão, em especial ao Dr. Leucio, agradeço pela confiança, paciência, ensinamentos e também por ser um exemplo de profissional que busco seguir.

À Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes, aos integrantes do Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo e à Plataforma Multiusuário Em Biologia Celular e Molecular, por todo o apoio na utilização e acesso aos equipamentos Varioskan e Chemidoc.

Aos órgãos de fomento que deram suporte para desenvolvimento do trabalho, Conselho Nacional Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, (474004/2013-9 e (432468/20161) e Fundação do Estado de Pernambuco (FACEPE), Pernambuco, Brasil (APQ-1072-2.07/15).

À toda a equipe do LFQB-UFRJ, em especial ao prof. Dr. Adalberto Vieyra e ao Prof. Dr. Humberto Muzi, pela orientação e contribuição no aperfeiçoamento desse projeto.

A todos os funcionários e professores que fazem parte do programa de Bioquímica e Fisiologia.

A todos os amigos do laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal.

À aluna de iniciação científica que me acompanhou durante todo o processo, Valéria Bianca de Souza Santos por ser meu braço direito e pelos ensinamentos mútuos que temos ao longo de nosso crescimento como futuras pesquisadoras.

A todo o quadro de professores de e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Aos companheiros de turma do mestrado.

Às minhas amigas de laboratório, Fernanda Ribeiro e Natália Santos que fazem meus dias mais alegres.

Às minhas amigas, Aline Barbosa, Débora Ferreira e Natália Menezes por todo amor dedicado à mim.

E à todas as pessoas importantes em minha vida, meus familiares e amigos.

“O conhecimento nunca está acabado. É uma teia que vamos tecendo a partir da superação dos limites”.

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é uma ocorrência clínica causada por perda abrupta da função renal, caracterizada por acúmulo de resíduos metabólicos e pelo comprometimento da homeostasia hidroeletrolítica. A exposição ao paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridil dicloreto) é uma situação que pode induzir o surgimento de LRA. Embora os danos renais dependam da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), as consequências da exposição ao paraquat não estão totalmente elucidadas. Este estudo avaliou se a LRA induzida por paraquat está relacionada a alterações do transporte de Na^+ dependente de ATP e do sistema renina-angiotensina renal, bem como se esses efeitos são dependentes da produção de ROS. Ratos Wistar adultos (300–400 g) foram submetidos à administração intraperitoneal em dose única de paraquat (20 mg/kg, n=15) ou NaCl 0,9% (grupo controle, 1 ml/kg; n=8). Parte do grupo tratado com paraquat recebeu a administração de tempol (10 mg/kg, na água de beber, n=7) durante 7 dias consecutivos antes da administração do paraquat. Nas 24 horas de exposição ao paraquat, observou-se perda de massa corporal e uma pronunciada elevação do fluxo urinário, bem como elevação dos níveis de creatinina sérica. No córtex renal, a exposição ao paraquat induziu aumento da produção de ânion superóxido, da atividade da NADPH oxidase e da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, além do aumento do conteúdo do receptor do tipo 1 da angiotensina II. Na medula renal, o paraquat também aumentou o nível de ânions superóxido e a atividade da NADPH oxidase, mas inibiu a atividade do transportador $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. Essas alterações induzidas pelo paraquat, com exceção da elevação da creatinina sérica, foram prevenidas pelo tratamento com tempol. Em conclusão, a exposição ao paraquat leva a uma perda de líquido por via urinária importante que pode ser consequência de reabsorção de Na^+ prejudicada induzida por ROS, sendo um fator de risco para o colapso vascular e morte prematura. Além disso, o paraquat provoca maior estímulo ao transporte de Na^+ dependente de ATP cortical e aumento da expressão de componentes pró-hipertensivos do sistema renina-angiotensina que agiriam como mecanismo compensatório agudo, porém poderiam posteriormente exacerbar a lesão renal.

Palavras-chave: Doença renal aguda. Espécies reativas do oxigênio. Paraquat. Transporte de Na^+ dependente de ATP. Sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

Acute renal injury (AKI) is a clinical problem caused by abrupt loss of renal function characterized by accumulation of metabolic residues and by impairment of hydroelectrolytic homeostasis. Exposure to paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridyl dichloride) is a situation that can induce the occurrence of AKI. Although renal damage depends on the production of reactive oxygen species (ROS), the consequences of exposure to paraquat are not entirely elucidated. This study evaluated whether paraquat-induced AKI is related to alterations in ATP-dependent Na^+ and renal renin-angiotensin transport, as well as whether these effects are dependent on ROS production. Adult Wistar rats (300-400 g) were administered intraperitoneally in a single dose of paraquat (20 mg / kg, n = 15) or 0.9% NaCl (control group, 1 ml / kg; n = 8). Part of the paraquat group received administration of tempol (10 mg / kg in drinking water, n = 7) for 7 consecutive days prior to the administration of paraquat. At 24 hours of exposure to paraquat, there was loss of body mass and a pronounced increase in urinary flow, as well as elevation of serum creatinine levels. In the renal cortex, the exposure to paraquat induced an increase in superoxide anion production, NADPH oxidase activity and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase activity, as well as the upregulation of angiotensin II type 1 receptor. In the renal medulla, paraquat also increased the level of superoxide anions and the activity of NADPH oxidase, but inhibited the activity of the transporter $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase. These changes induced by paraquat, with the exception of elevated serum creatinine, were prevented by treatment with tempol. In conclusion, exposure to paraquat leads to significant urinary fluid loss that may be a consequence of ROS induced impaired Na^+ reabsorption, being a risk factor for vascular collapse and premature death. In addition, paraquat causes greater stimulation of cortical ATP-dependent Na^+ transport and increased expression of pro-hypertensive components of RAS that would act as an acute compensatory mechanism, but, after, could exacerbate renal injury.

Keywords: Acute kidney disease. Reactive oxygen species. Paraquat. ATP-dependent Na^+ transport. Renin-angiotensin system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etiologia da lesão renal aguda (LRA), Makris, Spanou, 2016.....	16
Figura 2. Transporte tubular na IRA. TGF: taxa de filtração glomerular; Pbow: Pressão hidrostática na cápsula de Bowman; MD: Mácula densa.....	17
Figura 3. Mudanças tubulares verificada na lesão tubular aguda. Adaptado de Lamire et al., 2005.	18
Figura 4. Toxicidade bioquímica do paraquat. Tirado de Bus, Aust, Gibson, 1975.	21
Figura 5. Esquema da via clássica de atividade do sistema renina-angiotensina (SRA). (Lima, 2011).	26
Figura 6. Remodelamento vascular promovido a partir do estímulo da AII sobre o AT1R e vias redox (Cat et al., 2013).	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Angiotensina II	Ang II
Angiotensina 1-7	Ang 1-7
Anión superóxido	O ₂ ^{-•}
Adenosina trifosfato	ATP
Adenosina monofosfato cíclico	AMPC
Balanço hídrico	BH
Catalase	CAT
Creatinina	Cr
Cecal ligation and puncture	CLP
Cobre	Cu ²⁺
Enzima conversora de angiotensina 1	ECA1
Enzima conversora de angiotensina 2	ECA2
Estresse oxidativo	EO
Espécies reativas ao oxigênio	ROS
Ferro férrico	Fe ³⁺
Glutathione peroxidase	GPx
Hidroxila	OH [•]
Insuficiência renal aguda	IRA
Lesão renal aguda	LRA
Lesão tubular aguda	LTA
Mácula densa	MD
Necrose tubular aguda	NTA
Paraquat	PQ
Potássio	K ⁺
Pressão hidrostática na cápsula de Bowman	P _{bow}
Receptor de angiotensina do tipo 1	AT1R
Receptor de angiotensina do tipo 2	AT2R
Radicais livres	RL
Sistema renina angiotensina	SRA
Sódio	Na ⁺

Superóxido desmutase	SOD
Taxa de filtração glomerular	TGF
Terapia de substituição renal	TSR
Unidade de terapia intensiva	UTI
Ureia	Ur

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo geral.....	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1	LESÃO RENAL AGUDA	15
2.2	LESÃO TUBULAR AGUDA.....	17
2.3	MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO RENAL AGUDA	19
2.4	PARAQUAT COMO INDUTOR DE LESÃO RENAL AGUDA	20
2.5	TRANSPORTE RENAL DE SÓDIO	23
2.6	SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	25
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.7.1	Estresse oxidativo, transporte de sódio e SRA.....	28
2.7.2	O antioxidante tempol	30
3	JUSTIFICATIVA.....	32
4	MANUSCRITO	33
4.1	Tempol protects paraquat-induced changes in renal ATP-dependent Na ⁺ transport and renin-angiotensin system components.....	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência renal aguda (IRA) é caracterizada pelo acúmulo de compostos nitrogenados na circulação sanguínea, desequilíbrio hidroeletrolítico e perda da homeostasia acidobásica, como consequência da perda da função renal (SINGH *et al*, 2012; TOGEL & WESTENFELDER, 2014). Em um quadro de injúria mais leve podemos não observar a insuficiência renal estabelecida, ainda assim, pode haver quadro de lesão renal aguda (LRA) (LAFRANCE *et al*, 2010). A LRA é responsável por 8 a 16% dos internamentos hospitalares e sua prevalência fica em torno de 60% dos casos em unidades de terapia intensiva (ANDREOLI, 2009; KELLY, 2009). O desenvolvimento de LRA é multifatorial, entretanto a maioria dos casos de IRA (insuficiência renal aguda) ocorrem devido a lesão tubular aguda (LTA), sendo as de etiologia nefrotóxica muito frequentes (PINTO *et al*, 2009).

O túbulo proximal é particularmente sensível à LTA, em virtude de sua elevada taxa metabólica, e sua disfunção apresenta um impacto elevado pelo fato de ser o segmento tubular responsável pela maior fração de reabsorção do fluido filtrado (LI & ZHUO, 2016). Nesse segmento, o transporte de Na^+ é dependente do seu gradiente de concentração gerado pelo transporte ativo primário basolateral, mediado pela $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{ATPase}$ sensível à ouabaína (FERRAILLE & DOUCET, 2001) e pela $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ sensível à furosemida (ROCAFULL *et al*, 2011). A $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{ATPase}$ é considerada o principal transportador renal de Na^+ , enquanto que a $\text{Na}^+-\text{ATPase}$, que é expressa no túbulo proximal renal, tem sido correlacionada com o ajuste fino do transporte desse cátion (LIU *et al*, 2015; VIEYRA *et al*, 2016). Quando ocorre dano ao túbulo proximal, há mudança na polaridade celular levando a inserção de transportadores basolaterais, como a $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{ATPase}$, para a região apical (Lameire *et al*, 2005), necrose tubular e diminuição da taxa de filtração glomerular (HAVASI & BORKAN, 2011).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um mediador chave da função das ATPases transportadoras de Na^+ , principalmente via angiotensina II (WANG *et al*, 2012; VIEYRA *et al*, 2016). Esse peptídeo regula a atividades das ATPases transportadoras de sódio de maneira estimulatória, via receptor AT_1 (AT_1R), e de maneira inibitória, via receptor AT_2 (AT_2R) (GARRIDO-GIL *et al*, 2017). O AT_1R é também é um potencial promotor da progressão da lesão renal, pois medeia a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) por estimulação da NADPH oxidase,

que também estimula positivamente o SRA (VAJAPEY *et al*, 2014; ZHAO *et al*, 2008; AHMADIAN *et al*, 2016; HEZEL *et al*, 2016).

As ROS também são capazes de influenciar as ATPases transportadoras de Na^+ . É descrito que a atividade $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ é inibida pelas ROS (KURELLA *et al*, 1997; FIGTREE *et al*, 2009), enquanto que a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ se mostra estimulada (BELTOWSKI *et al*, 2007). As ROS também desempenham papel importante na fisiopatologia da LRA, que podem envolver alterações do parênquima renal em parte através da estimulação de vias inflamatórias (ZHAO *et al*, 2008; QUOILIN *et al*, 2014).

A intoxicação por paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto 1,1'-dimetil-4,4'-dicloreto bipidilo, PQ) pode culminar em LRA (GU *et al*, 2016), contudo os mecanismos moleculares ainda não são completamente elucidados, mas é clara a participação das ROS (GU *et al*, 2016). O acúmulo de PQ nas células tubulares renais ativa um ciclo oxiredução, com subsequente aumento na formação de ROS e injúria do túbulo renal proximal, que tende a ser agravada conforme há o seu acúmulo devido a progressão da falência renal (LIU *et al*, 2015).

Com base nesses dados, é possível que haja importantes alterações no transporte de Na^+ dependente de ATP no túbulo renal, bem como na expressão de componentes do SRA intra-renal, que contribuam para a fisiopatologia da LRA induzida pelo estresse oxidativo mediado pelo PQ. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do PQ na atividade das ATPases transportadoras de Na^+ renais e na expressão de componentes do SRA intra-renal, além de investigar se esses efeitos são dependentes da produção de ROS.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento do estresse oxidativo em mudanças no transporte de Na^+ do epitélio tubular e sua regulação em um modelo de lesão renal aguda induzida pela administração de paraquat em ratos.

1.1.2 Objetivos específicos

Avaliar em ratos submetidos lesão renal aguda por intoxicação com paraquat, sob presença ou ausência de tratamento com tempol:

- i) Pressão arterial sistólica;
- ii) Marcadores de função renal e hepática;
- iii) Produção renal de espécies reativas do oxigênio;
- iv) Atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase sensível à ouabaína em frações de membrana do túbulo proximal e medula renal;
- v) Atividade da Na^+ -ATPase sensível a furosemida em frações de membrana do túbulo proximal e medula renal;
- vi) Modulação das ATPases transportadoras de sódio pela angiotensina II;
- vii) Expressão proteica do receptor AT_1 e AT_2 da angiotensina II, das isoformas 1 e 2 da enzima conversora de angiotensina, da renina e pró-renina, do angiotensinogênio, da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, das isoformas 2 e 4 da NADPH oxidase, das kinases envolvidas no processo de sinalização celular, $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\lambda$, $\text{PKC}\zeta$, $\text{PKC}\epsilon$ e PKA.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LESÃO RENAL AGUDA

A lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome clínica caracterizada por diminuição abrupta na taxa de filtração glomerular (TFG), concomitante a um aumento nas concentrações séricas de creatinina e ureia (STEVENS & LEVEY, 2005; ANDREOLI, 2009; SILVA & YU, 2009; MAKRIS & SPANOU, 2016). Por muito tempo, quadros de LRA foram referenciados pelo termo insuficiência renal aguda (IRA), contudo pequenas mudanças no débito urinário ou na concentração de creatinina sérica, podem ser importantes preditores de mortalidade (LEVY *et al*, 1996; HOSTE *et al*, 2006). Dessa forma, atualmente, o termo IRA é restrito a pacientes que apresentam LRA e necessitam de terapia de substituição renal (MAKRIS & SPANOU, 2016). De qualquer forma, é importante ressaltar que casos de LRA podem evoluir para IRA (MAKRIS & SPANOU, 2016).

A LRA é uma complicação comum e de alta incidência, principalmente no ambiente hospitalar, sendo responsável por 8-16% das causas de internamento, além disso, sua incidência fica em torno de 40-60% em pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI) (ANDREOLI, 2009; KELLY, 2006). Apesar dos avanços terapêuticos, pacientes acometidos pela LRA apresentam taxa de risco de mortalidade relativamente alta, em torno de 50% (SIROTA, KLAWITTER, EDELSTEIN, 2011). Um estudo com pacientes críticos verificou que quando eles desenvolvem IRA, o risco de mortalidade é superior a 60% dos casos (METNITZ *et al*, 2002). Além da LRA impactar com o aumento no risco de morbi-mortalidade de um indivíduo, ela também tem um enorme impacto financeiro à sociedade devido ao seu alto custo de tratamento (REWA, BAGSHAW, 2014).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, a LRA pode ser classificada, de acordo com sua etiologia, em pré-renal, renal ou intrínseca e pós-renal (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007). A LRA intrínseca é caracterizada por danos diretos e primários às estruturas dos túbulos, glomérulo, interstício e vasos sanguíneos renais, como nos casos induzidos por sepse, substâncias nefrotóxicas e glomerulopatias auto-imunes (BELLOMO *et al*, 2004; MAKRIS, SPANOU, 2016, Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007). Por outro lado, a LRA pré e pós renais são caracterizadas por diminuição da taxa de filtração glomerular secundárias a outras condições patológicas extra-renais (BELLOMO *et al*, 2004). Um exemplo clássico de causa de LRA pré-renal

é a diminuição do fluxo sanguíneo renal causada pelo choque hipovolêmico, enquanto que a obstrução do fluxo do trato urinário representa uma situação típica de LRA pós-renal, onde ocorre aumento da pressão hidrostática intratubular, com consequente diminuição da TFG (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007). Portanto, a LRA é uma situação grave e de etiologia multifatorial (ANDREOLI, 2009). Na Figura 1, o organograma traz a etiologia da LRA.

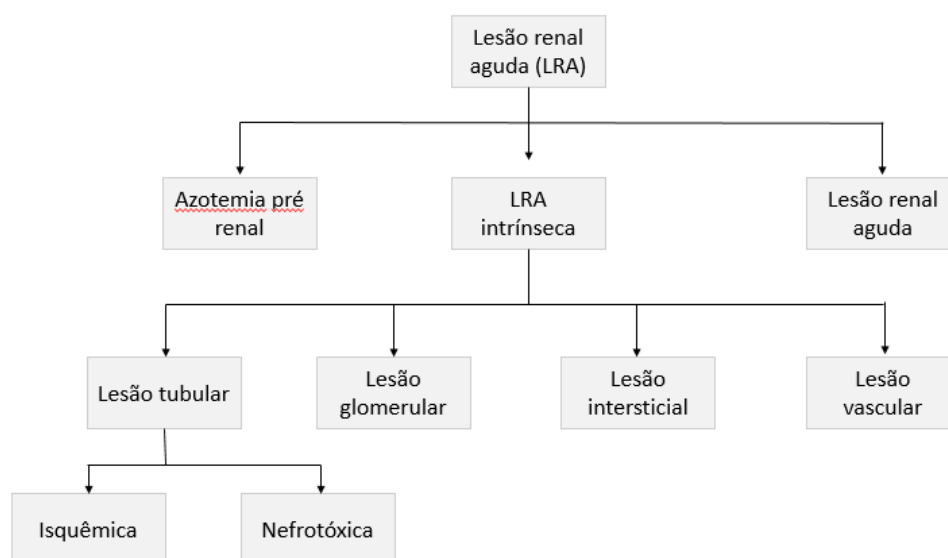


Figura 1. Etiologia da lesão renal aguda (LRA), Makris, Spanou, 2016.

A causa mais comum de LRA é a isquemia renal (MAKRIS, SPANOU, 2016). Em regiões urbanas de países em desenvolvimento, é comum que a maioria das causas de LRA tenha origem no ambiente hospitalar, a partir da isquemia renal, sepse ou uso de drogas nefrotóxicas, enquanto que, em regiões rurais, as causas mais comuns decorrem de doenças comunitárias, como em choques hipovolêmicos secundários à diarreia e desidratação, ou por doenças infecciosas (LAMIRE *et al*, 2013).

2.2 LESÃO TUBULAR AGUDA

A lesão tubular aguda (LTA) ou necrose tubular aguda (NTA) é o tipo mais frequente de LRA por causas intrínsecas (MOECKEL, 2018). É um termo usado para se referir à LRA intrínseca gerada como resultado dos danos aos túbulos renais, sejam por lesão isquêmica, nefrotóxica, inflamatória ou obstrutiva (MOECKEL, 2018; MAKRIS & SPANOU, 2016; LAMEIRE, VAN BIESEN, VANHOLDER, 2006; CHOUDHURY & AHMED, 2006). A maioria dos casos de IRA são consequência de casos de LTA (MOECKEL, 2018), sendo que pelo menos 75% são atribuídos à origem isquêmica (LAMEIRE, VAN BIESEN, VANHOLDER, 2006), enquanto que, cerca de 20% são causados por nefrotóxicos (CHOUDHURY & AHMED, 2005).

Apesar da LTA não envolver alterações primárias da função glomerular, as alterações tubulares podem repercutir na TFG (MOECKEL, 2018). A lesão tubular pode levar à diminuição da TFG por mecanismos vasculares e tubulares. O mecanismo vascular parece depender da diminuição da reabsorção proximal de sódio, que pode induzir um aumento do aporte distal do eletrólito na mácula densa e ativação do mecanismo de feedback tubuloglomerular, levando a vasoconstrição aferente e diminuição da TFG (LAMEIRE *et al*, 2005), Figura 2.

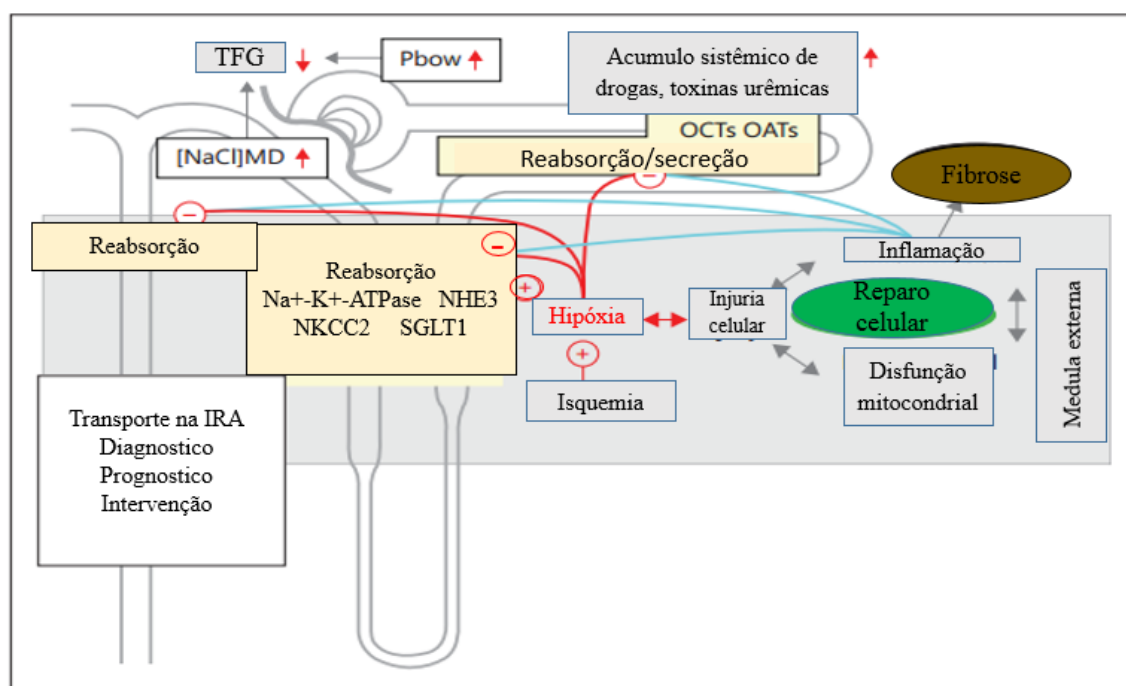


Figura 2. Transporte tubular na IRA. TGF: taxa de filtração glomerular; P_{bow}: Pressão hidrostática na cápsula de Bowman; MD: Mácula densa; OCTs e OATs: transporte de cátions e ânions orgânicos.. Adaptada de Valon, 2016.

O outro mecanismo de redução da TFG envolve a morte de células epiteliais, por apoptose ou necrose, e um consequente difusão não controlada de água, íons e macromoléculas, promovendo aumento do retrovazamento tubular (LAMEIRE *et al*, 2005). Além disso, as células mortas e outros resquícios celulares também podem obstruir as vias tubulares, causando aumento da pressão intratubular a níveis inconsistentes com o processo de filtração, piorando a necrose tubular e diminuindo a TFG (HAVASI & BORKAN, 2011) (Figura 3). Além disso, essas alterações estão relacionadas ao aumento da inflamação intersticial que pode piorar o quadro de lesão tubular (LAMEIRE *et al*, 2005).

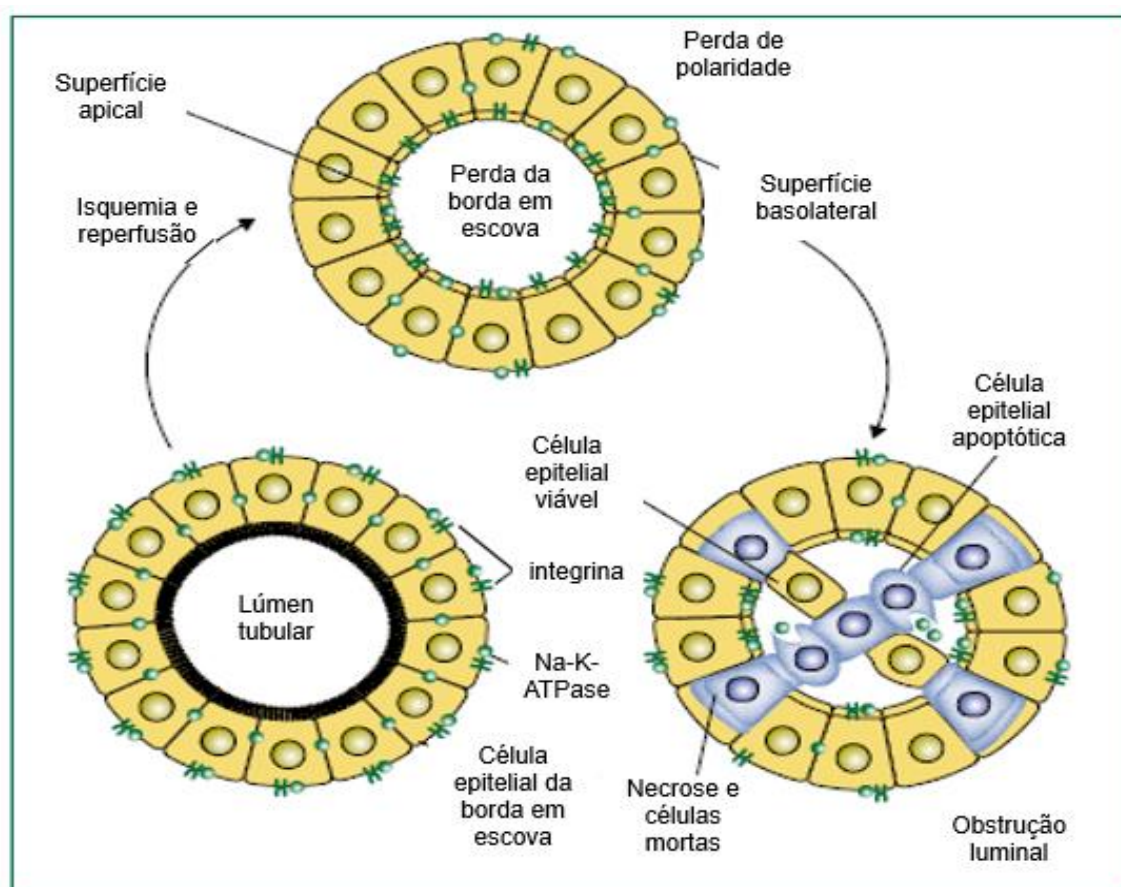


Figura 3. Mudanças tubulares verificada na lesão tubular aguda. Adaptado de Lamire *et al.*, 2005.

A lesão tubular afeta os segmentos tubulares de forma heterogênea, principalmente de acordo com a etiologia da LRA. Na forma isquêmica, a lesão tubular é desigual, afetando pequenos trechos no túbulo reto proximal e no ramo ascendente da alça de Henle, enquanto que na LRA causada por nefrotóxicos, a lesão tubular se dá de maneira contínua ao longo de todo o túbulo proximal (MOECKEL, 2018). Nos modelos de lesão tubular induzida por isquemia ou nefrotóxicos, o mecanismo de autofagia celular

é crucial para promover proteção e proliferação celular, possibilitando que boa parte das células lesadas possam ser substituídas por uma extensa proliferação de células vizinhas (LIVINGSTON & DONG, 2014; SUZUKI *et al*, 2008; JIANG *et al.*, 2012; HUMPHREYS *et al*, 2008).

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO RENAL AGUDA

O uso de modelos animais é essencial para compreendermos as características fisiopatológicas da LRA, afim de que eles forneçam subsídio para o desenvolvimento de uma terapia eficaz e oriente quanto ao manejo ideal (SINGH *et al*, 2012). Apesar de grande parte dos conhecimentos acerca da fisiopatologia da LRA terem sido obtidos a partir de observações com modelos animais, eles não refletem completamente a realidade encontrada na clínica (TOGEL & WESTENFELDER, 2014). Em geral, nos modelos experimentais de LRA são usados animais jovens e saudáveis onde a indução é monocausal, enquanto que na clínica, boa parte das pessoas afetadas possuem idade elevada e várias comorbidades associadas, como a diabetes e a hipertensão, além de uma etiologia multifatorial (WANG, BONVENTRE, PARRISH, 2014; TOGEL & WESTENFELDER, 2014; BASILE & ANDERSON, 2012).

Em pesquisas que utilizam animais, o modelo de isquemia-reperfusão renal é o mais usado, contudo os modelos de LRA por administração de nefrotóxicos e por indução de sepse também são importantes (SINGH *et al*, 2012). A isquemia-reperfusão renal reproduz alterações de instabilidade hemodinâmica e diminuição da perfusão renal encontrada em diversas situações clínicas (SINGH *et al*, 2012). A indução de sepse pode ser realizada através da administração de LPS (lipopolissacarídeo) ou pela ligadura e punção cecal (CLP, *cecal ligation and puncture*), reproduzindo o quadro de LRA causada por infecção, que tem prevalência de cerca de 35-50% nos casos de NTA nos pacientes em estado grave (SINGH *et al*, 2012; HOSTE *et al*, 2003).

A indução de LRA também pode ser realizada pela administração de substâncias nefrotóxicas. A administração de glicerol simula a lesão renal gerada pela rabdomiólise, tendo em vista que 10-50% desses pacientes desenvolvem LRA (SINGH *et al*, 2012). A administração de S-(1,2-diclorovinil)-L-cisteína simula a disfunção observada em casos de toxicidade por água contaminada. Por outro lado, cerca de 20% dos casos de LRA são induzidos por drogas com potencial nefrotóxico (PERES, JUNIOR CUNHA, 2013). Dessa forma, o uso de algumas drogas em modelos animais são capazes de mimetizar a lesão oriunda de seu uso cíclico na clínica, como o antibiótico gentamicina, o

antineoplásico cisplatina e os AINES (anti-inflamatórios não-esteroidais) (SINGH *et al.*, 2012). Contudo é importante ressaltar que grande parte das lesões tubulares induzidas por nefrotoxicidade são reversíveis, e quando a medicação é suspensa, os rins tendem a retomar sua função normal (CHOUDHURY & AHMED, 2005).

2.4 PARAQUAT COMO INDUTOR DE LESÃO RENAL AGUDA

O paraquat (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio; PQ) é um herbicida do tipo quaternário, não seletivo, com propriedade desfolhante e dessecante. Tem sido bastante utilizado na agricultura em países em desenvolvimento devido seu baixo custo (WESSELING *et al.*, 2001; GAWARAMMANA & BUCKLEY, 2011). Em plantas ele interrompe a fotossíntese a partir da inibição da cadeia transportadora de elétrons. Ao ambiente ele apresenta uma toxicidade razoavelmente baixa, devido sua inativação quando em contato com o solo (ERICKSON *et al.*, 1997). Entretanto ao ser humano ele é altamente tóxico, e o risco de mortalidade mediante a sua exposição é relativamente alto, em torno de 35 a 50% (PAVAN, 2013). Seu envenenamento é um dos mais fatais no mundo (AGARWAL *et al.*, 2006), podendo atingir vários órgãos e sistemas, como o respiratório, digestório, cardiovascular, nervoso e renal (SEOK *et al.*, 2009).

A mortalidade precoce por intoxicação de PQ ocorre como resultado de choque hipovolêmico, enquanto que a mortalidade tardia é principalmente induzida por disfunção pulmonar (WUNNAPUCK *et al.*, 2013). Após a ingestão, o PQ é rapidamente distribuído pelo organismo, especialmente no rim, pulmão e fígado (SEOK *et al.*, 2009). A letalidade da intoxicação por PQ é altamente dependente do grau de deterioração da função renal e hepática, assim como o grau de desequilíbrio ácido-básico. Apesar do PQ ser considerado um potente agente nefrotóxico e hepatóxico, sua hepatotoxicidade é fraca em ratos (HONG *et al.*, 2016).

Apesar de não ser completamente elucidado seu mecanismo de ação, sabe-se que o PQ eleva a produção de ROS, mediante sua participação em ciclos redox da mitocôndria, promovendo o quadro de estresse oxidativo (PETER *et al.*, 1992). Inicialmente, ele se comporta como substrato para a enzima NADPH-oxidase, sendo reduzido e gerando anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), juntamente com o consumo do NADPH. O PQ reduzido facilmente se auto-oxida, produzindo mais ROS e regenerando o PQ, permitindo que o ciclo de produção de ROS ocorra repetidamente (PETER *et al.*, 1992). O $O_2^{\cdot-}$ pode ser detoxificado pela enzima superóxido dismutase (SOD) produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é sequencialmente removido pela catalase. Entretanto

em altas concentrações de PQ, a SOD é suprimida e os radicais $O_2^{\cdot-}$ sofrem dismutação formando o oxigênio *singlete* que causam peroxidação lipídica (PETER *et al*, 1992; SUNTRES, 2002) (Figura 4).

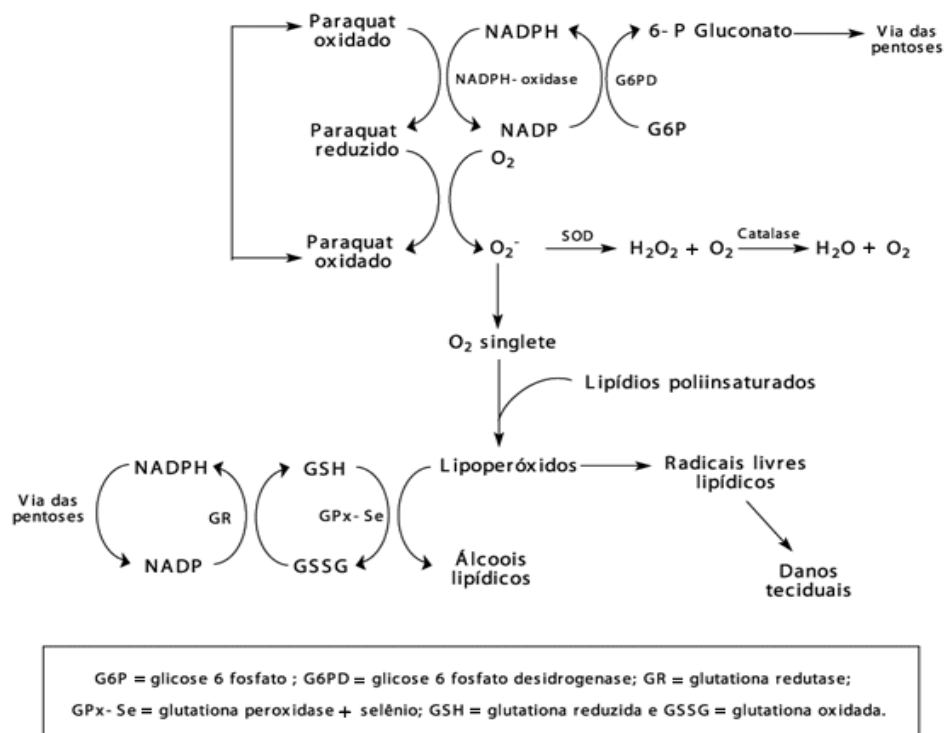


Figura 4. Toxicidade bioquímica do paraquat. Tirado de Bus, Aust, Gibson, 1975.

Por outro lado, a exposição ao PQ também ativa mecanismos protetores antioxidantes. Tomita *et al.* (2006) demonstraram que o PQ estimula a expressão gênica da metalotioneína-1 e da heme oxigenase-1, cujas propriedades lhes conferem ações antioxidantes. Entretanto, essa estimulação não persiste até 24 horas pós administração do PQ, o que pode explicar a capacidade da substância induzir lesão tecidual (TOMITA *et al*, 2006).

Particularmente, o desenvolvimento de LRA é um dos primeiros efeitos sistêmicos observados na intoxicação pelo PQ, e a consequente diminuição na sua depuração renal pode levar a maior toxicidade sistêmica, que pode resultar em óbito (WUNNAPUCK *et al*, 2013). Inclusive, estudos clínicos têm designado a lesão renal como um fator de risco para a letalidade por envenenamento de indivíduos por PQ. A LRA está correlacionada com diminuição de 10 a 20 vezes da depuração de PQ, e à piora da função pulmonar devido ao seu acúmulo no pulmão (BISMUTH *et al*, 1982;

BISMUTH *et al*, 1990). Dessa forma, a manutenção da função renal é uma estratégia terapêutica fundamental para manutenção da sobrevivência e melhor prognóstico de indivíduos intoxicados por PQ (SAMAI *et al*, 2007).

A partir de 3 horas de intoxicação, o PQ tende a se concentrar no rim, se acumulando no interior das células tubulares proximais (SEOK *et al*, 2009, MOLCK & FRIIS, 1997). Dessa forma, o PQ pode levar ao desenvolvimento de IRA oligúrica e não-oligúrica por LTA induzida por necrose e disfunção tubular (Miller *et al*, 1980). O PQ provoca degeneração tubular, com consequente vacuolização citoplasmática e obstrução dos vasos intra-renais, além de induzir processo inflamatório com subsequente infiltração leucocitária, caracterizando o quadro de lesão tubular (WESSELING *et al*, 2001; WILKS *et al*, 2008; SEOK *et al*, 2009).

A singular vulnerabilidade do túbulo proximal à lesão induzida por PQ pode ser explicada por diversos fatores. Primeiramente, o rim apresenta, de forma geral, uma elevada sensibilidade a substâncias tóxicas, em virtude de receber uma elevada parcela do débito cardíaco (VAN VLEET & SCHNELLMAN, 2003), e a perfusão renal é maior na região cortical, que apresenta uma elevada população de células do túbulo proximal (GEORGE *et al*, 2017). Além disso, em virtude da elevada perfusão sanguínea, o túbulo proximal recebe um maior aporte de oxigênio do que outros segmentos tubulares, e a combinação de altas concentração de oxigênio e PQ leva a uma maior produção de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 (VAN VLEET & SCHNELLMAN, 2003).

Adicionalmente, a susceptibilidade do túbulo proximal ao PQ pode decorrer da presença de diversos transportadores de solutos orgânicos. Em células LLC-PK1, uma linhagem de células do túbulo proximal, foi observado um elevado transporte ativo do PQ para o meio intracelular (CHAN *et al*, 1996). Além disso, já foi demonstrado em células do túbulo proximal de babuínos que o aporte celular do PQ no túbulo proximal é mediado por transportadores de cátions orgânicos polivalentes, uma vez que o PQ se apresenta como um cátion divalente em solução aquosa (VAN VLEET & SCHNELLMAN, 2003). Por esse mecanismo de transporte, o PQ sofre secreção tubular proximal, o que aumenta sua depuração no início do envenenamento, mas torna o segmento mais concentrado na substância e mais propício a sofrer lesão.

Por conta da lesão tubular proximal, é possível que haja diminuição da reabsorção tubular de Na^+ . A excreção fracionada de sódio, excedendo em mais de 40% da carga

filtrada, já foi reportada em um estudo de caso em dois pacientes intoxicados pelo PQ (VAZIRI *et al*, 2009). A diminuição da reabsorção proximal de Na^+ induzida pelo PQ pode decorrer, parcialmente, por inibição da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, por inibição direta da enzima, diminuição da permeabilidade da membrana plasmática ao Na^+ ou ainda por disfunção mitocondrial (MOLCK & FRIIS, 1997).

A peroxidação lipídica induzida pelo PQ no túbulo proximal leva a perda de integridade de membrana e morte celular (BRAMBILA *et al*, 2002). Além disso, já foi demonstrado que a ação tóxica do PQ é mediada parcialmente pela estimulação de vias pró-apoptóticas. A exposição de células HK-2, células do túbulo proximal humano, ao PQ leva a apoptose por ativação de múltiplos mecanismos mediados por caspase e pela via intrínseca mitocondrial (YOON *et al*, 2011).

2.5 TRANSPORTE RENAL DE SÓDIO

Os rins desempenham papel chave na manutenção do balanço eletrolítico e sobre o volume do fluido corporal, e consequentemente impacta na manutenção da pressão sanguínea a níveis normotensos (CARLSTROM *et al*, 2013). A retenção de Na^+ pode gerar um quadro de expansão do volume extracelular, entretanto os rins desempenham respostas fisiológicas capazes de manter os compartimentos fluidos do organismo em equilíbrio, através da regulação dos processos de filtração glomerular e reabsorção tubular (FRISOLI *et al*, 2012).

O rim filtra grande quantidade de sódio (Na^+) através do glomérulo, excretando apenas uma pequena fração desse íon no volume urinário final (PALMER & SCHNERMANN, 2015). Os segmentos tubulares desempenham funções distintas na reabsorção de Na^+ filtrado (PALMER & SCHNERMANN, 2015). É relevante mencionarmos que, em condições fisiológicas, o túbulo proximal realiza a reabsorção massiva do Na^+ e de água do filtrado glomerular, enquanto que os segmentos distais, principalmente o ducto coletor, realizam o ajuste fino da excreção do eletrólito, principalmente sob ação da aldosterona, bem como são capazes de realizar sua reabsorção de forma separada da água (LI & ZHUO, 2016; FERRAILE & DIZIN, 2016; PALMER & SCHNERMANN, 2015).

O transporte tubular ativo secundário é dependente do gradiente de concentração de Na^+ gerado pelos transportadores basolaterais de Na^+ , como a proteína $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ sensível à ouabaína (FERRAILE & DOUCET, 2001) e a $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ sensível a furosemida (ROCAFULL *et al*, 2011). O transporte tubular de Na^+ ocorre

através de dois processos importante, inicialmente a proteína ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase causa extrusão intracelular de Na^+ para o compartimento de líquido intersticial peritubular, através da membrana basolateral, gerando energia suficiente permitindo sequencialmente a passagem de Na^+ para o interior da célula através de cotransportadores e canais de sódio expressos na membrana apical (FERRAILE & DOUCET, 2001). Assim, o gradiente de concentração de Na^+ gerado ocorre contra um potencial elétrico transtubular, sendo o lumen tubular proximal, por exemplo, 20 mV negativo em comparação aos líquidos intersticial e peritubular (WHINTTEMBURY & WHINDHAGER, 1961).

A proteína ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase foi descrita primeiramente no ano de 1957 como responsável por mover íons de potássio e sódio através da membrana celular, contra um gradiente de concentração à custa da hidrólise ATP (INGBAR & WENDT, 1997). A ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase é uma proteína presente na membrana basolateral do túbulo em diferentes segmentos tubulares (FERRAILE & DOUCET, 2001) e fica estritamente cercada por mitocôndrias (GARG, KNEPPER, BURG, 1981). Essa proteína possui três subunidades funcionais. A subunidade α , desempenha funções enzimáticas e de transporte, enquanto que a subunidade β possui sua funcionalidade associada a subunidade α , atuando na síntese de novas subunidades α . Mediante a atividade das subunidades α e β esta proteína consegue desempenhar sua função de bombeamento de íons (WU *et al*, 2013). Ainda há a subunidade γ (FÉRAILLE & DOUCET, 2001), cuja função não é bem compreendida, mas aparentemente ela interage com o complexo α e β , modulando a ação dessas subunidades na ativação do transporte de Na^+ e K^+ (BEGUIN *et al*, 1997).

No túbulo proximal, adicionalmente, há descrição da participação de um segundo transportador de Na^+ dependente de ATP na formação do gradiente transcelular de Na^+ , a Na^+ -ATPase (LARA *et al*, 2008). Ela foi descoberta cerca de 50 anos atrás e é responsável pela extrusão ativa de íons de Na^+ acoplado ao Cl^- do meio intracelular para o meio extracelular sem alterar o potencial de membrana (VIEYRA *et al*, 2016). A Na^+ -ATPase tem sido descrita como regulador fino da reabsorção de Na^+ no segmento proximal (LARA *et al*, 2008; VIEYRA *et al*, 2016).

Diversos sistemas estão envolvidos no controle da reabsorção de Na^+ no túbulo proximal mediante a modulação da atividade das ATPases. A angiotensina II (Ang II) apresenta particular importância, em virtude de ser o principal modulador da reabsorção tubular nesse segmento (LI & ZHUO, 2016). Apesar de exercer sua função através de mediadores intracelulares distintos, a Ang II regula as ATPases de maneira similar,

estimulando a atividade em baixas concentrações, via receptor de angiotensina do tipo 1 (AT₁R) e inibindo a atividade em altas concentrações, via receptor de angiotensina do tipo 2 (AT₂R) (FERRAILE & DOUCET, 2001; VIEYRA *et al*, 2016).

2.6 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Classicamente o sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha importante função sobre o controle da pressão arterial sanguínea (PAS) e manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico (KOBORI *et al*, 2007), agindo de maneira endócrina, parácrina ou autócrina (SANJULIANI *et al*, 2011). Sua via clássica de atuação depende primariamente da ação da renina circulante proveniente da secreção renal. A renina é uma enzima que cliva o angiotensinogênio plasmático, produzido pelo fígado, gerando um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I (Ang I), que por sua vez, é convertida à angiotensina II (Ang II) pela ação da isoforma 1 da enzima conversora de angiotensina (ECA1) (SANJULIANI *et al*, 2011). A Ang II é o principal componente do sistema responsável pelo controle da função celular dos órgãos-alvo (GARRIDO-GIL *et al*, 2017).

A sinalização da Ang II nas células-alvo é dependente da ligação do peptídeo a dois receptores transmembrana acoplados à proteína G, o AT₁R e o AT₂R (ABDALLA *et al*, 2001). Os efeitos mais comuns relacionadas a sinalização da Ang II via AT₁R, envolvem respostas celulares que levam à vasoconstricção, retenção de Na⁺, proliferação celular, bem como secreção de aldosterona e hormônio antidiurético (BANDAY & LOKHANDWALA, 2008; FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008). Além disso, a ativação do AT₁R está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da ativação da enzima NADPH oxidase (YAMAGASHI *et al*, 2012) e na ativação de vias inflamatórias (HAMMER *et al*, 2016). Contudo, apesar de menos elucidado, já é bem documentado que a atividade do AT₂R gera efeitos antagônicos aos mediados pelo AT₁R (ABDALLA *et al*, 2001). Exercendo atividade anti-hipertensiva, vasorelaxadora e natriurética (VAJAPEY *et al*, 2014), além de exercer atividade protetora à situação de lesão tecidual, mediante função antioxidante e de proteção mitocondrial, devido seu potencial efeito anti-inflamatório, anti-proliferativo e anti-apoptótico (ABADIR, 2011; FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008).

À ligação da Ang II ao receptor AT₁R, leva à ativação de algumas vias de sinalização intracelulares mediadas por proteína G_i, G_s e fosfolipase C (PLC), causando elevação na concentração de Ca⁺ citosólico e consequente ativação da proteína cinase C (PKC) e da calmodulina (LEFKOWITZ & SHENOY, 2005). Por outro lado, a interação

da Ang II com o AT₂R, leva aumento nas concentrações de bradicinina, além de ativação de vias do óxido nítrico (ON), resultando em vasodilatação e natriurese. A via do AT₂R está ligada à ativação da proteína fosfolipase A₂ (PLA₂), para síntese de ácido araquidônico (AA) e adenilil ciclase (AC) para síntese de AMPc com consequente ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PADIA *et al*, 2006).

Além do maior conhecimento dos efeitos do AT₂R, atualmente, possuímos uma visão mais ampla e profunda do SRA, principalmente em virtude da descoberta da isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina (ECA2) (SANJULIANI *et al*, 2011). A ECA2 é uma peptidase que tem a Ang I ou Ang II como substrato, e sua ação induz a formação de Ang 1-7, um peptídeo que regula a função celular através de ligação ao seu próprio receptor, o receptor do tipo Mas (MasR) (SANJULIANI *et al*, 2011) (Figura 5).

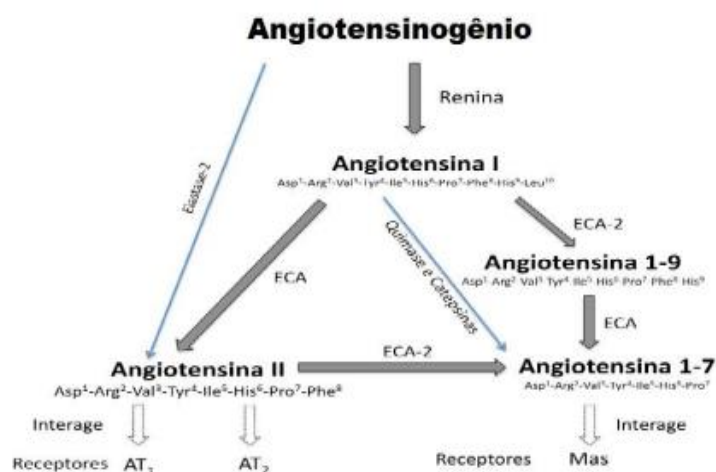


Figura 5. Esquema da via clássica de atividade do sistema renina-angiotensina (SRA). (Lima, 2011).

O receptor do tipo Mas também é uma proteína transmembrana acoplada a uma proteína G, cuja expressão já foi detectada em vários sistemas (SANJULIANI *et al*, 2011). A Ang 1-7, via MasR, pode contrarregular a atividade fisiopatológica da Ang II no sistema cardiovascular, e proteger a hipertensão arterial dependente de Ang II (HAMMER *et al*, 2016). Além disso, é descrito que a Ang 1-7 apresenta efeitos protetores dependentes de ações antioxidante e anti-inflamatória (HAMMER *et al*, 2016). Embora sejam mais numerosos os trabalhos estudando os efeitos da Ang 1-7 e do MasR, outros elementos com função biológica relacionada ao SRA também têm sido descritos, como os peptídeos Ang III e Ang IV e o receptor de (pro)renina (SANJULIANI *et al*, 2011).

Primariamente, as funções do SRA eram atribuídas apenas à atividade da Ang II circulante no plasma sanguíneo, contudo diversos componentes do SRA, ou proteínas com função equivalente, são expressos localmente em vários órgãos e tecidos (SANJULIANI *et al*, 2011). As concentrações de Ang II podem variar bastante entre os diversos tecidos. O SRA tecidual possui importância fisiológica (SANJULIANI *et al*, 2011), contudo, ele também tem sido correlacionado aos mecanismos fisiopatológicos que envolvem quadro de inflamação, proliferação celular e estresse oxidativo (GARRIDO-GIL *et al*, 2017).

2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é decorrente de um desbalanço orgânico entre a produção exacerbada de ROS e a atividade antioxidante ineficiente no meio extra ou intracelular (SHOJI & KOLETZKO, 2007). Esse fenômeno é comum na base fisiopatológica de diversos processos/doenças e seu desenvolvimento está intimamente ligado à interação de ROS com várias biomoléculas, como os lipídios da membrana celular, polissacarídeos, proteínas e o próprio DNA celular (SHOJI & KOLETZKO, 2007) resultando em dano tecidual (PETER *et al*, 1992; SUNTRES, 2002).

A principal via do metabolismo do oxigênio (O_2) no organismo ocorre no interior de mitocôndrias onde há incorporação de 4 elétrons ao final da cadeia respiratória, resultando em sua completa redução formando uma molécula de água (H_2O). Caso ao longo da cadeia transportadora de elétrons o O_2 seja reduzido com um menor número de elétrons há a produção das ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou como os radicais livres do oxigênio, que são espécies altamente reativas porque possuem um elétron desemparelhado em sua última camada, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e a hidroxila ($OH^{\bullet}$), (DAMASCENO *et al*, 2002; SHOJI & KOLETZKO, 2007).

Apesar da cadeia transportadora de elétrons ser a principal fonte produtora de ROS, células fagocitárias, peroxissomas durante o processo de β -oxidação e ações da enzima citocromo P450, também podem gerar ROS, além dos agentes oxidantes exógenos como o monóxido de carbono (WRIGHT *et al*, 1994). As ROS são produtos comuns do metabolismo fisiológico e desempenham papéis cruciais em muitos processos fisiológicos como no caso da nefrogênese, eritropoiese e inclusive no transporte tubular de sódio (NISTALA *et al*, 2009). Diante da constante exposição dos tecidos às ROS, o organismo desenvolveu várias vias de defesa antioxidante (BIRI *et al*, 2007). Os antioxidantes podem ser de origem enzimática ou não enzimática (ANDRADE JUNIOR

et al, 2005). Dentre as principais enzimas antioxidantes, há a glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (BIRI *et al*, 2007). A SOD age convertendo o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é consequentemente removido pela GPx ou pela CAT (BIRI *et al*, 2007). Dentre os principais antioxidantes não enzimáticos estão: o ácido ascórbico, α -tocoferol, selênio, β -caroteno, a glutathione reduzida (GSH) e algumas proteínas com ação quelante do ferro férrico (Fe^{+3}) e cobre (Cu^{+2}) (ANDRADE JUNIOR *et al*, 2005).

2.7.1 Estresse oxidativo, transporte de sódio e SRA

Desde a década de 90, sabe-se que situações de estresse oxidativo estão relacionadas a mudanças estruturais e funcionais nas células (INGBAR & WENDT, 1997). Além disso, células tubulares do néfron e o processo de transporte de Na^+ também podem sofrer alterações em virtude das ROS (HU *et al*, 1994; KUNIN *et al*, 2012). Em parte, as alterações no transporte de Na^+ tubular se devem a modulação na atividade das ATPases transportadoras de Na^+ (KIM & ROBISION, 1996; YAN *et al*, 2013; BELTOWSKI *et al*, 2007; VIEIRA-FILHO *et al*, 2014)

A ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase tem sua atividade diretamente inibida pelo peroxinitrito e pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KIM & ROBISION, 1996). Em situações de estresse oxidativo, há mudanças secundárias sobre a ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase, como a glutathionização dos resíduos de cisteína das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$, que inibem sua atividade através da estabilização da enzima na conformação *E2-prone* ou através do bloqueio na posição de ligação do ATP (YAN *et al.*, 2016). Adicionalmente, o estresse oxidativo pode impactar negativamente sobre o transporte de Na^+ por estimular a degradação da proteína ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase (YAN *et al.*, 2013). Por outro lado, também existem dados experimentais que correlacionam a elevação do estresse oxidativo com maior atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase. Em ratos idosos, foi descrita maior expressão da subunidade $\alpha 1$ da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase dependente de ROS (SILVA, GOMES, SOARES-DA-SILVA, 2006).

No caso da Na^+ -ATPase, evidências demonstram que o anion superóxido (O^-) é um importante estimulante de sua atividade (BELTOWSKI *et al*, 2007). Dados do nosso laboratório demonstram que a elevação do estresse oxidativo está relacionada com o aumento da atividade da Na^+ -ATPase em frações de membrana do túbulo proximal de ratos submetidos à desnutrição intrauterina, e os dados ainda sugerem que essa alteração é responsável pela elevação da pressão arterial nesse modelo experimental (VIEIRA-FILHO *et al*, 2014).

As atividades das ATPases também podem ser alteradas por efeitos das ROS em suas vias modulatórias. Por exemplo, as ROS causam carbonilação da proteína P222, que regula a subunidade α da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ (YAN *et al.*, 2013). Essa proteína está envolvida na inibição do transporte de Na^+ por indução da endocitose da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ (SOLTOF & MANDEL, 1983). Muitos dos efeitos da Ang II nesses transportadores podem ser acentuados pelo estresse oxidativo, uma vez que as ROS estão relacionadas ao aumento da expressão do AT_1R (BECKER *et al.*, 2003; REJA *et al.*, 2006).

A estimulação do SRA associada ao estresse oxidativo tem sido alvo de grande interesse da comunidade científica, pois evidências indicam que essa interrelação é fundamental no mecanismo de desenvolvimento da hipertensão, doenças cardiovasculares e renais (NISTALA *et al.*, 2009; AYYUB, NAJMI, AKHTAR, 2017). Nos distúrbios cardiovasculares, o AT_1R tem se mostrado como um potencial promotor patológico, pois quando estimulado leva à vasoconstrição e retenção de Na^+ , em parte através de mecanismos pró-oxidativos (AHMADIAN *et al.*, 2016).

A ligação da Ang II ao AT_1R ativa a enzima produtora de ROS NADPH-oxidase, também conhecida como NOX (VAJAPEY *et al.*, 2014; MONTEZANO & TOUYZ, 2014). Quando estimulada, a NADPH-oxidase reduz o oxigênio molecular a ânion superóxido, altamente instável, que posteriormente é convertido a peróxido de hidrogênio pela SOD. O peróxido de hidrogênio é reduzido a H_2O pela ação da CAT ou da GPx. Todavia, quando há excesso de superóxido, o peróxido é convertido em radical hidroxila, o radical com maior poder citotóxico (CAT *et al.*, 2013). Nas células vasculares, por exemplo, os efeitos do ROS relacionados à ativação do AT_1R são mediados por moléculas de sinalização, como as MAP kinases, RhoA\Rho kinase, fatores de transcrição, proteína tirosina fosfatase e tirosina kinase, que ativam mecanismos de inflamação, contração, crescimento e até senescência (CAT *et al.*, 2013).

Através das subunidades da NADPH-oxidase NOX2 e NOX4 há uma importante produção de ROS que desempenham papel importante no desenvolvimento e progressão da lesão celular (NICKEL *et al.*, 2014; MONTEZANO & TOUYZ, 2014). A atividade dessa enzima pró-oxidante está correlacionada com a síntese aumentada de IL-6, $\text{TNF } \alpha$ e interferon γ , concomitante à diminuição na síntese de óxido nítrico (ON) e GMP cíclico (SCHIEFFER *et al.*, 2000; HAHN *et al.*, 1994; WEIDANZ *et al.*, 2005), além de ativação da proteína de transcrição 3 (STAT3), que desempenha papel chave no processo de diferenciação, proliferação, inflamação e apoptose celular (OMURA *et al.*, 2000), (Figura 6).

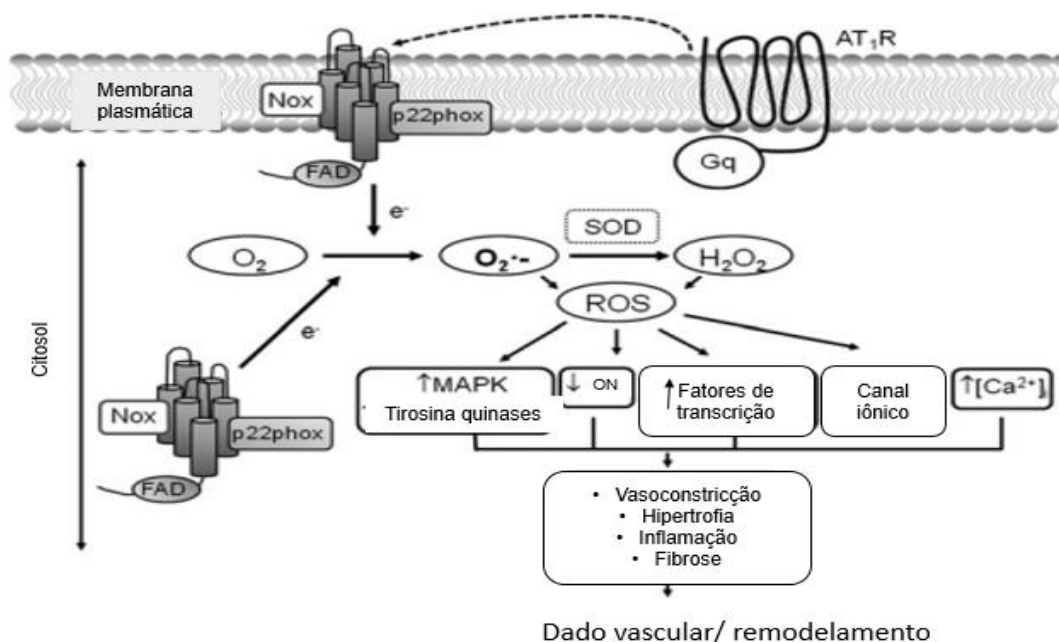


Figura 6. Remodelamento vascular promovido a partir do estímulo da AII sobre o AT₁R e vias redox (Cat et al., 2013).

2.7.2 O antioxidante tempol

O tempol é um nitróxido permeável à membrana plasmática com atividade antioxidante, conhecido como a mimético da SOD (KRISHNA *et al*, 1998; SAMAI *et al*, 2007; ZHANG *et al*, 2016). Ele desempenha atividade semelhante à SOD e à CAT, reduzindo nos tecidos os níveis de O₂^{•-} e H₂O₂ (ZHANG *et al*, 2016), protege proteínas, lipídeo e DNA contra os danos causados por ROS (SAMUNI *et al*, 2000; DAMIANI *et al*, 2006).

No tecido renal, o tempol já demonstrou efeitos protetores na LRA induzida por isquemia-reperfusão (ZHANG *et al*, 2016), bem como na glomeruloesclerose observada na hipertensão sensível ao sal (NISHIYAMA & ABE, 2004). Em outro modelo de hipertensão, o tempol impediu a perda podocitária, glomeruloesclerose e proteinúria, bem como evitou a perda progressiva da função renal (NAGASE *et al*, 2007). Além desses efeitos protetores, também já foi demonstrado que o tempol previne o aumento da expressão da NOX4 no rim de animais com insuficiência renal crônica, e esse efeito está envolvido na proteção ao dano glomerular e hipertensão (SANCHEZ-LOZADA *et al*, 2008).

Apesar dos benefícios no uso do tempol virem sendo observados em modelos de lesão renal, ele possui um efeito pró-oxidativo em doses elevadas, como observado em células endoteliais de aorta (ALPERT *et al*, 2003), entretanto sua capacidade pró-

oxidativa em células endoteliais é inconsistente, sendo prevenida por uma co-incubação de outro antioxidante (MAY *et al*, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

O estresse oxidativo é comum na etiologia e na progressão de algumas situações patológicas, devido a capacidade dos radicais livres em causar dano celular, através da peroxidação lipídica, além de causarem dano estrutural e comprometimento funcional. A situação de estresse oxidativo está intimamente ligado ao desenvolvimento e progressão da lesão renal aguda, levando à alterações no transporte proximal renal de sódio dependente de ATP, bem como sua modulação.

Alguns agentes químicos são classificados como nefrotóxicos, como é o caso do paraquat, um herbicida de largo espectro, que causa dano renal através de sua ação imediata mediante o estresse oxidativo à nível renal e sistêmico. Com base no exposto, nos propomos a elucidar os mecanismos modulatórios do estresse oxidativo sobre o transporte de sódio dependente de ATP, na lesão renal aguda, permitindo assim, a elaboração futura de estratégias terapêuticas mais eficazes na recuperação do paciente com lesão renal aguda.

4 MANUSCRITO

4.1 Tempol protects paraquat-induced changes in renal ATP-dependent Na⁺ transport and renin-angiotensin system components

Marry A.S. Cirilo^a; Valéria B.S. Santos^a; Natália K.S. Lima^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 clinical issue characterized by metabolic waste accumulation and impairment of hydroelectrolytic homeostasis. Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridyl dichloride) exposure induces AKI. Albeit kidney damage relies on reactive oxygen species (ROS) production, the consequence of paraquat exposure are not fully elucidated. This study evaluated whether paraquat-induced AKI is linked to alterations of ATP-dependent Na^+ transport and renal renin-angiotensin system (RAS), as well as whether these effects are dependent on ROS production. Adult male Wistar rats (300–400 g) were submitted to intraperitoneal administration of a single dose of paraquat (20 mg/kg, $n = 15$) or 0.9% NaCl (control group, 1 ml/kg; $n = 8$). Part of paraquat-treated group received tempol administration (10 mg/kg, drinking water, $n = 7$) during 7 consecutive days previously to paraquat administration. Within the 24-hours of paraquat exposure, it was observed loss of body weight and a pronounced elevation of urinary flow, as well as elevation of serum creatinine levels. In renal cortex, paraquat exposure led to increased ROS levels, NADPH oxidase activity and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity, in addition to upregulation of angiotensin II type 1 receptor (AT_1R), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6). In renal medulla, paraquat also increased ROS levels and NADPH oxidase activity, however, it inhibited $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity. These alterations – except to increased serum creatinine and renal levels of TNF- α and IL-6 – were prevented by previous tempol treatment. In summary, paraquat exposure led to a prominent urinary fluid loss that may be consequent to impaired Na^+ reabsorption induced by ROS, which may be a risk factor to vascular collapse and early death. Moreover, paraquat leads to stimulation of cortical ATP-dependent Na^+ transport and AT_1R upregulation. These changes may act as acute compensatory response to fluid loss, but may exacerbate renal injury later.

Keywords:

Acute kidney injury

ATP-dependent Na^+ transport

Paraquat

Reactive oxygen species

Renin-angiotensin system

1. Introduction

Acute renal injury (AKI) is characterized by nitrogen waste compounds accumulation and impairment of electrolytes and body fluid homeostasis, resulting from renal function loss [1,2]. AKI incidence is 18% in hospitalized patients, and it increases to about 70% in intensive care units, with mortality rates ranging from 20% to 70% [3]. The development of AKI is multifactorial; however, most severe cases frequently are associated to acute tubular necrosis due from nephrotoxic etiology [4]. Increasing evidences places renal tubules central in pathogenesis of AKI, as it loss of function leads to fluid conserving changes that secondarily affect the glomerulus [5,6]. Higher Na^+ fractional excretion is linked to poor recovery of renal function and worse prognostic [7].

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridyl dichloride) poisoning is linked to onset of AKI [8]. However, the underlying molecular mechanisms are not yet fully elucidated. It is already clear that kidney damage induced by paraquat relies on oxidative stress [8]. Renal tubule accumulation of paraquat activates redox cycles, with subsequent increase in reactive oxygen species (ROS) formation and cell injury, which tends to be aggravated as renal clearance of paraquat decreases [9]. Moreover, ROS generation in AKI may be partially due to mitochondrial dysfunction associated to low renal perfusion and O_2 delivery [10,11]. Thus, the proximal tubule is the major affected segment by the paraquat action.

The proximal tubule is particularly prone to injury because of its high metabolic rate, and its dysfunction has a high impact in salt wasting because it segment is responsible for the largest fractional reabsorption of filtered fluid [12]. Tubular damage is associated to loss of cellular polarity [13], necrosis [14], and decrease of glomerular filtration rate [14]. Tubular reabsorption depends primary on Na^+ gradient generated by basolateral active transport mediated by ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase [15] and furosemide-sensitive, ouabain-resistant Na^+ -ATPase [16], being the former considered responsible for the bulk Na^+ reabsorption, whereas the later correlated with fine tuning [17–19]. Tubule transport may be also regulated by ROS; it was described that both Na^+ -transporting ATPases are sensible to redox signaling [17,20,21].

Renin-angiotensin system (RAS) is a key mediator of Na^+ reabsorption and extracellular fluid volume [22]. Tubulointerstitium levels of angiotensin II are higher than in blood plasma [12], and Na^+ -transporting ATPases are tightly regulated by this peptide [19,23]. Furthermore, RAS components are also coupled to renal damage by regulation

of cellular proliferation, inflammation and tissue fibrosis [24]. Angiotensin II, isoform 1 of angiotensin-converting enzyme (ACE1) and the angiotensin II-type 1 receptor (AT₁R) had been linked to inflammation and microvascular dysfunction in ischemia/reperfusion-induced AKI [25]. In AKI patients, elevated urinary angiotensinogen-creatinine ratio was already positively correlated to adverse outcomes [22]. Moreover, RAS cross-talks with oxidative stress, once it increases ROS production through NADPH oxidase, leading to RAS upregulation [26].

Based on these data, it is possible that AKI induced by paraquat has as underlying mechanism ROS-mediated alterations of Na⁺ transport machinery and renal RAS expression that could lead to salt wasting and renal injury. Thus, this study investigated whether paraquat administration induces alterations in ATP-dependent Na⁺ transporters and several renal RAS components, as well as whether these effects are dependent of ROS production.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All experimental procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation at the Federal University of Pernambuco (protocol number 0013/2017), and conducted according to Brazilian Council of Animal Experimentation (CONCEA) guidelines.

Male Wistar rats (300–400 g and approximately 90 days of age) were maintained at 21 ± 3 °C, 12 h light/dark cycle and free access to water and standard chow. The rats were submitted to intraperitoneal administration of a single dose of paraquat (20 mg/kg of body weight, n = 15; paraquat group, PQ) or vehicle (0.9% NaCl, 1 ml/kg of body weight, n = 8; control group, C). Part of PQ group was treated with tempol (10 mg/kg of body weight in drinking water, n = 7; paraquat + tempol group, PQ+T) during 7 consecutive days previously to paraquat administration. Immediately after paraquat/0.9% NaCl administration, all animals were placed in individual metabolic cages during 24-hour period and then, submitted to systolic blood pressure evaluation. Finally, the rats were anesthetized (ketamine and xylazine; 80 and 10 mg/kg of body weight, ip), and submitted to blood sample withdrawn by abdominal aorta, and to the collection of kidneys

and a sample of liver. Kidneys and livers samples were snap-frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C .

2.2. General metabolic and renal function data and systolic blood pressure

The rats were placed in metabolic cages to evaluate water and diet intake, as well as to collect 24-h urine samples. Previously, for at least one week (before paraquat/0.9% NaCl administration), the rats were acclimated for three consecutive 24-hours periods in metabolic cage. Urine samples, together with serum, were submitted to evaluation of creatinine concentration using a commercial colorimetric kit (Labtest, Lagoa Santa, Brazil), and creatinine clearance was calculated. In addition, it was also evaluated serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) concentrations using commercial colorimetric kit (Labtest), and serum and urinary protein concentration using Folin-phenol method [27].

Systolic arterial pressure (SAP) evaluation was performed noninvasively on conscious rats through tail-cuff plethysmography (IITC Life Science B60-7 / 16, Life Science Instruments) [28]. The animals were trained during three consecutive days to experimental procedures of SAP measurement as described elsewhere [29].

2.3. Lipid peroxidation

To evaluate lipid peroxidation, renal (cortex and medulla) and liver samples were homogenized in ice-cold solution containing 150 mM KCl and 3 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Lipid peroxidation was evaluated by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in tissue homogenate according to the method of Ohkawa et al. (1979) [30]. The TBARS levels were corrected by protein content in the sample, measured by Folin-phenol method [27].

2.4. In situ levels of reactive oxygen species

ROS levels were evaluated in renal cortex and medulla using the fluorescent superoxide probe dihydroetidium (DHE; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO). At euthanasia, renal sections of 3-mm thick were snap frozen embedded in O.C.T. (Sakura Finetek, Terrance, CA), and maintained at -80°C . Following, 5- μm slices were incubated

in 100 mM diethylene thiamine-pentaacetic acid (DTPA) solution (in 100 mM phosphate buffered saline, PBS) during 30 min, and subsequently, incubated in 5 μ M DHE (in PBS, pH 7.4). The slices were mounted and DHE fluorescence was quantified using fluorescence microscopy (Eclipse Ni-U microscope coupled to camera DS-i, Nikon, Shanghai, China) using a filter to 530–560 nm of excitation and 590–650 nm of emission. The results of each rat was an average fluorescence intensity of 10 cortical and medullar fields ($\times 200$ magnification) measured by Image Pro Plus software (version 4.5.1, Media Cybernetics, MD).

2.5. Superoxide anions and NADPH oxidase activity

Renal superoxide anions and NADPH oxidase activity were assessed by lucigenin-derived chemiluminescence. *Cortex corticis* (outer region from the renal cortex, it was isolated and described by Vieyra et al. [31], since about 95% of cell population is proximal tubule cells [32]) and medulla samples were separated and homogenized in an ice-cold solution containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS), supplemented with protease inhibitor cocktail (2 mM AEBSF, 1 mM EDTA, 130 μ M bestatin, 14 μ M E-64, 1 μ M leupeptin, 0.3 μ M aprotinin). The samples were centrifuged at $12,000 \times g$ for 12 min at 4 °C and the supernatant (1 mg/ml protein) was pre-incubated at 37 °C in a reaction medium containing 0.02 M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4). and 100 μ M NADPH. After, lucigenin was added (10 μ M) and luminescence was evaluated in 10 one-second-measurements, with 30 second interval between each other, at 37 °C (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Loughborough, UK). The final result was presented as the sum of the luminescence obtained in the 10 measurements and expressed as the relative light units (RLU) corrected by sample protein. The luminescence evaluated in the absence of NADPH was representative of basal superoxide anions production.

2.6. Renal ATP-dependent Na^+ transport

The activity of Na^+ -transporting ATPases was quantified in homogenates from *cortex corticis* and medulla, according to described elsewhere [29,33]. Samples were homogenized in isotonic buffer (250 mM sucrose, 10 mM Hepes-Tris, pH 7.4, 2 mM EDTA and 0.15 mg/ml trypsin inhibitor) in ice bath. The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ and Na^+ -

ATPase activities were estimated by measurement of ATP hydrolysis sensitive to ouabain and furosemide, respectively.

2.7. SDS-PAGE and Western Blotting

Abundance of renal cortical proteins was measured by immunoblotting [29,34]. The sample proteins (80 µg) were separated by SDS-based polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to a nitrocellulose membrane (G&E Healthcare, Buckinghamshire, UK). Following, it was performed non-specific binding sites blocking of the membranes using 5% BSA or 5% non-fat milk solution, and next, overnight incubation (4 °C) with primary antibody (diluted in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween, TBS-T) to target protein. After washing with TBS-T, the membranes were incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody, and then, exposed to a peroxidase-sensitive chemiluminescent reagent (G&E Healthcare). The blots were visualized using an image acquisition system (Chemidoc MP, Bio-Rad, Hercules, USA)

The primary antibodies were: anti-TNF- α , 1:200 (IM-0406, Imuny Biotechnology, Campinas, Brazil); anti-interleukin 6, 1:200 dilution (IM-0407, Imuny Biotechnology); 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- angiotensin II-type 2 receptor (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); anti- β -actin, dilution 1:5000 (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology).

2.8. Statistical analysis

The results are presented as means $\pm$ SEM. First, it was evaluated whether the distribution of each parameter data was normal by Shapiro-Wilk normality test.

Considering Gaussian distribution of data, the difference between groups was analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statistical analysis and graphs drawing were performed using GraphPad Prism 6 software (version 6.01, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. General metabolic data

General data of rats after paraquat administration is presented in Table 1. After 24 hours of paraquat administration, the rats presented a pronounced body weight loss, however this change was not observed in tempol-treated group. Paraquat administration also led to a decreased food (65%, $P < 0.001$) and water (30%, $P < 0.05$) intake, as well as increased urine output (100%, $P < 0.01$) and serum protein levels (10%, $P < 0.05$). Tempol treatment prevented paraquat-induced changes in food intake, diuresis and serum protein levels.

Table 1. General metabolic data

	C (n = 8)	PQ (n = 8)	PQ+T (n = 7)
Body weight variation (g)	2.0 ± 1.7	$-24.0 \pm 4.0^{**}$	$2.0 \pm 6.0^{\dagger\dagger}$
Food intake (g/100 g BW)	6.5 ± 0.3	$2.3 \pm 0.2^{***}$	$6.1 \pm 0.6^{\dagger\dagger\dagger}$
Water intake (ml/100 g BW)	13.9 ± 1.0	$10.0 \pm 0.9^*$	$10.0 \pm 1.3^*$
Diuresis (ml/100 g BW)	4.0 ± 0.2	$8.0 \pm 0.8^{***}$	$5.3 \pm 0.4^{\dagger\dagger}$
Total serum protein (g/dl)	6.8 ± 0.1	$7.5 \pm 0.2^*$	$6.7 \pm 0.1^{\dagger}$

C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). Food and water intake and diuresis data are relative to a 24-hours period. BW = body weight. The results are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. C; $^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ and $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$ vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

3.2. Renal and hepatic injury markers, systolic arterial pressure and heart rate

In addition to induce body weight loss and to increase diuresis, paraquat administration led to alterations in renal and hepatic injury serum markers (Table 2).

Paraquat rats presented higher levels of serum creatinine (45%, $P < 0.01$), AST (90%, $P < 0.01$) and ALT (40%, $P < 0.05$), as well as lower (50%, $P < 0.01$) creatinine clearance than control group. Paraquat rats that received tempol also presented higher serum creatinine and lower creatinine clearance than control group, however AST and ALT were similar. Proteinuria was not changed by paraquat administration or tempol treatment.

The SAP and heart rate were higher ($P < 0.05$ and 0.01 , respectively) in rats submitted to paraquat administration presented in comparison to the control group. These changes were not observed in paraquat rats treated with tempol.

Table 2. Evaluation of renal and hepatic function markers, SAP and heart rate

	C (n = 8)	PQ (n = 8)	PQ+T (n = 7)
Serum creatinine (mg/dl)	0.45 ± 0.02	0.65 ± 0.05**	0.67 ± 0.04**
Creatinine clearance (ml/min per 100 g BW)	0.91 ± 0.08	0.48 ± 0.06**	0.56 ± 0.06**
Proteinuria (mg/100 g BW)	35.8 ± 2.3	28.8 ± 3.5	29.1 ± 3.0
Serum AST (mg/dl)	76.8 ± 9.2	145.3 ± 6.2**	104.3 ± 15.8
Serum ALT (mg/dl)	40.0 ± 5.2	56.5 ± 1.6*	36.1 ± 4.0 [†]
Systolic arterial pressure (mmHg)	133 ± 3	145 ± 4*	136 ± 1
Heart rate (bpm)	405 ± 6	442 ± 9**	408 ± 7 [†]

C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). Proteinuria data is relative to a 24-hours period. BW = body weight; AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase. The results are expressed as mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. C; [†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$ and ^{†††} $P < 0.001$ vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

3.3. Renal and hepatic oxidative stress

The effects of paraquat on oxidative stress were investigated by evaluation of lipid peroxidation and superoxide anions production (Fig. 1–3). Paraquat administration induced an increase of more than 75% ($P < 0.05$) in lipid peroxidation from renal cortex,

medulla and liver, while tempol treatment prevented completely these changes (Fig. 1). Paraquat administration also induced elevation of reactive oxygen species (Fig. 2) and superoxide anions (Fig. 3A) in renal cortex and medulla, which were similarly prevented by tempol treatment.

NADPH oxidase activity was increased in renal cortex and medulla of paraquat rats (Fig. 3B). In renal cortex, paraquat increased NADPH oxidase activity by almost one-time ($P < 0.05$), while in medulla the elevation was higher than 40% ($P < 0.01$). On the other side, paraquat rats treated with tempol (PQ+T group) presented NADPH oxidase activity similar to control group.

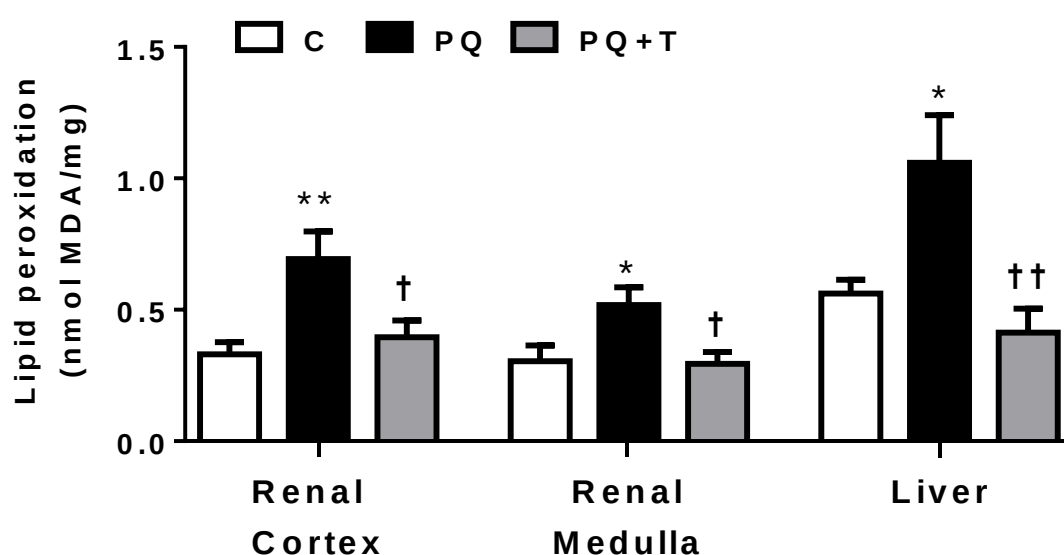


Fig. 1. Tissue lipid peroxidation evaluated 24 hours after paraquat administration. C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). Lipid peroxidation was evaluated by measurement of thiobarbituric acid reactive substances. MDA = malondialdehyde. The experimental n ranged between 6–7. The results are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. C; † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

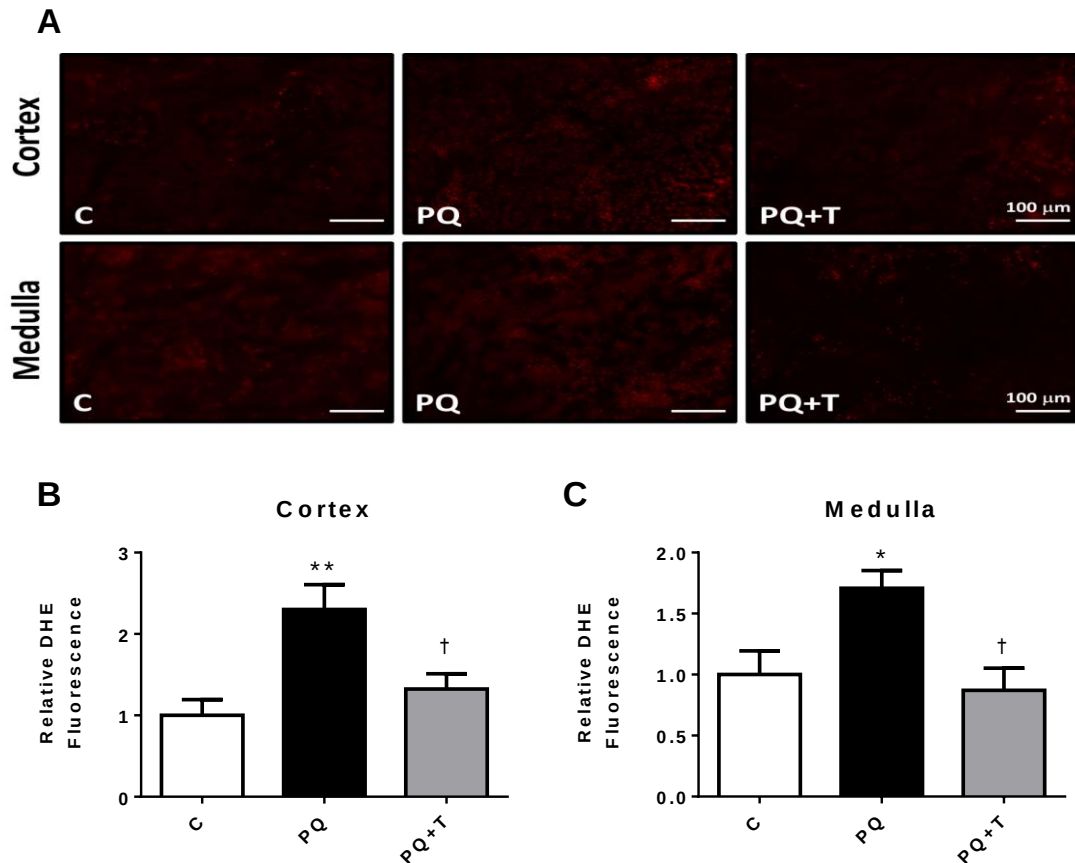


Fig. 2. *In situ* evaluation of reactive oxygen species levels in renal tissue 24 hours after paraquat administration. (A) Representative images of DHE fluorescence in cortex and medulla. (B) Relative DHE fluorescence evaluated in cortex. (C) Relative DHE fluorescence evaluated in medulla. C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). In all representative images of panel A, the bars represent 100 μ m. DHE = dihydroetidium. The experimental n ranged between 4–5. The results are expressed as mean $\pm$ SEM. * P < 0.05 and ** P < 0.01 vs. C; † P < 0.05 vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

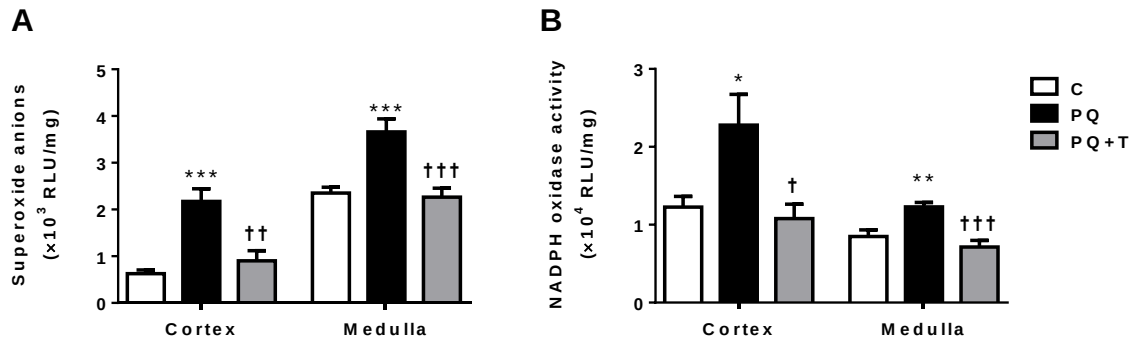


Fig. 3. Basal superoxide anions production (A) and NADPH oxidase (B). The assays were performed using renal cortex and medulla after 24 hours-paraquat administration. C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). RLU = relative light units. The experimental n ranged between 5–8. The results are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. C; † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

3.4. Effects of paraquat and tempol on ATP-dependent Na^+ transport

One of the main objectives of the present study was to investigate whether paraquat could change the activity of Na^+ -transporting ATPases and, whether this change could be related to ROS production. After confirming that paraquat increased oxidative stress markers in renal tissue, it was evaluated the activity of ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase and furosemide-sensitive Na^+ -ATPase in *cortex corticis* and medulla (Fig. 4). ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity was nearly 100% higher ($P < 0.01$) in *cortex corticis* from paraquat rats in comparison to control group, while in medulla, it was 40% lower ($P < 0.01$) (Fig. 4A). ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity of paraquat rats treated with tempol was similar to control group in both portions, *cortex corticis* and medulla. Albeit paraquat promoted changes in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity, it did not alter protein content of $\alpha 1$ subunit (data not shown).

Interestingly, paraquat induced opposite changes in Na^+ -ATPase activity. In *cortex corticis* from paraquat-treated rats, the Na^+ -ATPase activity was 50% lower ($P < 0.001$) than control rats, while in medulla, it was 50% higher ($P < 0.05$) (Fig. 4B). These changes were also prevented by tempol treatment.

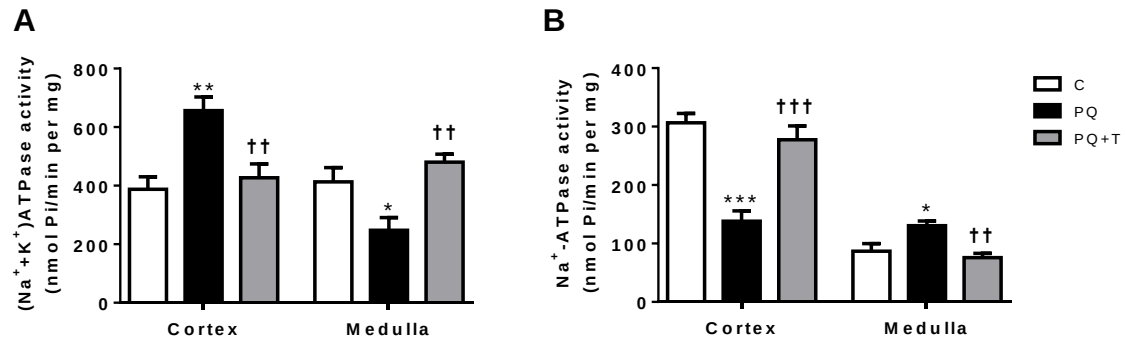


Fig. 4. ATP-dependent Na⁺ transporters in renal cortex and medulla. (A) ouabain-sensitive (Na⁺+K⁺)ATPase and (B) furosemide-sensitive, ouabain-resistant Na⁺-ATPase were evaluated in renal tissue 24 hours after paraquat administration. C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). P_i = inorganic phosphate. The experimental n ranged between 7–8. The results are expressed as mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 vs. C; ††*P* < 0.01 and †††*P* < 0.001 vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

3.5. IL-6 and TNF-α like inflammatory markers

To verify whether paraquat leading to pro-inflammatory effects, it was evaluated TNF-α and IL-6 renal content (Fig. 5). The TNF-α renal content was two times higher in paraquat group compared to control rats (*P* < 0.01). Moreover, IL-6 levels were increased by 55% (*P* < 0.01). The administration of tempol was not able to prevent the enhancement of these inflammatory markers.

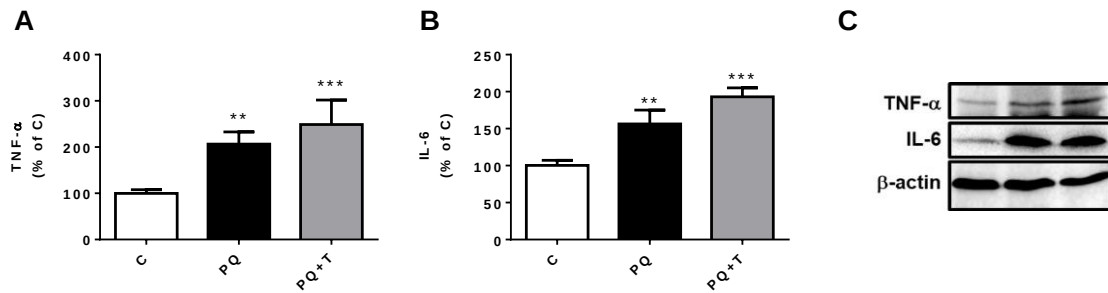


Fig. 5. TNF- α and IL-6 immunodetection in the renal cortex 24 hours after paraquat administration. (A) Graphic representation of the TNF- α abundance. (B) Graphic representation of the IL-6 abundance. (C) Representative immunoblottings of 6–8 immunoanalyses performed with different kidney preparations. β -actin was used as loading control. C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). The results are expressed as mean $\pm$ SEM. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. C (one-way ANOVA followed by Tukey test).

3.6. Intrarenal RAS expression

The renal cortical protein content of RAS components is depicted in Fig. 6. Protein levels of angiotensinogen, prorenin, renin, isoform 1 of angiotensin-converting enzyme (ACE1), and isoform 2 of angiotensin-converting enzyme (ACE2) were similar between experimental groups. On the other hand, the angiotensin II-type 1 receptor (AT₁R) renal content was higher (95%, $P < 0.01$) in rats submitted to paraquat administration in comparison to control rats. The renal content of AT₁R in tempol-treated group was similar to control group. The angiotensin II-type 2 receptor (AT₂R) abundance was not affected by paraquat administration; however, it was increased by tempol treatment (Fig. 6G).

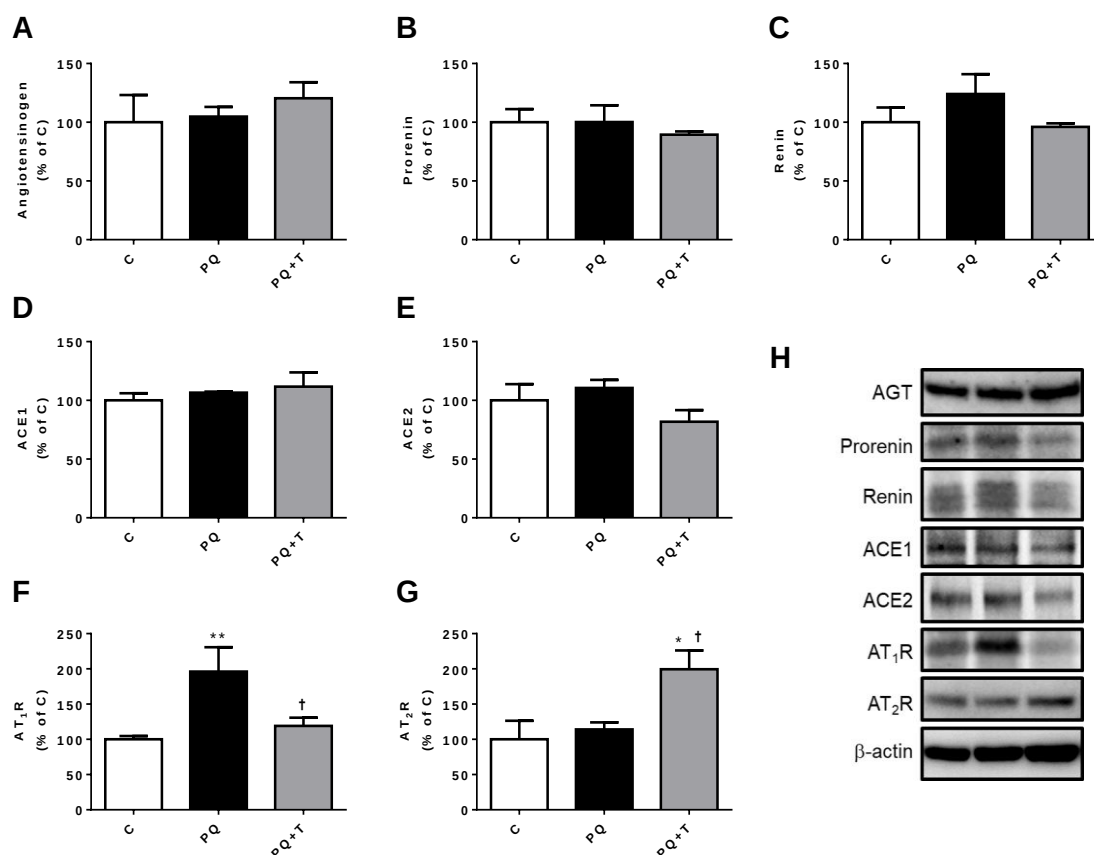


Fig. 6. Immunodetection of several RAS components in the renal cortex 24 hours after paraquat administration. (A–G) Graphic representations of the angiotensinogen, prorenin, renin, ACE1, ACE2, AT₁R and AT₂R abundances. (H) Representative immunoblottings of 4–8 immunoanalyses performed with different kidney preparations. β-actin was used as loading control. C: control rats; PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). The results are expressed as mean ± SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. C; † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

3.7. Protein kinase C and protein kinase A abundance

Once RAS modulation of ATP-dependent Na⁺ transport is highly mediated by protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA) via AT₁R and AT₂R, respectively, the protein content of these intracellular mediators was evaluated (Fig. 7). Paraquat did not affect the protein levels of any of the PKC isoforms evaluated, as well as it did not affect the levels of PKA catalytic subunit. Nevertheless, paraquat rats treated with tempol presented nearly 50% higher ($P < 0.05$) renal cortical content of PKC isoforms α and ε in comparison to both control and non-treated paraquat rats.

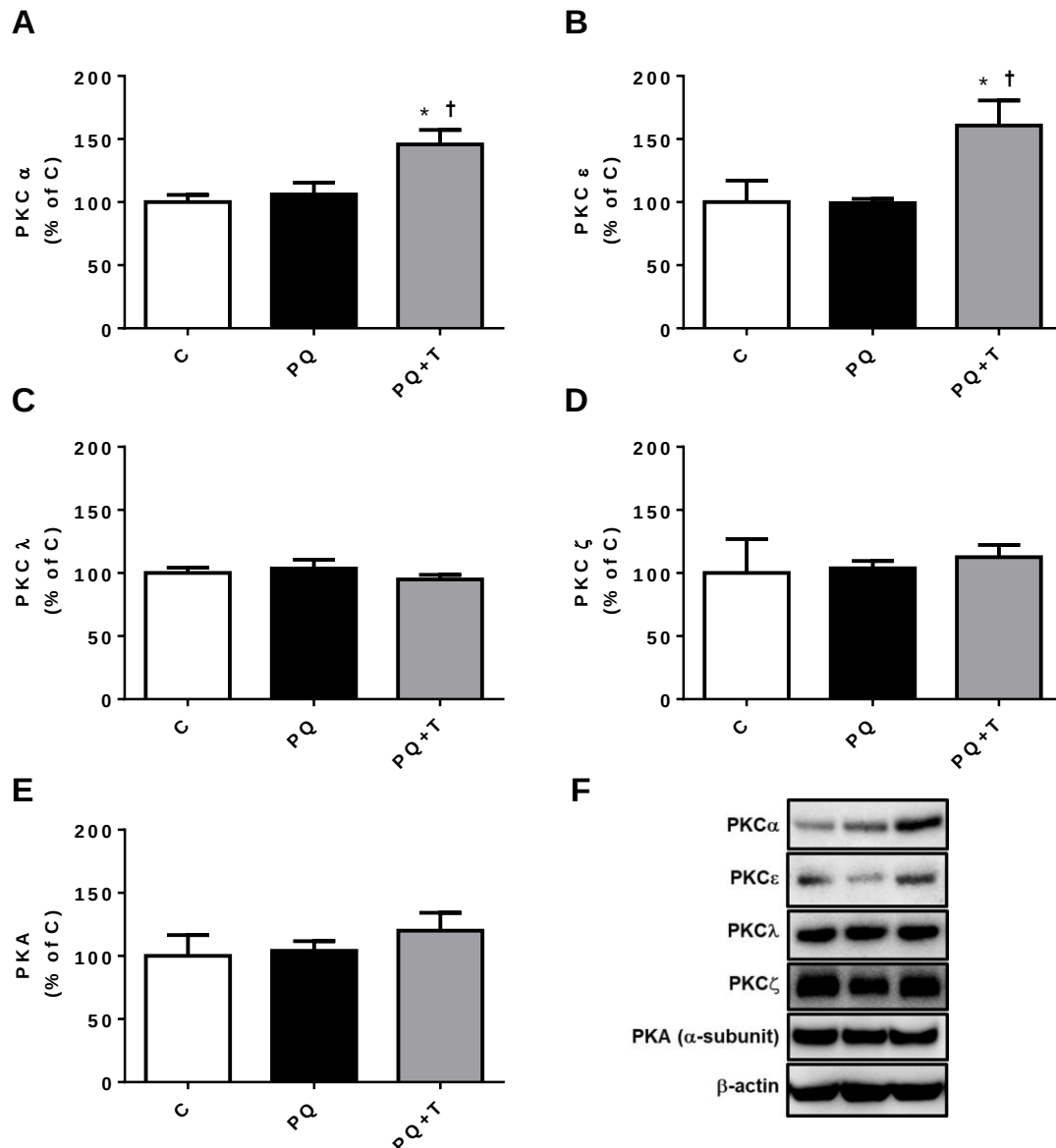


Fig. 7. Immunodetection of PKC isoforms and PKA in the renal cortex 24 hours after paraquat administration. (A–E) Graphic representations of the PKC α , PKC ϵ , PKC γ , PKC ζ and PKA α -catalytic subunit abundances. (F) Representative immunoblottings of 5 immunoanalyses performed with different kidney preparations. β -actin was used as loading control. C: control rats (n = 8); PQ: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip); PQ+T: rats treated with paraquat (20 mg/kg of body weight, ip) that received previously tempol administration (10 mg/kg of body weight, orally). The results are expressed as mean $\pm$ SEM. $^*P < 0.05$ vs. C; $^\dagger P < 0.05$ vs. PQ (one-way ANOVA followed by Tukey test).

4. Discussion

The main finding of the present study was that AKI-induced by paraquat poisoning may be linked to ROS-dependent changes in active Na⁺ transport (Fig. 4) and

AT₁R upregulation (Fig. 6). Paraquat led to an accentuated urinary fluid loss that may be associated to decreased fluid reabsorption due to decrease of medullar (Na⁺+K⁺)ATPase and interstitium osmolarity. Moreover, it was observed that these changes occurred in parallel to increased superoxide anions production and NADPH oxidase activity (Fig. 3), and were inhibited by tempol, indicating the role of ROS in this process. In renal cortex, it was observed opposite changes in (Na⁺+K⁺)ATPase activity and AT₁R upregulation that could be acting as compensatory mechanism to urinary loss of body fluid. However, this response may exacerbate renal injury due to higher stimulation of superoxide anions production (Fig. 3A), NADPH oxidase activity (Fig. 3B) and pro-inflammatory pathways (Fig. 5).

Paraquat is an herbicide with low environmental toxicity due to its inactivation after soil contact. However, it is highly toxic when direct contact to humans occurs, with mortality risk ranging 35–50% [35]. It was observed that paraquat led to a pronounced loss of body weight during the 24 hours following intraperitoneal administration (Table 1). The body weight loss may be partially due to decreased food and water intake (Table 1). As previously described, paraquat presents anorexic effect that occurs parallel to asthenia and lethargy [36] that were also observed in the present study. Moreover, it was already described that intracerebroventricular administration of paraquat blunts dipsinogenic actions of angiotensin II [37]. This may explain how paraquat induced low water intake in the present study, as paraquat is able to cross blood-brain barrier and induce brain damage [38,39].

However, body weight loss may also be consequence of dehydration and decreased volume of body fluids. Indeed, it was observed a pronounced elevation of urinary volume after paraquat administration (Table 1), even in face of low water intake (Table 1), which indicates a negative hydric balance. Additionally, this hypothesis is supported by elevation of plasma total protein level that may reflect plasma concentration (Table 1). Whether this occurred within the 24 hours following paraquat administration, it would be expected compensatory activation of antidiuretic regulators, as RAS and sympathetic nervous system [40] that would also influence cardiovascular function by increasing SBP and HR, as observed in paraquat-treated rats.

Paraquat leads to injury in several organs, present in respiratory, digestive, cardiovascular, nervous and renal systems [41]. Paraquat intoxication lethality is greatly dependent on the degree of renal and hepatic function deterioration [9], and its early mortality occurs as result of vascular collapse. Paraquat-treated rats presented changes in

renal and hepatic function markers that suggest acute kidney and hepatic injury. However, elevation of serum creatinine levels (Table 2) should not be completely attributed to decreased renal function. It was already shown that paraquat induces elevation of creatine and creatinine production to meet energy demand following poisoning, and, in a minor extent, it may inhibit creatinine secretion [42].

The elevation of renal and hepatic markers of injury occurred in parallel to elevation of lipid peroxidation (Fig. 1). Paraquat induces cellular and tissue damage through increase of ROS production (Fig. 2) by participating in cellular redox cycles [43]. Several studies show that antioxidant treatments provide benefits by alleviating injury induced paraquat, and promoting the recovery [35,44–46]. It was observed that tempol treatment prevented paraquat-induced changes in hepatic function markers, which indicates lowering of paraquat toxicity. Additionally, it was observed that tempol partially improved many parameters related to kidney function, such as: i) diuresis (Table 1); ii) tubular ATP-dependent Na^+ transport (Fig. 4); and iii) AT_1R protein levels (Fig. 6).

Simultaneously to elevation of lipid peroxidation (Fig. 1), it was also demonstrated that paraquat increased ROS levels (Fig. 2), as well as it increased NADPH oxidase activity in renal cortex and medulla (Fig. 3B). It is noteworthy that the elevation of lipid peroxidation was more prominent in renal cortex than medulla (110% vs. 70%). This may be due to the greater impact that paraquat presented in elevation of basal superoxide production and NADPH oxidase activity in renal cortex: it was observed that paraquat increased superoxide anions production and NADPH oxidase activity in cortex by 240% and 85% respectively, while in medulla, they were increased by 55% and 45% (Fig. 3). The unique cortex vulnerability to paraquat-induced ROS generation can be explained by several factors. After intoxication, renal concentration of paraquat tends to increase mainly in cortex [47], because paraquat exists as a divalent organic cation, which is actively secreted by proximal tubule using polyvalent organic cation transport protein [48]. In addition, the renal cortex receives greater blood perfusion than medulla, which implies more exposure to paraquat, as well as more exposure to oxygen, which potentiates its ROS generation properties [49].

Although the literature shows that antioxidant treatment has anti-inflammatory effects [35,50], in this study, tempol did not prevent the elevation of renal content of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 induced by paraquat (Fig. 5). This observation allows to be made another proposal mechanism to explain the inability of tempol to prevent the elevation of serum creatinine levels (Table 2). Besides paraquat effects on muscle metabolism [42], it is

possible that absence of tempol effects on altered levels of proinflammatory mediators does not allow full protection of renal function when challenged by paraquat. Hence, it may be supposed that paraquat induces renal injury, at least in part, by independent oxidative and inflammatory mechanisms [51,52].

Paraquat intoxication induces tubular injury characterized by tubular degeneration, renal vessels obstruction and leukocyte infiltration [47,53,54]. In the present study, the kidney inefficiency to avoid excessive fluid excretion may reflect the presence of tubular damage. Fractional sodium excretion exceeding more than 40% of the filtered load has already been reported in a case study with two patients poisoned by paraquat [55]. Moreover, Mølck and Friis [47] observed in isolated proximal tubular segments from rabbits that paraquat incubation leads to inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption, which indicates diminution of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. However, in the present study, it was observed the opposite in *cortex corticis* homogenates from paraquat-treated rats: increased $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity (Fig. 4A). The data incongruence may be justified by several differences between the studies designs, as $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ evaluation assay, sample type and model of paraquat exposure. It may be proposed that paraquat has a direct effect inhibiting $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity in proximal tubules, however, in a whole body context, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity would be increased by a potent compensatory stimulus activated by an initial extracellular fluid loss.

The compensatory stimulation of cortical $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ probably relies in angiotensin II signaling. This peptide is the main regulator of proximal tubule Na^+ reabsorption, in part through stimulation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ [15]. It was observed that paraquat induced AT_1R upregulation (Fig. 6). Therefore, renal RAS activation may be an underlying mechanism to increased $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity. Angiotensin II, via AT_1R , may be also linked to ROS production through stimulation of NADPH oxidase activity [56], which may be another pathway to induce increase of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity [57].

However, whether cortical $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity may not explain paraquat-induced diuresis (Table 1), what mechanisms could explain? It was observed that paraquat led to medullar $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity inhibition. As the main O_2 consuming segment in the medulla is the thick ascending limb, it may be suggested that this lowered medullar $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity represents a reduction of Na^+ transport in this segment, which would impair medulla osmolar gradient, leading to transient nephrogenic diabetes insipidus. Differently from proximal tubule, this change would be mainly due to direct effects of paraquat in inhibition of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity [47], rather than

effects linked to increased ROS formation or RAS activation. As it was observed, pro-oxidant effects of paraquat were more prominent in cortex than in medulla. Moreover, as paraquat presents effects in central nervous system related to inhibition of dipsinogenic response to angiotensin II [37], it deserves investigation whether antidiuretic hormone secretion is impaired during poisoning.

The changes in furosemide-sensitive Na^+ -ATPase activity following paraquat administration may be a compensatory response to alterations of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity (Fig. 5), as it was observed reciprocal changes between both Na^+ pumps in cortex and medulla. This response of Na^+ -ATPase activity may be a mechanism that allow appropriated regulation of membrane potential, as it performs Na^+ extrusion without interference in intracellular K^+ [16], while $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ performs the bulk tubular Na^+ reabsorption [15].

Tempol-mediated protective mechanisms over paraquat effects may occurred due its antioxidant property, which lead to recovery of ATP-dependent Na^+ transporters activity (Fig. 5) and renal RAS components content (Fig. 6). However, tempol seems to present extra benefic effects, in which it may be included AT_2R and $\text{PKC}\epsilon$ upregulation (Figs. 6 and 7). First, AT_2R upregulation may be linked to stimulation of anti-inflammatory and antioxidative pathways [58]. Meanwhile, $\text{PKC}\epsilon$ is a novel isoform of PKC that has been associated to protective responses to renal injury [59,60].

In summary, it was observed that paraquat exposure led to a prominent urinary fluid loss that may be consequent to impaired Na^+ reabsorption, becoming a risk factor to vascular collapse and early death. Furthermore, it was observed that urinary fluid loss induced by paraquat leads to stimulation of cortical ATP-dependent Na^+ transport as compensatory response, as well as it induced upregulation of pro-hypertensive RAS component that may exacerbate renal injury lately.

Author contribution

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) conception and design of the study: H.M.-F., A.D.O.P., A.V., L.D.V.; (2) acquisition of data: M.A.S.C., V.B.S.S., N.K.S.L., H.M.-F.; (3) analysis and interpretation of data: M.A.S.C., V.B.S.S., N.K.S.L., H.M.-F., A.D.O.P., A.V., L.D.V.; (4) drafting the paper: M.A.S.C., L.D.V.; (5) critical revision of the paper: H.M.-F., A.D.O.P., A.V., L.D.V.; and

(6) final approval of the version to be submitted: M.A.S.C, V.B.S.S., N.K.S.L., H.M.-F., A.D.O.P., A.V., L.D.V..

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 number 1133-2.07/2012). The authors also thank Nielson T. Mello, Danielle Dutra and Gloria Costa Sarmento 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] A.P. Singh, A. Junemann, A. Muthuraman, A.S. Jaggi, N. Singh, K. Grover, R. Dhawan, Animal models of acute renal failure, *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 31–44. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70728-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70728-4).
- [2] F. Togel, C. Westenfelder, Recent advances in the understanding of acute kidney injury, *F1000Prime Rep.* 6 (2014) 83. <https://doi.org/10.12703/P6-83>.
- [3] S. Uchino, J.A. Kellum, R. Bellomo, G.S. Doig, H. Morimatsu, S. Morgera, M. Schetz, I. Tan, C. Bouman, E. Macedo, N. Gibney, A. Tolwani, C. Ronco, Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators, Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study, *J. Am. Med. Assoc. (JAMA)* 294 (2005) 813–818. <https://doi.org/10.1001/jama.294.7.813>.
- [4] P.S. Pinto, M. Carminatti, T. Lacet, D.F. Rodrigues, L.O. Nogueira, M.G. Bastos, N. Fernandes, Nephrotoxic acute renal failure: prevalence, clinical course and

- outcome, *J Bras Nefrol.* 31 (2009) 183–189. <https://doi.org/10.1590/S0101-28002009000300003>.
- [5] R.L. Chevalier, The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 311 (2016) F145–F161. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00164.2016>.
- [6] B.A. Molitoris, Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 2355–2363. <https://doi.org/10.1172/JCI72269>.
- [7] G.W. Moeckel, Pathologic perspectives on acute tubular injury assessment in the kidney biopsy, *Semin. Nephrol.* 38 (2018) 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2017.09.003>.
- [8] S.Y. Gu, T.Y. Yeh, S.Y. Lin, F.C. Peng, Unfractionated bone marrow cells attenuate paraquat-induced glomerular injury and acute renal failure by modulating the inflammatory response, *Sci. Rep.* 6 (2016) 232–287. <https://doi.org/10.1038/srep23287>.
- [9] G.L. Hong, J.M. Liu, G.J. Zhao, J.P. Tan, B. Wu, M.F. Li, G. Liang, Q.M. Qiu, Z.Q. Lu, Cycloartenyl ferulate inhibits paraquat-induced apoptosis in HK-2 cells with the involvement of ABCC1, *J. Cell Biochem.* 117 (2016) 872–880. <https://doi.org/10.1002/jcb.25370>.
- [10] W. Zhao, S.S. Chen, Y. Chen, R.A. Ahokas, Y. Sun, Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress, *Am. J. Nephrol.* 28 (2008) 548–554. <https://doi.org/10.1159/000115289>.
- [11] C. Quoilin, A. Mouithys-Mickalad, S. Lécart, M.P. Fontaine-Aupart, M. Hoebeke, Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an *in vitro* model of sepsis-induced kidney injury, *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (2014) 1790–1800. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2014.07.005>.
- [12] X.C. Li, J.L. Zhuo, Recent updates on the proximal tubule renin-angiotensin system in angiotensin II-dependent hypertension, *Curr. Hypertens. Rep.* 18 (2016) 63. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0668-z>.
- [13] N. Lameire, W. Van Biesen, R. Vanholder, Acute renal failure, *Lancet* 365 (2005) 417–430. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17831-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17831-3).
- [14] A. Havasi, S.C. Borkan, Apoptosis and acute kidney injury, *Kidney Int.* 80 (2011) 29–40. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.120>.

- [15] E. Féraillé, A. Doucet, Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 345–418. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.345>.
- [16] M.A. Rocafull, F.J. Romero, L.E. Thomas, J.R. del Castillo, Isolation and cloning of the K^+ -independent, ouabain-insensitive Na^+ -ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 1684–1700. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.02.010>.
- [17] J. Beltowski, E. Borkowska, G. Wójcicka, A. Marciniak, Regulation of renal ouabain-resistant Na^+ -ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension, *Clin. Exp. Hypertens.* 29 (2007) 189–207. <https://doi.org/10.1080/10641960701361585>.
- [18] C. Liu, Y. Song, L. Qu, J. Tang, L. Meng, Y. Wang, Involvement of NOX in the regulation of renal tubular expression of Na/K-ATPase in acute unilateral ureteral obstruction rats, *Nephron* 30 (2015) 66–76. <https://doi.org/10.1159/000381858>.
- [19] A. Vieyra, P.A. Silva, H. Muzi-Filho, C.F. Dick, A.L. Araujo-dos-Santos, J. Dias, L.D. Vieira-Filho, A.D.O. Paixão, The role of the second Na^+ pump in mammals and parasites. In: S. Chakraborti, N.S. Dhalla (Eds.), *Regulation of membrane Na^+ - K^+ ATPase*, Advances in biochemistry in health and disease, v. 15, Springer International Publishing, Winnipeg, Manitoba, Canada, 2016, pp. 93–112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24750-2_6.
- [20] E. Kurella, M. Kukley, O. Tyulina, D. Dobrota, M. Matejovicova, V. Mezesova, A. Boldyrev, Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals *in vitro* and *in vivo*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 834 (1997) 661–665. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb52344.x>.
- [21] G.A. Figtree, C.C. Liu, S. Bibert, E.J. Hamilton, A. Garcia, C.N. White, K.K.M. Chia, F. Cornelius, K. Geering, H.H. Rasmussen, Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na^+ - K^+ pump regulation, *Circ. Res.* 105 (2009) 185–193. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199547>.
- [22] H. Kobori, M. Nangaku, L.G. Navar, A. Nishiyama, The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease, *Pharmacol. Rev.* 59 (2007) 251–287. <https://doi.org/10.1124/pr.59.3.3>.
- [23] X. Wang, I. Armando, K. Upadhyay, A. Pascua, P.A. Jose, The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update, *Curr. Opin. Nephrol.*

- Hypertens. 18 (2009) 412–420.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32832f5775>.
- [24] L. Rosivall, Intrarenal renin-angiotensin system, *Mol. Cell. Endocrinol.* 302 (2009) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.09.033>.
- [25] K.D. da Silveira, K.S. Pompermayer Bosco, L.R.L. Diniz, A.K. Carmona, G.D. Cassali, O. Bruna-Romero, L.P. de Sousa, M.M. Teixeira, R.A.S. Santos, A.C. Simões e Silva, M.A. Ribeiro Vieira, ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats, *Clin. Sci. (Lond)* 119 (2010) 385–394. <https://doi.org/10.1042/CS20090554>.
- [26] A. Sachse, G. Wolf, Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (2007) 2439–2446. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007020149>.
- [27] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [28] M. Feng, S. Whitesall, Y. Zhang, M. Beibel, L. D'Alecy, K. DiPetrillo, Validation of volume–pressure recording tail-cuff blood pressure measurements, *Am. J. Hypertens.* 21 (2008) 1288–1291. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.301>.
- [29] L.D. Vieira-Filho, E.V. Cabral, J.S. Farias, P.A. Silva, H. Muzi-Filho, A. Vieyra, A.D.O. Paixão, Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats, *Br. J. Nutr.* 111 (2014) 1932–1944. <https://doi.org/10.1017/S0007114513004236>.
- [30] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- [31] A. Vieyra, L. Nachbin, E. de Dios-Abad, M. Goldfeld, J.R. Meyer-Fernandes, L. de Moraes, Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 4247–4255.
- [32] G. Whittembury, F. Proverbio, Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices, *Pflugers Arch.* 316 (1970) 1–25.
- [33] C. Grubmeyer, H.S. Penefsky, The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 3718–3727.
- [34] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.

- [35] M. Pavan, Acute kidney injury following paraquat poisoning in India, Iran. J. Kidney Dis. 7 (2013) 64–66.
- [36] D. Tan, Y. Wang, B. Bai, X. Yang, J. Han, Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat, Food Chem. Toxicol. 78 (2015) 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.01.018>.
- [37] F.C.F. Muller-Ribeiro, C.C. Coimbra, M.daG. Rodrigues-Machado, M.A.P. Fontes, Evidence that central action of paraquat interferes in the dipsogenic effect of Ang II, Neurotoxicology 31 (2010) 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.03.002>.
- [38] M.T. Corasaniti, M.C. Strongoli, D. Rotiroti, G. Bagetta, G. Nisticò, Paraquat: a useful tool for the in vivo study of mechanisms of neuronal cell death, Pharmacol. Toxicol. 83 (1998) 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1998.tb01434.x>.
- [39] K. Shimizu, K. Ohtaki, K. Matsubara, K. Aoyama, T. Uezono, O. Saito, M. Suno, K. Ogawa, N. Hayase, K. Kimura, H. Shiono, Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat, Brain Res. 906 (2001) 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02577-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02577-X).
- [40] W. Cao, A. Li, J. Li, C. Wu, S. Cui, Z. Zhou, Y. Liu, C.S. Wilcox, F.F. Hou, Reno-cerebral reflex activates the renin-angiotensin system, promoting oxidative stress and renal damage after ischemia-reperfusion injury, Antioxid. Redox Signal. 27 (2017) 415–432. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6827>.
- [41] S.J. Seok, H.W. Gil, D.S. Jeong, J.O. Yang, E.Y. Lee, S.Y. Hong, Paraquat intoxication in subjects who attempt suicide: why they chose paraquat, Korean J. Intern. Med. 24 (2009) 247–251. <https://doi.org/10.3904/kjim.2009.24.3.247>.
- [42] F. Mohamed, Z. Endre, S. Jayamanne, T. Pianta, P. Peake, C. Palangasinghe, U. Chathuranga, K. Jayasekera, K. Wunnepuk, F. Shihana, S. Shahmy, N. Buckley, Mechanisms underlying early rapid increases in creatinine in paraquat poisoning, PLoS One 10 (2015) e0122357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122357>.
- [43] A.T. Black, J.P. Gray, M.P. Shakarjian, D.L. Laskin, D.E. Heck, J.D. Laskin, Increased oxidative stress and antioxidant expression in mouse keratinocytes following exposure to paraquat, Toxicol. Appl. Pharmacol. 231 (2008) 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.05.014>.
- [44] M. Samai, T. Hague, D.P. Naughton, P.R. Gard, P.K. Chatterjee, Reduction of paraquat-induced renal cytotoxicity by manganese and copper complexes of

- EGTA and EHPG, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 711–721. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.001>.
- [45] T. Wei, W. Tian, F. Liu, G. Xie, Protective effects of exogenous β -hydroxybutyrate on paraquat toxicity in rat kidney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447 (2014) 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.074>.
- [46] J. Han, Z. Zhang, S. Yang, J. Wang, X. Yang, D. Tan, Betanin attenuates paraquat-induced liver toxicity through a mitochondrial pathway, *Food Chem. Toxicol.* 70 (2014) 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.038>.
- [47] A.M. Mølck, C. Friis, The cytotoxic effect of paraquat to isolated renal proximal tubular segments from rabbits, *Toxicology* 122 (1997) 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(97\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(97)00088-7).
- [48] B.S.H. Chan, V.A. Lazzaro, J.P. Seale, G.G. Duggin, Characterisation and uptake of paraquat by rat renal proximal tubular cells in primary culture, *Hum. Exp. Toxicol.* 15 (1996) 949–956. <https://doi.org/10.1177/096032719601501202>.
- [49] B. George, D. You, M.S. Joy, L.M. Aleksunes, Xenobiotic transporters and kidney injury, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 166 (2017) 73–91. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.005>.
- [50] Y. Wang, B. Hai, L. Ai, Y. Cao, R. Li, H. Li, Y. Li, Tempol relieves lung injury in a rat model of chronic intermittent hypoxia via suppression of inflammation and oxidative stress, *Iran. J. Basic Med. Sci.* 21 (2018) 1238–1244. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.31716.7714>.
- [51] W. Wu, Y. Li, Lung injury caused by paraquat poisoning results in increased interleukin-6 and decreased microRNA-146a levels, *Exp. Ther. Med.* 16 (2018) 406–412. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6153>.
- [52] J. Huang, N. Ning, W. Zhang, Effects of paraquat on IL-6 and TNF- α in macrophages, *Exp. Ther. Med.* 17 (2019) 1783–1789. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7099>.
- [53] C. Wesseling, B. Van Wendel De Joode, C. Ruepert, C. León, P. Monge, H. Hermosillo, L.J. Partanen, Paraquat in developing countries, *Int. J. Occup. Environ. Health* 7 (2001) 275–286. <https://doi.org/10.1179/107735201800339209>.
- [54] M.F. Wilks, R. Fernando, P.L. Ariyananda, M. Eddleston, D.J. Berry, J.A. Tomenson, N.A. Buckley, S. Jayamanne, D. Gunnell, A. Dawson, Improvement in survival after paraquat ingestion following introduction of a new formulation

- in Sri Lanka, PLoS Med. 5 (2008) e49. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050049>.
- [55] N.D. Vaziri, M. Dicus, N.D. Ho, L. Boroujerdi-Rad, R.K. Sindhu, Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency, *Kidney Int.* 63 (2003) 179–185. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00702.x>.
- [56] A.C. Montezano, R.M. Touyz, Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 164–182. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5302>.
- [57] Y. Yan, A.P. Shapiro, S. Haller, V. Katragadda, L. Liu, J. Tian, V. Basrur, D. Malhotra, Z.J. Xie, N.G. Abraham, J.I. Shapiro, J. Liu, Involvement of reactive oxygen species in a feed-forward mechanism of Na/K-ATPase-mediated signaling transduction, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 34249–34258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.461020>.
- [58] M.M.C. Arroja, E. Reid, C. McCabe, Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke, *Exp. Transl. Stroke Med.* 8 (2016) 8. <https://doi.org/10.1186/s13231-016-0022-1>.
- [59] M. Meier, J. Menne, J.K. Park, M. Holtz, F. Gueler, T. Kirsch, M. Schiffer, M. Mengel, C. Lindschau, M. Leitges, H. Haller, Deletion of protein kinase C- ϵ signaling pathway induces glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis *in vivo*, *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (2007) 1190–1198. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005070694>.
- [60] M. Duong, X. Yu, B. Teng, P. Schroder, H. Haller, S. Eschenburg, M. Schiffer, Protein kinase C ϵ stabilizes β -catenin and regulates its subcellular localization in podocytes, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 12100–12110. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.775700>.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos concluir que a exposição dos ratos ao paraquat levou a uma perda proeminente de líquido urinário que pode ser consequente a um prejuízo na reabsorção tubular de Na^+ , que pode ser um fator de risco para o colapso vascular e morte prematura. Além disso, observamos que a perda urinária de fluido induzida pelo paraquat parece induzir estimulação do transporte de Na^+ cortical dependente de ATP como resposta compensatória, assim como, induz o aumento da expressão de componentes pró-hipertensivos do sistema renina-angiotensina que podem exacerbar posteriormente a lesão renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDAIR, P. M. The Frail Renin-Angiotensin System. **Clin Geriatr Med**, v.27, n.1, p.53-65, 2011.

ABDALLA, S.; LOTHER, H.; ABDEL-TAWAB, A.M.; QUITTERS,U. The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. **The journal of biological chemistry**,v.276, n.43, p.39721-26,2001.

AGARWAL, R. *et al.* Experience with paraquat poisoning in a respiratory intensive care unit in North India. **Singapore Med J**, v.47, p.1033-7, 2006.

AHMADIAN, E. *et al.* Role of renin-angiotensin system in liver diseases: An outline on the potential therapeutic points of Expert **Review of Gastroenterology & HepatologyIntervention**, p. 1-30, 2016.

ALPERT, N. M. *et al.* A novel method for noninvasive detection of neuromodulatory changes in specific neurotransmitter systems. **NeuroImage**, 2003.

ANDRADE JUNIOR, D.R. *et al.* Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J Bras Pneumol**, v.31, n.1, p.60-68, 2005.

ANDREOLI, S. P. Acute kidney injury in children. **Pediatr Nephrol**, v.24, p.253-63, 2009.

AYYUB, M.; NAJMI, A. K.; AKHTAR, M. Protective effect of irbesartan na Angiotensin (AT1) receptor antagonist in Unpredictable Chronic Mild Stress Induced Depression in Mice. **Drug Res**, v.67, p.59-64, 2017.

BAKER, K. M. *et al.* Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Regul.Pept**, v.120, .5-13, ;2004.

BANDAY, A. A.; LOKHANDWALA, M.F. Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.295, p.699-706, 2008.

BASILE, D.P.; ANDERSON, M.D.; SUTTON, T.A. Pathophysiology of acute kidney injury. **Compr Physiol**, v.2,p.1303-53,2012.

BRAMBILA, E. *et al.* Effect of mercury vapor exposure on metallothionein and glutathione s-transferase gene expression in the kidney of nonpregnant, pregnant, and neonatal rats. **J Toxicol Environ Health**, v.65, p.1273-1288, 2002.

BECKER, M. *et al.* Increased renal angiotensin II AT1 receptor function in obese Zucker rat. **Clin Exp Hypertens**, v.25, p.35-47, 2003.

BEGUIN, P. *et al.* The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. **EMBO J**, v.16, p.4250-4260, 1997.

BELLOMO, R. *et al.* Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information

technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Crit Care**, v.8, p.204-12,2004.

BELTOWSKI, J.; BORKOWSKA, E.; WÓJCICKA, G.; MARCINIAK, A. Regulation of renal ouabain-resistant Na⁺-ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. **Clinical and experimental hypertension**, v.29, p.189–207, 2007.

BIRI, A. *et al.* Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. **Gynecol Obstet Invest**, v.63, p.187-192, 2007.

BISMUTH, C., R. *et al.* Paraquat poisoning. **Drug Saf**, v.5, .243-251, 1990.

BISMUTH, C., R. *et al.* Prognosis and treatment of paraquat poisoning: A review of 28 cases. **J Toxicol Clin Toxicol**, v.19, p.461-474, 1982.

BONEGIO, R.; LIEBERTHAL, W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.11, p.301-308, 2002.

BOOTH, R.E.; JOHNSON, J.P.; STOCKAND, J.D. Aldosterone. **Adv Physiol Educ**, v.26, n.1, p.8-20, 2002.

BURNIER, M. *et al.* Renal sodium handling in patients with untreated hypertension and White coat hypertension. **Hypertension**, v.23, p.496-502, 1994.

BUS, J. S.; AUST, S. D.; GIBSON, J. E. Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 11, n. 1, p. 31-8, 1975.

CARLSTRON, M. *et al.* L-arginine or tempol supplementation improves renal and cardiovascular function in rats with reduced renal mass and chronic high salt intake. **Acta physiol**, v:207, p:732-41,2013.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 8, p. 1079–1084, 2001.

CAT, A.N.D. *et al.* Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. **Antioxidants & redox signaling**, v.19, n.10, p.1110-1120, 2013.

CHAN, B. S. H. *et al.*: Characterisation and uptake of paraquat by rat renal proximal tubular cells in primary culture. Human Exp. **Toxicol**, v.15, p.949-956, 1996.

CHERTOW, G. M. *et al.* Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. **J Am Soc Nephrol**, v.16, p.3365-70, 2005.

CHOUDHURY, D.; AHMED, Z. Drug-associated renal dysfunction and injury. **Nat Clin Pract Nephrol**, v.2, p.80-91, 2006.

DAMASCENO, D.C. *et al.* Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; CIONNA, L.; IPPOLITI, F.; GRECI, L. Synthesis and application of a novel sunscreen-antioxidant. **Free Radical Research**. v. 40, p. 485–494, 2006.

EDELSTEIN, C.L.; SCHRIER, R. Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Injury. **Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins**, 2001.

EL MERNISSI, G.; DOUCET, A. Quantitation of [3H] ouabain binding and turnover of Na-K-ATPase along the rabbit nephron. **Am. J. Physiol**, v.247, p.158-167, 1984.

ERICKSON, T. *et al.* A case of paraquat poisoning and subsequent fatality presenting to an emergency department. **J Emerg Med**, v.15, p.649-52, 1997.

FERAILLE, E.; DIZIN, E. Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting Duct. **J Am Soc Nephrol**, v. 27, p.1-10, 2016.

FÉRAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. **Physiol Rev**, v. 81, n. 1, p. 345-418, jan, 2001.

FERNANDES-ROSA, F.L.; ANTONINI, S.R.R.. Resistência aos Mineralocorticóides: Pseudo-hipoaldosteronismo Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.51, n.3, p.373-81,2007.

FIGTREE, G.A.; LIU, C-C.; BIBERT, S.; HAMILTON, E.J.; GARCIA, A.; WHITE, C.N.; CHIA, K.K.M.; CORNELIUS, F.; GEERING, K.; RASMUSSEN, H.H. Reversible oxidative modification a key mechanism of Na⁺-K⁺ pump regulation. **Circulation Research**, v.105, p.185–193, 2009.

FRISOLI, T.M.; SCHMIEDER, R.E.; GRODZICKI, T.; MESSERLI, F.H. Salt and hypertension: is salt dietary reduction worth the effort? **The American Journal of Medicine**. v. 125, n. 5, 433-439, 2012.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v.264, p.224-236, 2008.

GARG, L.C.; KNEPPER, M.A.; BURG, M.B. Mineralocorticoid effects on Na-K-ATPase in individual nephron segments. **Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol**, v.240, p.536-544, 1981.

GARRIDO-GIL, P. *et al.* Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. **Brain Struct Funct**, 2017.

GARVIN JL. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na/K ATPase in at proximal straight tubules. **J Am Soc Nephrol**, v.1, p. 1146–1152, 1991.

GAWARAMMANA, I. B.; BUCKLEY, N.A. Medical management of paraquat ingestion. **Br J Clin Pharmacol**, v.72, .745-57, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 10º edição. **Guanabara Koogan**, 2002.

GEORGE, B. *et al.* Xenobiotic transporters and kidney injury. **Adv Drug Deliv Rev**, v.116, .73-91, 2017.

GILDEA, J.J. Dopamine and Angiotensin as Renal Counter Regulatory Systems Controlling Sodium Balance. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 18, n. 1, p. 28-32, 2009.

GU, S.Y.; YEH, T.Y.; LIN, S.Y.; PENG, F.C. Unfractionated bone marrow cells attenuate paraquat-induced glomerular injury and acute renal failure by modulating the inflammatory response. **Scientific Reports**, v.6, p.232-87, 2016.

GROSS, J. L.; NEHME, M. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v.45, n.3, p. 16-26, jul./set.1999.

HAHN, A.W. *et al.* Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. **FEBS Lett**, v.347,n.3, p.178-80,1994.

HAMMER, A. *et al.* Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.113, n.49, p.14109-114, 2016.

HARRIS, P.J.; YOUNG, J.A. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. **Pflugers Arch**, v. 367, n. 295–297, 1977.

HAVASI, A.; BORKAN, S. C. Apoptosis and acute kidney injury. **Kidney Int**, v.80, n.1, p.29-40, 2011.

HEZEL, M.; PELELI, M.; LIU, M.; ZOLLBRECHT, C.; JENSEN, B.L.; CHECA, A.; GIULIETTI, A.; WEELOCK, G.E.; LUNDBERG, J.O.; WETZBERG, E.; CARLSTOM, M. Dietary nitrate improves age-related hypertension and metabolic abnormalities in rats via modulation of angiotensin II receptor signaling and inhibition of superoxide generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.99, p.87–98, 2016.

HOSTE, E.A. *et al.* Acute renal failure in patients with sepsis in a surgical ICU: predictive factors, incidence, comorbidity, and outcome. **J Am Soc Nephrol**, v.14, p.1022-30, 2003.

HOSTE, E. A. *et al.* RIFLE. criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. **Crit Care**, v10, n.73, 2006.

HONG, G. L. *et al.* Cycloartenyl Ferulate Inhibits Paraquat-Induced Apoptosis in HK-2 Cells With the Involvement of ABCC1. **J Cell Biochem**, v.117, n.4, p.872-80, 2016.

HU, P. *et al.* Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and sodium transport in alveolar type II cells. **Am J Physiol**, v.266, p.628-34, 1994.

HUERTA-ALARDÍN, A. L.; VARON, J.; MARIK, P. E. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis - an overview for clinicians. **Crit Care**, v.9, p.158-69, 2005.

HUMPHREYS, B. D. *et al.* Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. **Cell Stem Cell**, v.2, p.284-91, 2008.

INGBAR, D. H.; WEDNT, C.H. The sodium pump and oxidant stress: If only it were so simple. **J Lab Clin Med**, v.130, n.2, p.119-122, 1997.

ITO, S. Characteristics of isolated perfused juxtaglomerular apparatus. **Kidney Int Suppl**, v.67, p.46-8, 1998.

JIANG, M. *et al.* Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. **Kidney Int**, v.82, p.1271-82, 2012.

KAROWICZ-BILINSKA, A.; SUZIN, J.; SIEROSZEWSKI, P: Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with intrauterine growth retardation. **Med Sci Monit**, v.83, p.CR211-CR216, 2002.

KAUFMAN, J. *et al.* Community Acquired Acute Renal Failure. **Am J Kidney Dis**, v.17, p.191-8, 1991.

KELLY, K. J. Acute renal failure: much more than a kidney disease. **Semin Nephrol**, v.26, p.105-13, 2006.

KIM, K.J.; ROBISION, T. Enhancement of airway epithelial Na,KATPase actMty by NO₂ and protective role of nordihydroguaiaretic acid. **Am J Physiol**, v.270, p.266-72, 1996.

KOBORI, H, *et al.* The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol Rev**, v.59, p.251–87, 2007.

KONE, B. C: Epigenetics and the control of the collecting duct epithelial sodium CHANNEL. **SEMIN NEPHROL**, V.33, P.383–391, 2013.

KURELLA, E.; KUKLEY, M.; TYULINA, O.; DOBROTA, D.; MATEJOVICOVA, M.; MEZESOVA, V.; BOLDYREV, A. Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. **Annals of the New York Academy of Science**, v.834, p.661–665, 1997.

KRISHNA, M. C.; DEGRAFF, W.; HANKOVSKY, O.; SA´ R, C. P.; KA´ LAI, T.; JEKO, J.; RUSSO, A.; MITCHELL, J. B. Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. **J Med Chem**, v. 41, p. 3477–3492, 1998.

KUNIN, M. *et al* Urinary organic anion transporter protein profiles in AKI. **Nephrol Dial Transplant**, v.27, p.1387-1395, 2012.

LAFRANCE, J.P.; MILLER, D.R. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.21, p.345-352, 2010.

LAMEIRE, N. *et al.* Acute renal failure. **Lancet**, v.365, p.417–430, 2005.

LAMEIRE, N.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R: The changing epidemiology of acute renal failure. **Nat Clin Pract Nephrol**, v.2, p.364-77, 2006.

LAMEIRE, N.H. *et al.* Acute kidney injury: an increasing global concern. **Lancet**, v.382, p.170-9, 2013.

LARA, L.S. *et al.* The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidyl inositol phospholipase C β -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.639-47, 2008.

LEFKOWITZ, R.J.; SHENOY, S.K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. **Science**, v.308, n.5721, p.512-7, 2005.

LEROY, V. *et al.* Aldosterone activates NF-kappaB in the collecting duct. **J Am Soc Nephrol**, v.20, p.131–144, 2009

LEVY, E.M.; VISCOLI, C.M.; HORWITZ, R.I. The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. **JAMA**, v.275, p.1489-94, 1996.

LI, X.C.; ZHUO, J.L. Recent Updates on the Proximal Tubule Renin-Angiotensin System in Angiotensin II-Dependent Hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v.18, n.8, p.63, 2016.

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. **Experimental Nephrology and genetics**, v.30, p.66–76, 2015.

LIMA, M. C. O sistema renina-angiotensina na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos. 2011.

LIVINGSTON, M.J.; DONG, Z. Autophagy in acute kidney injury. **Semin Nephrol**, v.34, p.17-26, 2014.

MACIEL, R.P. A presença do sistema renina angiotensina em vários órgãos - revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n.12, 2013.

MAKRIS, K.; SPANOU, L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes, **Clin Biochem Rev**, v. 37, n.2, p.85-98, 2016.

MATSUI, H.; ANDO, K.; KAWARAZAKI, H.; NAGAE, A.; FUJITA, M.; SHIMOSAWA, T. *et al.* Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. **Hypertension**. v. 52, p. 287–294, 2008.

MAY, J. M., QU, Z. C., JULIAO, S.; COBB, C.E. Ascorbic acid decreases oxidant stress in endothelial cells caused by the nitroxide tempol. **Free Radical Research**. v. 39, p. 195–202, 2005.

METNITZ, P.G. *et al.* Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. **Crit Care Med**, v.30, p.2051-8, 2002.

MILLER, P. D.; *et al.* Polyuric Prerenal Failure. **Arch Intern Med**, v.140, n.7, p.907-9, 1980.

MOECKEL, G. W. Pathologic Perspectives on Acute Tubular Injury Assessment in the Kidney Biopsy. **Seminars in Nephrology**, v.38, n.1, p.21–30, 2018.

MOLCK, A.M.; FRIIS, C. The cytotoxic effect of paraquat to isolated renal proximal tubular segments from rabbits. **Toxicology**, v.122, p.123-132, 1997.

MOLITORIS, B.A. Acute renal failure. **Drugs Today (Barc)**, v.35, p.659-666, 1999.

MOLITORIS, B. A.; GEERDES, A.; MCINTOSH, J. R. Dissociation and redistribution of Na⁺,K⁺(p)-ATPase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular ATP depletion. **J Clin Invest**, v.88, p.462-9, 1991.

MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: **Antioxid Redox Signal**, v.20, p.164-182, 2014.

NAGASE, M.; MATSUI, H.; SHIBATA, S.; GOTODA, T.; FUJITA, T. Salt-induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor: role of oxidative stress. **Hypertension**, v. 50, p. 877–883, 2007.

NICKEL, A. K.; OHLHAAS, M.; MAACK, C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. **J. Mol.Cell.Cardiol**, v.73, p.26–33, 2014.

NISHIYAMA, A.; ABE, Y. Aldosterone and renal injury. **Nippon Yakurigaku Zasshi**. v. 124, p. 101–109, 2004.

NISTALA, R. *et al.* RAAS-mediated Redox effects in Chronic Kidney Disease. **Transl Res**, v.153, n.3, p.102-113, 2009.

OMURA, T. *et al.* Angiotensin blockade inhibits SIF DNA binding activities via STAT3 after myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v.32, n.1, p.23–33, 2000.

PADIA, S.H.; HOWELL, N.L.; SIRAGY, H.M.; CAREY, R.M. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type I receptor-blocked rat. **Hypertension**, v.47, p.537-44, 2006).

PALMER, L.G.; SCHERMANN, J. Integrated Control of Na Transport along the Nephron. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.10, p.676-87, 2015.

PAVAN, M. Acute Kidney Injury Following Paraquat Poisoning in India. **Irã J Kidney Dis**, v.7, n.1, p.64-66, 2013.

PERES, L. A. B.; JUNIOR CUNHA, A. C.. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares. **J Bras Nefrol**, v.35, n.4, p.332-340, 2013.

PETER, B. *et al.* Role of lipid peroxidation and DNA damage in paraquat toxicity and the interaction of paraquat with ionizing radiation. **Biochem Pharmacol**, v. 43, n. 4, p. 705-15, 1992.

QUEIROZ-MADEIRA, E. P. *et al.* Na⁺-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT(1) receptor target in the development of hypertension. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, n. 3, p. 360–366, 2009.

RECTOR, F. C. JR. Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by the proximal tubule. **Am J Physiol**, v.244, p.F461-F471, 1983.

REJA, V. *et al.* Upregulation of angiotensin AT1 receptor and intracellular kinase gene expression in hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.33, p.690–695, 2006.

REWA, O.; BAGSHAW, S. M. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. **Nat Rev Nephrol**, v.10, p.193–207, 2014.

ROCAFULL, M. A. *et al.* Isolation and cloning of the K⁺-independent, ouabain-insensitive Na⁺-ATPase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1808, n. 6, p. 1684–700, jun. 2011.

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

SACHSE, A.; WOLF, G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. **J Am Soc Nephrol**, v.18, p.2439–2446, 2007.

SAMAI, M.; SHARPE, M. A.; GARD, P. R.; CHATTERJEE, P. K. Comparison of the effects of the superoxide dismutase mimetics EUK-134 and tempol on paraquat-induced nephrotoxicity. **Free Radic Biol Med**, v. 43, p. 528–534, 2007.

SAMUNI, A.M.; LIPMAN, A.; BARENHOLZ, Y. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. **Chem Phys Lipids**, v. 105, p. 121–134, 2000.

SANCHEZ-LOZADA, L. G.; SOTO, V.; TAPIA, E.; VILA-CASADO, C.; SAUTIN, Y. Y.; NAKAGAWA, T. *et al.* Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. **Am Journal Physiol Renal Physiol**. v. 295, p. 1134–1141, 2008.

SANJULIANI, A.F. *et al.* Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.10, n.3, p.20–30, 2011.

SAWHNEY, S.; FRASER, S.D. Epidemiology of AKI: Utilizing Large Databases to Determine the Burden of AKI. **Adv Chronic Kidney Dis**, v.24, n.4, p. 194–204, 2017.

SCHIEFFER B. *et al.* Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. **Circulation**, v.101, n.12, p.1372–1378, 2000.

SCHLIEFER, K. *et al.* Nephrogenic diabetes insipidus in a patient taking cidofovir. **Lancet**, v.350, p.413–4,1997.

SCHNACKENBERG, C. G.; WELCH, W. J.; WILCOX, C.S. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. **Hypertension**, v.32, p.59–64, 1998.

SCHNACKENBERG, C. G.; WILCOX, C. S. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandina f2alpha. **Hypertension**, v.33, p.424–428, 1999.

SCHNERMANN, J.; BRIGGS, J.P. Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice. **Kidney Int**, v.74, p. 418-26, 2008.

SCHRADER, L. I. *et al.* IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.27, v.12, p.2576-2581, 2007.

SEIGNEUX, S. *et al.* NF-kappaB inhibits sodium transport via down-regulation of SGK1 in renal collecting duct principal cells. **J Biol Chem**, v.283, p.25671-25681, 2008.

SEOK, S. J. *et al.* Paraquat intoxication in subjects who attempt suicide: why they chose paraquat. **Korean J Intern Med**, v.24, p.247–251, 2009.

SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant in the perinatal period. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.10, p.324-328, 2007.

SILVA, E.; GOMES, P.; SOARES-DA-SILVA, P. Overexpression of Na⁺/K⁺-ATPase Parallels the Increase in Sodium Transport and Potassium Recycling in an In Vitro Model of Proximal Tubule Cellular Ageing. **J. Membrane Biol**, v.212, p.163-175, 2006.

SILVA, V. T. C.; YU, L. Consulta nefrológica em 10 minutos: abordagem clínica da oligúria. Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da USP. **J Bras Nefrol**, v.31, n.3, p.173-4, 2009.

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

SIROTA, J. C.; KLAWITTER, J.; EDELSTEIN, C. L. Biomarkers of acute kidney injury. **J Toxicol**, v.2011; p.328-120, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA - SBN. **Insuficiência renal aguda**, 2007.

SOLTOFF, S. P.; MANDEL, L. J. Amiloride directly inhibits the Na, K-ATPase activity of rabbit kidney proximal tubules. **Science**, v.220, p.957–958, 1983.

SONG, J.; HU, X.; SHI, M.; KNEPPER, M.A.; ECELBARGER, C.A. Effects of dietary fat, NaCl, and fructose on renal sodium and water transporter abundances and systemic blood pressure. **AJP-Renal Physiology**, v. 287, n. 6, p. 1204–1212, 2004.

STEVENS, L. A.; LEVEY, A. S. Measurement of kidney function. **Med Clin North Am**, v. 89, p.457-73, 2005.

SUNTRES, Z.E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v.180, p.65-77, 2002.

SUZUKI, C. *et al.* Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun**, v.368, p.100-6, 2008.

TOGEL, F.; WESTENFELDER, C. Recent advances in the understanding of acute kidney injury. **F1000Prime Rep**, v.6, p.83, 2014.

TOMITA, M. *et al.* Paraquat-induced gene expression in rat kidney. **Arch Toxicol**, v.80, p.687-93, 2006.

VAJAPEY, R. *et al.* The impact of age-related dysregulation of the angiotensin system on mitochondrial redox balance. **Front Physiol**; v.5, p.1-17, 2014.

VALON, V. Tubular Transport in Acute Kidney Injury: Relevance for Diagnosis, Prognosis and Intervention. **Nephron**, v.134, p.160-66, 2016.

VAN VLEET, T. R.; SCHNELMAN, R. G. Toxic Nephropathy: Environmental Chemicals. **Semin Nephrol**, v.23, N.5, p.500-508, 2003.

VAZIRI, N.D.; DICUS, M.; HO, N.D.; BOROUJERDI-RAD, L.; SINDHU, R.K: Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. **Kidney Int**, V.63, P.179-185, 2003.

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

VIEYRA, A. *et al.* The Role of the Second Na⁺ Pump in Mammals and Parasites. **Regulation of Membrane Na⁺-K⁺- ATPase, advances in biochemistry in health and disease**, 2016.

VINCIGUERRA, M. *et al.* Intracellular Na⁺ controls cell surface expression. of Na,K-ATPase via a cAMP-independent PKA pathway in mammalian kidney collecting duct cells. **Mol Biol Cell**, v.14, p.2677–2688, 2003

WANG, X.; BONVENTRE, J. V, PARRISH, A. R. The aging kidney: increased susceptibility to nephrotoxicity. **Int J Mol Sci**, v.15, p15358-76, 2014.

WANG, Y.B. *et al.* Sodium transport is modulated by p38 kinase-dependent crosstalk between ENaC and Na,K-ATPase in collecting duct principal cells. **J Am Soc Nephrol**, v.25, p.250–259, 2014

WANG, Z.; HOLTHOFF, J.H.; SEELY, K.A.; PATHAK, E.; SPENCER, H.J. 3RD; GOKDEN, N.; MAYEUX, P.R. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. **The American journal of pathology**, v.180, p.505–16, 2012.

WANGSIRIPAIKAN, A. *et al.* Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. **Kidney Int**, v.59, p.932-40, 2001.

WEI, Q. *et al.* The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. **Kidney Int**, v.72, p.53-62, 2007.

WEIDANZ, J. A. *et al.* ATR blockade reduces IFN-gamma production in lymphocytes in vivo and in vitro. **Kidney Int**, v.67, n.6, p.2134–2142, 2005.

WENDT, C.H. Regulatory regions of Na,K-ATPase beta-1 gene during hyperoxia [abstract]. **FASEB J**, p.492-85, 1996.

WESSELING, C. *et al.* Paraquat in developing countries. **Int J Occup Environ Health**, v.7 ,p.275–286, 2001.

WILKS, M. F. *et al.* Improvement in survival after paraquat ingestion following introduction of a new formulation in Sri Lanka. **PLoSMed**, v.5, n.2, p.49, 2008.

WRIGHT, D.T. *et al.* Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. **Environmental Health Perspectives**, v.102, sup.10, p.85-90, 1994.

WU, J. *et al.* Cell signaling associated with Na⁺/K⁺-ATPase: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase IA/AKT by ouabain is independent of Src. **Biochemistry**, v.52, p.9059-9067, 2013.

WUNNAPUK, K. *et al.* Renal biomarkers predict nephrotoxicity after paraquat. **Toxicology Letters**, v.222, p.280-88, 2013.

WHITTEMBURY, G.; WINDHAGER, E.E. Electrical potential difference measurements in perfused single proximal tubules of Necturus kidney. **J Gen Physiol**, v.44, p.679-687, 1961.

YAMAGISHI, S. I. *et al.* Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). General Subjects*, v.1820, p.663-671, 2012.

YAN, Y. *et al.* Involvement of reactive oxygen species in a feed-forward mechanism of Na/K-ATPase-mediated signaling transduction. **JBiol Chem**, v.288, p.34249–34258, 2013.

YAN, Y. *et al.* Protein Carbonylation of an Amino Acid Residue of the Na/K-ATPase α 1 Subunit Determines Na/K-ATPase Signaling and Sodium Transport in Renal Proximal Tubular Cells. **Journal of the American Heart Association**, v.5, p.1-11, 2016.

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.

YINGST, D.R.; MASSEY, K.J.; ROSSI, N.F.; MOHANTY, M.J.; MATTINGLY, R.R. Angiotensin II directly stimulates activity and alters the phosphorylation of Na-K-ATPase in rat proximal tubule with a rapid time course. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 287, n. 4, p. 713–721, 2004.

YOON, S. P. *et al.* Protective effects of chitosan oligosaccharide on paraquat-induced nephrotoxicity in rats. **Food Chem Toxicol**, v.49, n.8, p.1828-33, 2011.

YOUNG, W. P. *et al.* The Risk Factors and Outcome of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Units. **Korean J Intern Med**, v.25, n.2, p.181-7, 2010.

ZHANG, G. *et al.* Protective Effect of Tempol on Acute Kidney Injury Through PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway. **Kidney Blood Press Res**, v.41, n.2, p.129-138, 2016.

ZHAO, W. *et al.* Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. **American Journal of nephrology**, v.28, p.548-554, 2008.