

MARIANA MOURA NASCIMENTO

**Avaliação dos efeitos do Nebivolol sobre a nefrotoxicidade em ratos
tratados com Tenofovir**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Dr. Rildo Aparecido Volpini

Co-orientadora: Dra. Daniele Canale Cavicchioli

São Paulo - SP

2023

MARIANA MOURA NASCIMENTO

**Avaliação dos efeitos do Nebivolol sobre a nefrotoxicidade em ratos
tratados com Tenofovir**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Dr. Rildo Aparecido Volpini

Co-orientadora: Dra. Daniele Canale Cavicchioli

São Paulo - SP

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Mariana Moura

Avaliação dos efeitos do Nebivolol sobre a
nefrotoxicidade em ratos tratados com Tenofovir /
Mariana Moura Nascimento. -- São Paulo, 2023.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientador: Rildo Aparecido Volpini.

Coorientadora: Daniele Canale Cavicchioli.

Descritores: 1.Nefrotoxicidade 2.Tenofovir
3.Nebivolol 4.Injúria renal aguda 5.Hipertensão
6.Disfunção endotelial 7.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-336/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM12), Disciplina de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Proc. nº 88887.647842/2021-00) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio à pesquisa (Proc.: nº 2019/20840-0, nº 2018/12297-1 e nº 2018/04930-6).

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais Aparecido (*In memoriam*) e Rosimeire que foram pilares na minha formação como ser humano e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis da minha formação acadêmica.

Dedico este estudo à minha família, por estar presente em todos os momentos e por todo amor, incentivo e apoio.

Agradecimentos

A vida é como um ciclo onde tudo acontece, um conjunto de emoções, sentimentos, alegrias, sensações e desejos. Cada ciclo por qual passamos é repleto de novas descobertas e desafios. Iniciar o mestrado não foi uma decisão tão difícil. Durante a minha iniciação científica eu já tinha certeza que queria seguir na área da pesquisa, pois tinha um anseio por aprender coisas novas, por fazer ciência e por me aventurar nesse “mundo” que era novo para mim. No entanto, não esperava a chegada de uma pandemia, que mudou completamente a rotina a qual estávamos acostumados. A pandemia gerou insegurança, medo e novos desafios. Pelo apoio e motivação incontestável da minha família e dos meus orientadores que não me deixaram desistir, a minha sincera gratidão. Obrigada por sempre desejarem o melhor para mim, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo em meu caminho e, principalmente, pelo carinho imenso que vocês têm por mim. Agradeço por sempre terem acreditado e depositado a confiança em mim ao longo de todos esses anos. Esse apoio foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui.

Determinada a seguir minha carreira acadêmica, conversei com meu orientador de iniciação científica, o **Prof. Dr. Joel C. Heimann**, sobre meu interesse em fazer mestrado. Ele me apresentou ao **Dr. Rildo A. Volpini**, que abriu as portas do LIM 12 e me ofereceu muito mais do que eu esperava. Além de me aceitar como aluna de mestrado e me presentear com um ótimo projeto de pesquisa, tive o privilégio de trabalhar com um professor pelo qual tenho como exemplo e que admiro pelo seu caráter, incentivo e inteligência ímpar. Obrigada pela oportunidade, pela confiança e

por todos estes anos de aprendizado. Seus ensinamentos foram fundamentais para a minha formação profissional e pessoal.

Meus mais sinceros agradecimentos à minha co-orientadora **Dra. Daniele Canale Cavicchioli**, uma excelente profissional, extremamente focada e dedicada em tudo que faz, exemplo de pesquisadora. Obrigada por ter me passado um pouco do seu conhecimento que foram fundamentais no meu desenvolvimento e por me auxiliar com todas as etapas da condução deste projeto. Agradeço por todo suporte e por toda a atenção dedicada e por ter acreditado no meu potencial.

À **Dra. Ana Carolina** de Bragança Vicianá, agradeço por sua disposição em ajudar sempre, por todo conhecimento, pelos conselhos e por me ensinar a fazer sutura nos nossos ratinhos. Meus agradecimentos também a **Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu**, sempre estilosa e com seu bom humor e alto astral. Me senti acolhida como uma filha com seu “jeitinho” peculiar de ensinar e transmitir seus conhecimentos. Uma profissional sempre disposta a ajudar a todos ao seu redor, sempre deixando tudo mais agradável e fácil. Obrigada por toda ajuda durante esse tempo. Sou muito grata.

Agradeço a toda equipe do LIM 12, principalmente aos chefes do laboratório Prof. **Dr. Antonio Carlos Seguro** e **Prof. Dr. Antonio Jose de Barros Magaldi**, por terem me recebido em seu laboratório e por todo o incentivo. Não posso deixar de agradecer aos nossos secretários **Nivaldo Francisco da Silva** e **Iracene Aparecida Boccia (Ceninha)**, pela presença e pelo suporte. A solicitude e o carinho de vocês foram cruciais ao longo desse trajeto. Muito obrigada.

À querida **Miriam Pellegrini**, minha professora de inglês, com quem compartilhei minhas angústias e meus medos no processo da prova de proficiência. Obrigada por todo o auxílio dedicado à transmissão de conhecimento da língua inglesa.

Não poderia deixar de agradecer a minha “amiguinha” **Ms. Desiree Rita Denelle Bernardo**, que esteve sempre comigo ajudando em tudo, me dando apoio, me incentivando a nunca desistir. Foi com essa pessoa muito especial que compartilhei minhas angústias e descobri que o sucesso é sempre melhor quando vem em conjunto. Agradeço por todos os nossos momentos em que estivemos juntas. Levarei esta amizade por toda vida.

Agradeço ao designer **Carlos Gustavo Zagatto**, membro do Projeto Homem Virtual da FMUSP, pela elaboração das figuras apresentadas na introdução desta dissertação e ao **Dr. Chao Lung Wen**, chefe da disciplina do departamento de Telemedicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por possibilitar essa parceria.

Por fim, quero agradecer a Deus por ter me concedido essa oportunidade, por me guiar, me abençoar e iluminar sempre o meu caminho. Quero ainda agradecer o apoio da minha família que sempre acreditou em mim. Esse apoio foi fundamental para que eu pudesse compartilhar esse momento tão grandioso e feliz da minha formação acadêmica. Um agradecimento especial a minha mãe **Rosimeire**, que foi de extrema importância ao longo dessa jornada. Por seu apoio, seu companheirismo nos momentos mais difíceis, seu amor imensurável e pelos melhores conselhos eu pude me tornar a pessoa que sou hoje. O meu sucesso é o resultado de toda a sua dedicação. Ao meu pai **Aparecido** (*In memoriam*), que mesmo não estando mais

presente entre nós, continua sendo a minha maior força e inspiração na vida. À minha vó **Dolores**, por todo amor e incentivo e por ser meu exemplo de vida. Ao meu namorado **Victor Gabriel**, com quem tenho dividido meus momentos alegres e tristes, agradeço pelo companheirismo, compreensão e por todo amor. Obrigada por fazerem parte da minha vida!!

Às agências de fomento, CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

Aos nossos queridos ratinhos. Sem eles a ciência não existiria.

O meu muito obrigado e minha eterna gratidão a todos vocês supracitados.

“Nós nunca nos demos conta do quão essencial são as coisas mais simples em nossas vidas”

Pedro Miranda

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e Siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Tenofovir Disoproxil Fumarato	2
1.2 Nefrotoxicidade induzida por Tenofovir	3
1.3 Nebivolol no tratamento da nefrotoxicidade induzida por Tenofovir	8
1.4 Justificativa do estudo	10
2. OBJETIVO	11
2.1 Objetivos gerais	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. METODOLOGIA	11
3.1 Animais e protocolo experimental	11
3.2 Grupos experimentais	12
3.3 Estudos de gaiola metabólica: volume urinário e proteinúria.....	13
3.4 Determinação da taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de inulina, pressão arterial média e fluxo sanguíneo renal.....	13
3.5 Análise Histo-morfométrica.....	15

3.6	Análise Imuno-histoquímica.....	15
3.7	Extração e quantificação de proteínas: WB e ELISA.....	16
3.8	Análise da expressão proteica: WB.....	16
3.9	Quantificação de Angiotensina II, MCP-1, TGF- β 1 e Colágeno III no tecido renal.....	17
3.10	Avaliação do estado redox: Ensaio de TBARS e GSH.....	17
3.11	Análise Estatística.....	18
4.	RESULTADOS	19
5.	DISCUSSÃO.....	39
6.	CONCLUSÃO	47
7.	ANEXOS.....	48
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AGT	Angiotensinogênio
ART	Terapias antirretrovirais
AT1	Receptor do tipo 1 de angiotensina
ATP	Adenosina trifosfato
C	Controle
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DP	Dieta Padrão
DRC	Doença Renal Crônica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
GSH	Glutationa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hOAT-1	Ânions Orgânicos tipo 1

hOAT-3	Ânions Orgânicos tipo 3
HE	Hematoxilina-eosina
HO-1	Heme-oxigenase 1
IRA	Injúria Renal Aguda
IP ₃	Inositol Trifosfato
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
JG12	Aminopectidase P
MEC	Matriz Extracelular
MnSOD	Manganês Superóxido Dismutase
MRP-2	Proteínas de Resistência a Múltiplos Fármacos tipo 2
MRP-4	Proteínas de Resistência a Múltiplos Fármacos tipo 4
MCP-1	Proteína Quimiotática para Monócitos 1
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NFκ-B	Fator Nuclear κ-B
NBV	Nebivolol
NOX	NADPH Oxidase
Nrf2	Fator Nuclear Eritroide 2
nRTI	Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa

PIP ₂	Fosfatidilinositol Bifosfato
PAM	Pressão Arterial Média
P _{na}	Sódio plasmático
P _k	Potássio plasmático
P _p	Fosfato plasmático
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RVR	Resistência Vascular Renal
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SDS-PAGE	SDS- <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TP	Túbulo Proximal
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TDF	Tenofovir
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformador beta 1
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
U _{prot} V	Excreção Urinária de Proteína
VU	Volume Urinário
WB	<i>Western Blotting</i>
ZDF	Ratos Zucker Obesos Diabéticos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Via de transporte celular do tenofovir no túbulo proximal.....	5
Figura 2.	Fluxograma das vias de sinalização envolvidas na patogênese nefrotoxicidade induzida por tenofovir.....	7
Figura 3.	Taxa de Filtração Glomerular (TGF) avaliada pelo clearance inulina.....	18
Figura 4.	Proteinúria.....	19
Figura 5.	Pressão Arterial Média (PAM)	20
Figura 6.	Concentração plasmática e tecidual de Angiotensina II (Ang II)	21
Figura 7.	Concentração plasmática de Aldosterona	21
Figura 8.	Fluxo Sanguíneo Renal (FSR) e Resistência Vascular Renal (RVR)	22
Figura 9.	Concentração plasmática de ADMA.....	23
Figura 10.	Análise semiquantitativa da expressão proteica de eNOS e iNOS no tecido renal.....	24
Figura 11.	Expressão da aminopeptidase P (JG12) no córtex renal	25
Figura 12.	Escore de lesão tubular renal.....	27
Figura 13.	Quantificação do fator de crescimento TGF- β 1 no tecido renal.....	28
Figura 14.	Quantificação de colágeno do tipo III (Col III) no tecido renal.....	29
Figura 15.	Quantificação de proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) no tecido renal.....	29
Figura 16.	Expressão de células CD68+ (Macrófagos M1 +M2) no córtex renal.....	31
Figura 17.	Expressão de células CD3+ (Células T) no córtex renal.....	32

Figura 18	Concentração plasmática TBARS, excreção urinaria de TBARS e concentração de TBARS no tecido renal.....	33
Figura 19.	Concentração plasmática de glutathiona (GSH).....	34
Figura 20.	Análise semiquantitativa da expressão proteica de p47 ^{phox} e p67 ^{phox} no tecido renal	35
Figura 21.	Análise semiquantitativa da expressão proteica de MnSOD no tecido renal.....	36
Figura 22.	Análise semiquantitativa da expressão proteica de Nrf2 e HO-1 no tecido renal.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Peso corporal, parâmetros funcionais e hemodinâmicos	47
Tabela 2.	Parâmetros bioquímicos	47
Tabela 3.	Avaliação do estado redox.....	48
Tabela 4.	Avaliação da expressão/concentração proteica no tecido renal.....	48
Tabela 5.	Análise histomorfológica e avaliação imuno-histoquímica em tecido renal.....	49

Nascimento MM. Avaliação dos efeitos do Nebivolol sobre a nefrotoxicidade em ratos tratados com Tenofovir [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

RESUMO

O tenofovir disoproxil fumarato (TDF), componente amplamente prescrito em regimes antirretrovirais, tem sido associado à nefrotoxicidade. O nebivolol é um bloqueador seletivo do receptor β -1 adrenérgico de terceira geração e pode proteger a estrutura e a função renal através da supressão do estresse oxidativo e do aumento da síntese de óxido nítrico (NO). Nosso objetivo foi investigar se o tratamento com nebivolol poderia ser uma estratégia terapêutica eficaz para mitigar a nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir. Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: 1- controle (C), animais que receberam dieta padrão (DP) por 30 dias; 2- NBV, animais que receberam DP por 30 dias e DP adicionada de nebivolol (100 mg/kg de DP) do 15º ao 30º dia; 3- TDF, animais que receberam DP adicionada de tenofovir (300 mg/kg de DP) por 30 dias; e 4- TDF+NBV, animais que receberam DP adicionada de tenofovir por 30 dias e DP adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia. A exposição prolongada ao tenofovir levou à injúria renal e induziu a hipertensão, a disfunção endotelial e o estresse oxidativo. O tratamento com nebivolol recuperou parcialmente a taxa de filtração glomerular, normalizou a pressão arterial e a lesão renal, e atenuou a vasoconstrição renal. A administração de nebivolol contribuiu para a redução nos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA) e promoveu um aumento na óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), os quais foram acompanhados de uma diminuição na atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do infiltrado de macrófagos e células T. Além disso, o nebivolol foi responsável pela manutenção adequada dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona (GSH) e foi associado à redução da expressão renal das subunidades da NADPH oxidase (NOX). Em conjunto, esses achados sugerem que a administração de nebivolol pode ser uma alternativa para retardar a progressão da doença renal decorrente da nefrotoxicidade promovida pelo uso de tenofovir.

Palavras-chave: nefrotoxicidade, tenofovir, nebivolol, injúria renal, hipertensão, disfunção endotelial.

Nascimento MM. Evaluation of the effects of Nebivolol on tenofovir-induced nephrotoxicity in rats [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

ABSTRACT

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), a widely prescribed component in antiretroviral regimens, has been associated with nephrotoxicity. Nebivolol is a third generation selective β -1 adrenergic receptor blocker and may protect renal structure and function through the suppression of oxidative stress and enhancement of nitric oxide (NO) synthesis. We aimed to investigate whether treatment with nebivolol could be an effective therapeutic strategy to mitigate tenofovir-induced nephrotoxicity. We allocated Wistar rats to four groups: 1- control (C), received a standard diet (SD) for 30 days; 2- NBV, received a SD for 30 days then the same SD diet added with nebivolol (100 mg/kg SD) in the last 15 days; 3- TDF, received a SD added with tenofovir (300 mg/kg SD) for 30 days; and 4- TDF+NBV, received the same SD described above added with tenofovir for 30 days and nebivolol in the last 15 days. Long-term exposure to tenofovir led to impaired renal function, induced hypertension, endothelial dysfunction and oxidative stress. Nebivolol treatment partially recovered glomerular filtration rate, normalized blood pressure and attenuated renal vasoconstriction and renal injury. Administration of nebivolol contributed to reductions in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels as well as increases in endothelial nitric oxide sintase (eNOS) accompanied by renin-angiotensin-aldosterone system downregulation and decreases in macrophage and T-cells infiltrate. Furthermore, nebivolol was responsible for the maintenance of the adequate balance of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione (GSH) levels and it was associated with reductions in NADPH oxidase (NOX) subunits. Nebivolol holds multifaceted actions that promote an advantageous option to slow the progression of kidney injury in tenofovir-induced nephrotoxicity.

Keywords: tenofovir, nephrotoxicity, nebivolol, hypertension, endothelium dysfunction, oxidative stress

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um problema de saúde pública que afeta aproximadamente 38 milhões de pessoas ao redor do mundo [1]. As combinações de terapias antirretrovirais (ART) proporcionaram a mudança de status de uma doença fatal para uma condição crônica controlada, mudando drasticamente a realidade dos indivíduos infectados com o HIV [2]. O aumento da expectativa de vida acarretou no aparecimento de inúmeras comorbidades, como doenças cardiovasculares [3], osteoporose [4], distúrbios metabólicos [5], doenças hepáticas e renais [6]. A injúria renal aguda (IRA) é uma complicação que acomete cerca de 10 a 30% dos pacientes com HIV. Uma das causas mais comuns para o desenvolvimento de IRA nesses pacientes está relacionada com a ART [5, 7].

Quatro décadas após a notificação dos primeiros casos de HIV, as estratégias para tratar e prevenir a infecção pelo vírus continuam avançando. Iniciar a ART o mais rápido possível após o diagnóstico é uma alta prioridade para melhorar a saúde e a expectativa de vida dos pacientes. Atualmente, o tenofovir alafenamida, o tenofovir disoproxil fumarato, a emtricitabina e a lamivudina são recomendados como componentes inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (nRTI) dos regimes iniciais de ART [8]. O tenofovir foi o primeiro nRTI aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* para o tratamento do HIV em adultos e tem sido utilizado como medicamento antirretroviral desde 2001 [9]. Além do tratamento do HIV [10], o tenofovir também foi aprovado para o tratamento da hepatite B em adultos em 2008 e é largamente empregado desde então com base na sua eficácia comprovada por estudos clínicos [11-13].

1.1 Tenofovir Disoproxil Fumarato

O Tenofovir Disoproxil Fumarato é uma pró-droga rapidamente convertida em tenofovir após sua absorção através da hidrólise enzimática de dois grupos ésteres. A adição de dois radicais ésteres alcalinos proporciona o aumento da sua lipossolubilidade e absorção intestinal, permitindo sua administração oral [14]. O

tenofovir é um análogo nucleotídeo da adenosina monofosfato, que após sofrer duas reações de fosforilação intracelular, se transforma em seu metabólito ativo, o tenofovir difosfato. Em sua forma ativa, o tenofovir compete com o substrato natural deoxiadenosina 5'-trifosfato pela incorporação no DNA durante a transcrição reversa induzida pelo HIV. Essa incorporação do tenofovir ao DNA viral resulta em uma cadeia terminal, uma vez que o tenofovir difosfato não possui o grupamento hidroxila na posição 3', que atua como ponto de ligação para o próximo deoxirribonucleosídeo trifosfato, responsável pelo alongamento do DNA viral. Dessa forma, a transcriptase reversa, evento chave para a proliferação do HIV, é inibida [15, 16]. O tenofovir é excretado na forma inalterada na urina através da combinação de filtração renal e secreção tubular ativa. Contudo, altas concentrações intracelulares de tenofovir em células tubulares (devido à maior absorção da droga no plasma do que secreção no lúmen tubular) podem interferir na função celular e acarretar efeitos colaterais danosos, especialmente com o seu uso prolongado [17].

1.2 Nefrotoxicidade induzida por Tenofovir

Estudos pré-clínicos demonstraram que animais submetidos ao tratamento com tenofovir apresentam glicosúria, proteinúria, fosfatúria, calciúria, aumento na creatinina sérica e hipofosfatemia. Além disso, a exposição ao tenofovir resulta em uma diminuição da taxa de filtração glomerular [18, 19] e toxicidade tubular [14, 17]. A toxicidade tubular induzida pelo tenofovir é representada por acidose tubular [20], síndrome de Fanconi e diabetes insipidus nefrogênico [21]. A nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir também é caracterizada pelo envolvimento da via do óxido nítrico (NO) e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), levando à vasoconstrição renal e à hipertensão arterial sistêmica, além do aumento do estresse oxidativo e do surgimento de síndrome metabólica [14, 22].

O túbulo proximal (TP) é o principal responsável pela excreção do tenofovir. A disfunção do TP leva à perda de substâncias pela urina que normalmente são livremente filtradas no glomérulo e reabsorvidas por essa porção tubular, como as proteínas de baixo peso molecular, fosfato e glicose [19]. O mecanismo pelo qual o tenofovir leva à lesão renal ainda é pouco conhecido, porém sabe-se que a secreção

tubular do tenofovir acontece via transporte de ânions orgânicos no TP por meio de transportadores específicos localizados nas membranas basal e apical das células tubulares [14].

De forma geral, os análogos nucleotídeos são captados da corrente sanguínea pelas células tubulares proximais através do transportador de ânions orgânicos tipos 1 e 3 (hOAT-1 e hOAT-3) localizados na porção basolateral da célula e são secretados para a luz tubular através das proteínas de resistência a múltiplos fármacos tipos 2 e 4 (MRP-2 e MRP-4) localizadas na porção apical da célula. Alguns mecanismos explicam a indução da lesão renal por drogas antivirais: o aumento da expressão ou a inibição competitiva dos transportadores tubulares renais, como os da família hOAT ou MRP, ou o comprometimento da mitocôndria, alterando a oxidação de ácidos graxos e a produção de energia. A diminuição da replicação do DNA mitocondrial resulta em estresse oxidativo, promovendo o metabolismo anaeróbico, acidose láctica e acúmulo de triglicérides, que afeta diretamente a função celular [23-26]. A figura 1 representa, resumidamente, a via de transporte celular do tenofovir no túbulo proximal em condições fisiológicas e na presença de distúrbios que interferem nos mecanismos de captação e secreção dessa droga. Apesar dos achados na literatura sugerirem que a nefrotoxicidade induzida por tenofovir ocorre em baixa frequência, sua etiologia é confirmada por estudos experimentais [24] e clínicos [27].

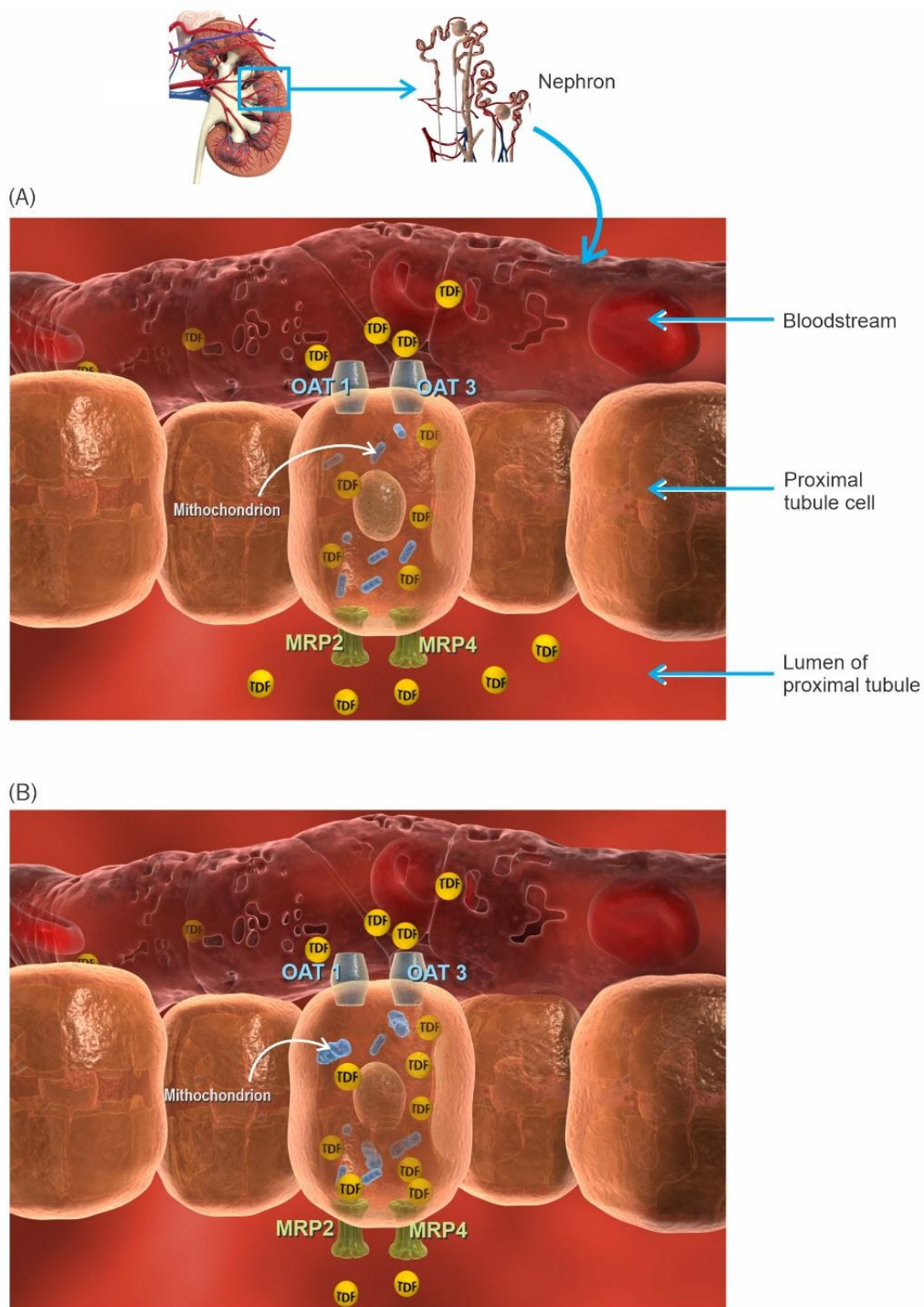


Figura 1. Via de transporte celular do tenofovir no túbulo proximal. (A) Transporte celular do tenofovir em condições fisiológicas. (B) Distúrbios nos mecanismos de captação e secreção de tenofovir, levando ao aumento da concentração da droga dentro da célula e a depleção e disfunção do DNA mitocondrial. Foto gentilmente produzida pelo Projeto Homem Virtual – FMUSP.

1.3 Estresse oxidativo, sistema renina-angiotensina-aldosterona e a cascata do óxido nítrico na nefrotoxicidade induzida por tenofovir

A administração crônica de tenofovir resulta em um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), na depleção de componentes antioxidantes celulares e no dano mitocondrial nos rins [23-29]. Os elementos oxidantes desempenham um papel importante na patogênese das doenças renais e a NADPH oxidase (NOX) parece ser uma fonte citosólica essencial de geração de ERO [30, 31]. As ERO são moléculas altamente reativas responsáveis por reduzir a biodisponibilidade do NO e também estão relacionadas ao desenvolvimento de danos renais induzidos pela regulação positiva do SRAA e da oxidação de lipídios e proteínas, levando a lesões glomerulares e tubulares [31]. Em contrapartida, as células renais possuem vários mecanismos de defesa antioxidante para se protegerem contra os radicais livres em condições fisiológicas, como o sistema superóxido dismutase (SOD); a catalase (CAT), as cadeias enzimáticas dependentes de glutathiona e tiol; e a via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)/heme-oxigenase 1 (HO-1) [30-32]. Assim, o estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de ERO e a defesa antioxidante, resultando em um distúrbio na sinalização redox e danos moleculares [32]. Vale ressaltar que altos níveis de ERO por um período prolongado prejudicam as linhas de defesa do sistema imune e a função endotelial, agravando o dano vascular [30, 33]. Ademais, a produção excessiva de ERO promove mudanças irreversíveis no DNA que podem acarretar em apoptose ou necrose [29]. As ERO e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são importantes moduladores do processo de apoptose pela mitocôndria, da ativação de poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) e do aumento da expressão de neutrófilos [29]. A apoptose é um tipo de morte celular controlada e dependente de energia, caracterizada pela liberação do citocromo C pela mitocôndria e ativação da via de sinalização das caspases [28, 29]. Além disso, o estresse oxidativo e nitrativo e/ou o dano no DNA induzido por peroxinitrito são potentes mecanismos desencadeadores da ativação da PARP, que por sua vez estimula a transcrição de agentes pró-inflamatórios, incluindo o fator nuclear κ B (NF κ -B) [29]. A figura 2 representa um panorama geral dos danos causados pelo acúmulo de tenofovir nas células renais.

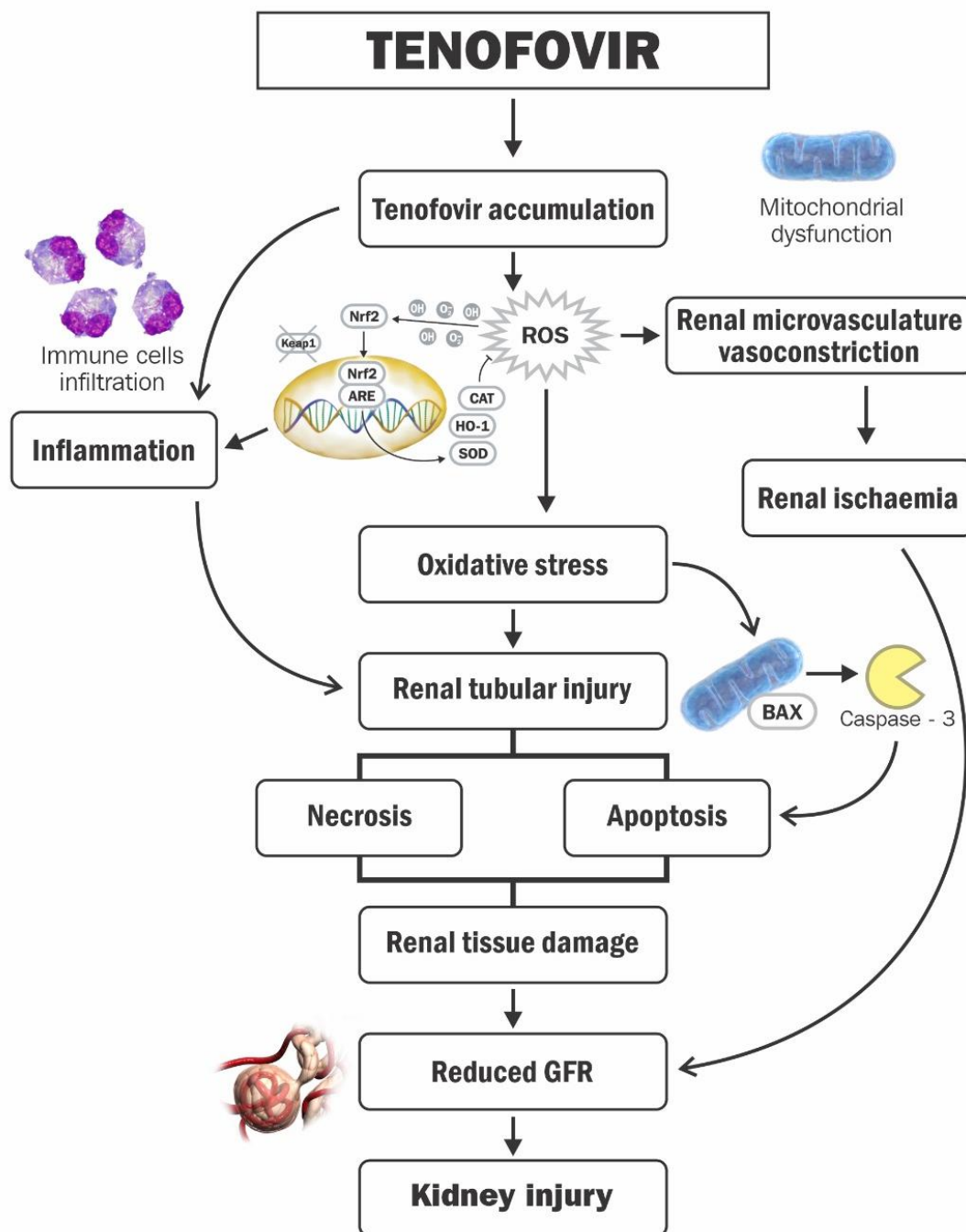


Figura 2. Fluxograma das vias de sinalização envolvidas na patogênese da nefrotoxicidade induzida por tenofovir. O aumento da concentração de tenofovir na célula proximal tubular desencadeia múltiplos processos celulares que levam ao aumento da produção de ROS. A indução de ROS influencia o equilíbrio do estado redox, leva à disfunção mitocondrial e libera citocinas e quimiocinas, que recrutam células imunes, desencadeando processos inflamatórios. Juntos, esses mecanismos podem promover fibrose túbulo-intersticial, a ativação de vias relacionadas a apoptose e subsequente dano no tecido renal, resultando nas manifestações clínicas observadas nos estágios iniciais da nefrotoxicidade induzida por tenofovir. Nrf2, fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2; Keap1, proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch; ARE, elemento de resposta antioxidante; HO-1, heme oxigenase-1; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; ROS, espécies reativas de oxigênio. Figura gentilmente produzida pelo Projeto Homem Virtual FMUSP.

1.4 Nebivolol no tratamento da nefrotoxicidade induzida por Tenofovir

O nebivolol é uma droga antagonista seletiva dos receptores adrenérgicos β_1 de terceira geração largamente empregada no tratamento da hipertensão arterial sistêmica [34]. A droga foi desenvolvida e patenteada na década de 80 e é utilizada na Europa desde 1997. Entretanto, o medicamento foi introduzido no mercado norte-americano após aprovação pelo FDA em 2007 baseado na sua eficácia como agente anti-hipertensivo [35, 36]. Um estudo clínico norte-americano multicêntrico mostrou que o nebivolol foi considerado seguro, eficiente e bem tolerado em pacientes com hipertensão leve e moderada [34]. Na Europa, o nebivolol foi aprovado tanto para o tratamento de hipertensão quanto para o tratamento de insuficiência cardíaca [37].

Clinicamente, o nebivolol é administrado como uma mistura racêmica de igual proporções dos isômeros d e l. O nebivolol tem quatro centros assimétricos, o isômero d refere-se ao (S,R,R,R)-nebivolol e o isômero l ao (R,S,S,S)-nebivolol. Os enantiômeros tem ações diferenciadas em relação a atividade β -bloqueadora e a vasodilatação mediada pelo NO. Essa combinação resulta em uma atividade anti-hipertensiva mais potente comparada à administração dos enantiômeros separadamente [38]. O d-nebivolol tem uma afinidade maior com o receptor β_1 conferindo praticamente toda a ação β -bloqueadora da droga, enquanto que o l-nebivolol é responsável principalmente pela liberação de NO derivado do endotélio, resultando em uma ação vasodilatadora mais intensa [33, 36].

O nebivolol induz a produção de NO via ativação dos receptores adrenérgicos β_3 . Esses receptores são responsáveis pela ativação da fosfolipase C, resultando na quebra da membrana fosfolipídica fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3). Com isso, há liberação de cálcio do retículo endoplasmático produzindo um aumento do cálcio citoplasmático livre. O cálcio liga-se à calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina. Esse complexo estimula a óxido nítrico sintase (NOS) via L-Arginina, resultando no subsequente aumento da produção de NO. Esse mecanismo leva ao controle efetivo da pressão arterial pela vasodilatação induzida por NO [38].

O NO não está relacionado somente com a manutenção da função endotelial, mas também à apoptose. Apesar dos mecanismos não estarem totalmente esclarecidos, estudos *in vitro* mostraram que a noradrenalina, através de receptores β_1 , ativa caspases que são enzimas pró-apoptóticas [39]. Além disso, o nebivolol apresenta efeitos antioxidantes reduzindo a produção de superóxido por meio da inibição da NOX e da prevenção do desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A diminuição de superóxidos, por sua vez, inibe a ativação do NF κ -B, levando a diminuição de várias citocinas pró-inflamatórias [40, 41]. Dessa forma, o nebivolol mostra uma potente ação antiapoptótica, antioxidante e anti-inflamatória através do seu efeito na regulação do NO [41].

A indução da produção de NO pelo nebivolol diminui a pressão de perfusão renal e, conseqüentemente, aumenta o fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular (TFG). O aumento na TFG resulta na elevação do fluxo urinário e na taxa de excreção urinária de sódio e cloreto. Dessa forma, a maior produção de NO induzida pelo nebivolol parece ter uma ação diurética que pode contribuir com os efeitos hipotensores da droga somada com sua ação β -bloqueadora [42]. Os efeitos benéficos do tratamento com nebivolol não estão associados com os efeitos adversos comuns de outras classes de β -bloqueadores [34].

O nebivolol é absorvido rapidamente após a administração oral. A droga é 98% ligada a proteínas, principalmente à albumina, e é processada no fígado em metabólitos ativos e inativos. Os metabólitos ativos contribuem para os efeitos fisiológicos do nebivolol [34, 37]. Sua excreção urinária varia de 40-70% dependendo do tipo de metabolismo e menos de 1% da droga é excretada intacta na urina [34].

Recentemente, estudos experimentais sugeriram que o nebivolol pode fornecer proteção contra a injúria renal em modelos de isquemia/reperfusão renal [43] e nefropatia diabética [44] provavelmente devido à sua propriedade antiapoptótica, antifibrótica e anti-inflamatória. Resultados semelhantes também foram observados no modelo de nefrotoxicidade por contraste [45], gentamicina [46] e ciclosporina [47], indicando que o nebivolol também preserva a estrutura e função renal pela diminuição do estresse oxidativo.

1.5 Justificativa do estudo

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o número de indivíduos infectados com o HIV vem crescendo progressivamente ao redor do mundo [1]. Dessa forma, cada vez mais pacientes utilizam a ART com o tenofovir, que é considerada atualmente um dos tratamentos mais eficazes para o controle do HIV. No entanto, o tenofovir está relacionado com o desenvolvimento de nefrotoxicidade, caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de vasoconstrição renal, hipertensão arterial sistêmica, aumento do estresse oxidativo e dislipidemia. Embora existam poucos estudos na literatura, alguns medicamentos, como a rosiglitazona, apresentaram resultados benéficos em relação à redução da nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir. Os efeitos adversos apresentados pelo tenofovir estão em parte relacionados com o envolvimento do SRAA e da via do NO. Assim sendo, a administração do nebivolol pode ser promissora no tratamento dos efeitos indesejados relacionados ao uso contínuo do tenofovir, uma vez que o nebivolol é um β -bloqueador de terceira geração com ação diferenciada dos β -bloqueadores convencionais. O nebivolol é um potente agente anti-hipertensivo, não só pela sua atuação nos receptores adrenérgicos, mas também pela sua participação na vasodilatação mediada via NO. Além disso, diversos trabalhos experimentais mostraram os benefícios do nebivolol na redução da nefrotoxicidade induzida por diferentes drogas. No que tange o estado da arte em relação ao uso do nebivolol na atenuação da nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir, não há registros da aplicação desse β -bloqueador em estudos descritos na literatura. Desta maneira, é razoável supor que as ações terapêuticas do nebivolol possam ser benéficas para atenuar os efeitos adversos causados pelo tenofovir, garantindo um bom prognóstico e uma melhora na qualidade de vida do paciente. Além disso, o nebivolol é um medicamento amplamente comercializado, de fácil administração e de relativo baixo custo, o que o torna acessível para prescrição para os pacientes.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivos gerais

O presente estudo tem como objetivo avaliar se o tratamento com nebivolol é capaz de atenuar a nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir.

2.2 Objetivos específicos

Como descrito anteriormente, estudos vêm demonstrando efeitos renoprotetores do nebivolol em diferentes modelos experimentais de nefrotoxicidade. Entretanto, não há dados robustos em relação ao desempenho da administração de nebivolol na nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir. No intuito de avaliar melhor o desempenho do tratamento proposto, determinamos:

- A função e a hemodinâmica renal;
- Os elementos relacionados com a síndrome metabólica (colesterol e triglicérides), além da avaliação da proteinúria;
- Os componentes do SRAA (angiotensina II e aldosterona) e da via do NO (ADMA, eNOS e iNOS);
- As vias de ativação do estresse oxidativo (TBARS, GSH, MnSOD, Nrf2, HO-1, p47^{phox} e p67^{phox});
- O perfil inflamatório (expressão de MCP-1, infiltração de macrófagos/linfócitos);
- O escore de lesão tubular, os fatores relacionados a formação de fibrose (TGF- β 1) e os componentes da matriz extracelular (colágeno III) no tecido renal.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais e protocolo experimental

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com peso corpóreo inicial em torno de 180-200 g, obtidos do biotério central do Instituto de Ciências

Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos no biotério do laboratório em temperatura controlada ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-HCFMUSP protocolo n. 1287/2019).

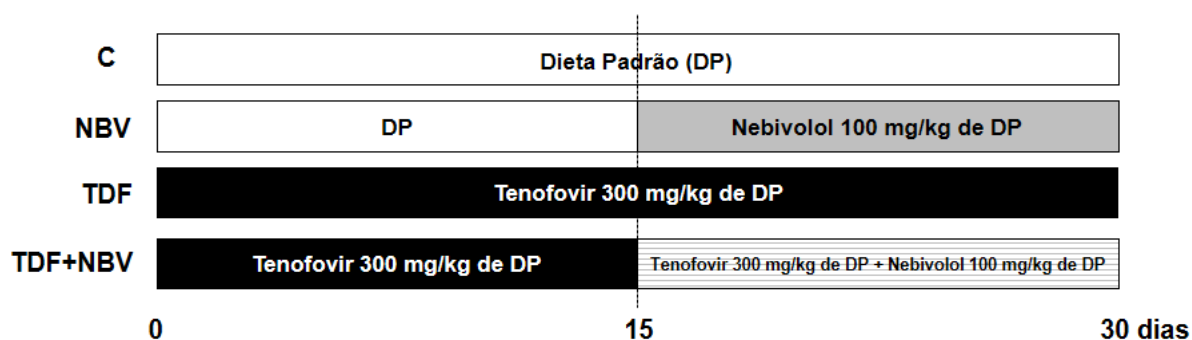
O balanço da ingestão de dieta e água foi efetuado diariamente. O peso dos animais foi verificado semanalmente. Os animais receberam o tenofovir adicionado à dieta (300 mg/kg de dieta, Nuvilab, Paraná, Brasil) equivalente a ~ 30 mg/kg de peso corporal e o nebivolol (100 mg/kg de dieta) equivalente a ~ 10 mg/kg de peso corporal. A dose de tenofovir foi baseada em estudos prévios do nosso laboratório [14] e a dose de nebivolol foi baseada em estudos experimentais publicados anteriormente [41, 46].

3.2 Grupos experimentais

Foram estudados quatro grupos de animais:

- 1- **Controle (C)**: ratos que receberam dieta padrão (DP) por 30 dias (n=8).
- 2- **Nebivolol (NBV)**: ratos que receberam DP por 30 dias e DP adicionada de nebivolol (100 mg/kg de dieta) do 15^o ao 30^o dia (n=8).
- 3- **Tenofovir (TDF)**: ratos que receberam DP adicionada de tenofovir (300 mg/kg de dieta) por 30 dias (n=9).
- 4- **Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV)**: ratos que receberam DP adicionada de tenofovir (300 mg/kg de dieta) por 30 dias e DP adicionada de tenofovir (300 mg/kg de dieta) e nebivolol (100 mg/kg de dieta) do 15^o ao 30^o dia (n=9).

Delineamento do protocolo experimental



3.3 Estudos de gaiola metabólica: volume urinário e proteinúria

Ao final dos 30 dias de acompanhamento experimental, os animais foram colocados em gaiola metabólica para a coleta de urina de 24 horas. O volume urinário foi avaliado gravimetricamente e as amostras de urina foram centrifugadas para remoção de material suspenso. O sobrenadante foi utilizado para análise da proteinúria. A concentração urinária de proteína foi mensurada por sistema colorimétrico usando kit comercial (LabTest, MG, Brasil). A excreção urinária de proteína ($U_{\text{Prot}}V$) foi determinada.

3.4 Determinação da taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de inulina, pressão arterial média e fluxo sanguíneo renal

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico 50 mg/Kg (Cristália, SP, Brasil). A traqueia foi canulada com cateter PE-240 e a respiração foi mantida espontaneamente. A veia jugular foi canulada com cateter PE-60 para a infusão de inulina e de fluidos. Para o controle da pressão arterial média (PAM) e para a coleta de amostras de sangue, a artéria carótida foi cateterizada com cateter PE-50. Para a coleta de amostras de urina, foi feita uma incisão abdominal e a bexiga do animal foi canulada com cateter PE-240. Após o procedimento cirúrgico, uma dose única de inulina (100 mg/kg diluída em 1 mL de solução salina 0,9%) foi administrada pela veia jugular. Em seguida, uma infusão constante de inulina foi mantida (10 mg/kg em solução salina 0,9%) a 0,04 mL/min do início ao fim do experimento. Foram coletadas amostras de urina aos 30, 60 e 90 minutos e amostras de sangue no início e no fim do experimento. As concentrações de inulina no sangue e na urina foram

determinadas pelo método colorimétrico da antrona. Os valores do clearance de inulina representam a média de três períodos de experimento. A TFG (mL/min/100g) foi expressa corrigindo-se por 100 g de peso corpóreo.

Para a avaliação do fluxo sanguíneo renal (FSR) foi feita uma incisão mediana abdominal, o pedículo renal esquerdo foi dissecado e a artéria renal isolada. Cuidadosamente, uma sonda de fluxo ultrassônico (TS420; Transonic Systems, MD, EUA) foi acoplada na artéria renal para a mensuração do FSR em mL/min. A resistência vascular renal (RVR) foi calculada dividindo-se a PAM pelo FSR e o resultado foi expresso em mmHg/mL/min.

Ao final do experimento de clearance, o sangue total dos animais foi colhido para as seguintes análises no plasma: sódio (P_{Na}) e potássio (P_K) por eletrodo sensível (AVL 9180 Electrolyte Analyser - Roche®, Risch-Rotkreuz, Suíça); fosfato (P_P), colesterol total e triglicérides por sistema colorimétrico (LabTest, MG, Brasil). Os níveis plasmáticos de aldosterona, angiotensina II e dimetilarginina assimétrica (ADMA) foram determinados pelo método de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) usando kits comerciais Aldosterone ELISA Kit (Enzo, Life Science Inc., NY, EUA), Rat Ang-II (Angiotensin II) ELISA Kit e ADMA (Asymmetrical Dimethylarginine) ELISA kit (Elabscience®, TX, EUA).

Após a coleta do sangue, os rins foram perfundidos com solução de tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, o rim direito foi removido, congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para análise de proteínas pelas técnicas de *western blotting* (WB) e ELISA. O rim esquerdo foi fixado em solução de *methacarn* (60% metanol, 30% ácido acético glacial e 10% clorofórmio) e mantido neste mesmo fixador por um período de 24 horas. Após esse período, o fixador foi substituído por álcool 70% e o tecido foi embebido em parafina e cortado em secções de 4 μm para estudos histomorfométricos e de imuno-histoquímica.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia com a infusão de uma dose letal do anestésico tiopental sódico e suas carcaças acondicionadas em

embalagens plásticas próprias para congelamento e em seguida recolhidas para incineração.

3.5 Análise Histo-morfométrica

As amostras de tecidos renais foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Após inclusão em parafina, cortes de 4 μm de espessura de tecido renal corados com hematoxilina-eosina (HE) foram usados para análise das lesões renais.

Para avaliação da extensão das áreas acometidas por lesões renais, entre 40 a 60 campos medindo 0,245 mm^2 foram sequencialmente analisados. Cada campo foi avaliado através de escores que variam de 0 a 4, de acordo com o seguinte critério: 0, menos do que 5% da área apresentando edema celular, degeneração vacuolar, necrose e descamação; I, entre 5-25% da área com comprometimento; II, 25-50% da área apresentando lesões renais; III, alterações envolvendo entre 50-75% do campo analisado; IV, mais do que 75% da área analisada apresentando lesões renais. Em seguida, um escore médio para cada biópsia renal foi calculado [48].

3.6 Análise Imuno-histoquímica

Os cortes de tecido renal foram incubados com os seguintes anticorpos: anti-CD68 (macrófagos, AbD Serotec, Oxford, Reino Unido); anti-CD3 (linfócitos T; Dako, Glostrup, Dinamarca); e anti-JG12 (Aminopeptidase P; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), por um período de 18 horas à temperatura de 4° C (*overnight*). O produto dessa reação foi detectado pelo Sistema EnVision HRP – anti-coelho ou anti-camundongo + 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Dako North America, CA, EUA). A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, MO, EUA). As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela diluição dos anticorpos primários em solução de PBS contendo albumina bovina 1%. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz.

Para avaliação quantitativa das imunorreações foram analisados 30-40 campos de córtex renal (0,09 mm^2). As proporções de volume de áreas positivas no tecido renal, determinadas pelo limite de cor, foram obtidas pela análise de imagem usando o software ZEN (Carl Zeiss, Munich, Alemanha). A proporção de volume foi expressa

como a área positiva (μm^2) para os respectivos marcadores depois de feita a divisão pela área total do campo analisado (μm^2). Os resultados foram expressos como porcentagem [49].

3.7 Extração e quantificação de proteínas: WB e ELISA

Para a realização da técnica de WB e ELISA foram utilizadas as amostras de tecido renal dos animais previamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C . A extração da proteína seguiu o protocolo descrito por Burnette [50], com pequenas modificações. As amostras dos tecidos renais foram homogeneizadas (Polytron PT 10-35) em solução K-Hepes com coquetel de inibidores de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, MO, EUA). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos a 4°C para remover núcleo, mitocôndrias e *debris* celulares. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad, CA, EUA).

3.8 Análise da expressão proteica: WB

As amostras de tecido renal foram separadas de acordo com o peso molecular em minigéis *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) [50] em tampão de corrida e a transferência para membrana de PVDF foi feita com tampão de transferência. A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em TBS-T por 1 hora. A incubação primária foi feita com anticorpo anti-eNOS (BD Biosciences, CA, EUA); anti-iNOS (My Biosource, CA, EUA), anti-HO1 (AssayDesigns, MI, EUA); anti-MnSOD e anti-Nrf2 (Cayman Chemical, MI, EUA); anti-p47^{phox} e anti-p67^{phox} (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA); em solução de TBS-T, *overnight* a 4°C . A incubação secundária foi realizada com anticorpo anti-camundongo ou anti-coelho (Sigma, MO, EUA) também em solução de TBS-T. O procedimento de detecção foi baseado em quimioluminescência (Amersham ECL, GE Healthcare, PA, EUA). A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com anticorpo anti- β -actina (Sigma, MO, EUA). A semi-quantificação das proteínas foi feita pelo software Image J (NIH image software). Os resultados foram expressos como porcentagem.

3.9 Quantificação de Angiotensina II, MCP-1, TGF- β 1 e Colágeno III no tecido renal

As quantificações de angiotensina II, proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1), fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) e colágeno III no tecido renal foram determinadas pelo método de ELISA usando kits comerciais Rat Ang-II (*Angiotensin II*); Rat MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*); TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*) e Rat COL3 (*Collagen Type III*) ELISA kits (Elabscience®, TX, EUA). O sistema de detecção e os cálculos de quantificação seguiram os protocolos descritos pelo fabricante dos kits. As leituras das absorvâncias foram obtidas utilizando-se o aparelho Epoch/2 (Biotek Instruments, VE, EUA).

3.10 Avaliação do estado redox: Ensaio de TBARS e GSH

As quantificações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmático, urinário e tecidual renal foram determinadas pelo método colorimétrico, usando o kit *TBARS Assay* (Cayman Chemical, MI, EUA). O sistema de detecção e os cálculos de quantificação seguiram o protocolo descrito pelo fabricante do kit. As leituras das absorvâncias foram obtidas utilizando-se o aparelho Epoch/2 (Biotek Instruments, VE, EUA). Os níveis plasmáticos e urinários de TBARS foram expressos em nmol/mL e μ mol/mg de creatinina, respectivamente.

Para a avaliação da concentração de TBARS no tecido renal, inicialmente foi realizada a extração e a quantificação das proteínas do tecido renal pelos métodos de Burnette modificado [50] e Bradford, respectivamente. Em seguida, a avaliação do estresse oxidativo no tecido renal foi realizada pela mesma técnica descrita acima e expresso em nmol/mg tecido.

A glutathiona (GSH) foi determinada no sangue total pelo método descrito por Sedlak e Lindsay (1968) [51]. O sangue total foi processado através da adição de ácido metafosfórico 5% e centrifugado a 14.000 g por 10 minutos. O ensaio consiste na reação do sobrenadante do sangue total com o reagente de Ellman's, formando um pigmento amarelo que é mensurado no espectrofotômetro em 412 nm. A GSH foi quantificada pela média da curva padrão e expressa em μ mol/mL [52].

3.11 Análise Estatística

A análise estatística dos dados dos grupos estudados foi o de variância *One-Way* ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas através do programa de estatística GraphPad Prism 5 e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

Os animais de todos os grupos estudados não apresentaram diferenças significativas no peso corpóreo (g), uma vez que a ingestão de dieta foi similar entre os grupos (~25 g/dia). O grupo TDF apresentou um comprometimento significativo da função renal ($p < 0,001$), evidenciado pela menor TFG (mL/min/100g) quando comparado ao grupo C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma recuperação parcial e significativa ($p < 0,001$) da função renal, indicando que a administração de nebivolol foi capaz de atenuar a nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir. Os dados referentes ao peso corpóreo estão representados na tabela 1 (Anexos - seção 7). Os valores referentes ao clearance de inulina estão representados na figura 3 e na tabela 1 (Anexos - seção 7).

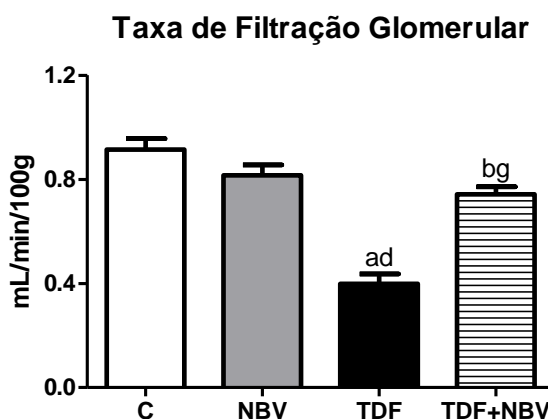


Figura 3 - Taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de inulina ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$ vs. C; ^d $p < 0,001$ vs. NBV e ^p $p < 0,001$ vs. TDF.

Um outro marcador da disfunção renal é a proteinúria. Os animais do grupo TDF apresentaram uma elevação significativa ($p < 0,001$) na excreção urinária de proteínas (mg/dia) quando comparados aos animais dos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,01$) da proteinúria quando comparados aos animais do grupo TDF, sugerindo que o tratamento com nebivolol, além de melhorar a função renal, também foi capaz de atenuar a excreção urinária de proteínas. Não houve diferença significativa no volume urinário de 24h (VU, mL) entre

os grupos estudados (tabela 2, anexos – seção 7). Os dados de proteinúria estão representados na figura 4 e na tabela 2 (Anexos - seção 7).

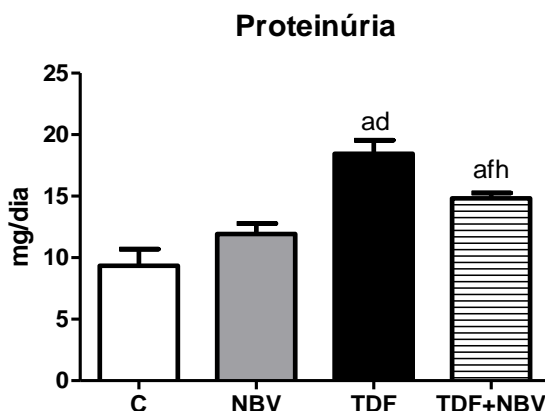


Figura 4 - Excreção urinária de proteínas ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^ap < 0,001 vs. C; ^dp < 0,001, ^fp < 0,05 vs. NBV e ^hp < 0,01 vs. TDF.

Não houve diferenças significativas no sódio (mEq/L) e no potássio (mEq/L) plasmático entre os grupos estudados. Como esperado, os animais do grupo TDF apresentaram uma queda significativa ($p < 0,001$) da concentração plasmática de fosfato (mg/dL) quando comparados aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram níveis plasmáticos de fosfato semelhantes ao grupo C, indicando que o tratamento com nebivolol reverteu a hipofosfatemia previamente observada no grupo TDF. A tabela 2 (Anexos - seção 7) mostra os achados dos grupos experimentais em relação aos resultados de eletrólitos.

Além da recuperação parcial da função renal, os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma melhora do perfil lipídico, evidenciada pela análise das concentrações de colesterol total (mg/dL) e triglicérides (mg/dL). Os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de colesterol total quando comparados ao grupo C. Esses valores foram normalizados com o tratamento com nebivolol. Referente aos níveis de triglicérides, os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo neste parâmetro quando comparados aos grupos C ($p < 0,001$) e NBV ($p < 0,01$). O grupo TDF+NBV apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na concentração de triglicérides quando comparado ao grupo

TDF. Embora essa diminuição não tenha normalizado os níveis de triglicérides, o tratamento com nebivolol mitigou a dislipidemia apresentada com o uso contínuo de tenofovir. Os dados referentes ao colesterol total e triglicérides estão descritos na tabela 2 (Anexos - seção 7).

O grupo TDF mostrou um aumento significativo ($p < 0,001$) na PAM (mmHg) quando comparado aos grupos C e NBV. O grupo TDF+NBV apresentou uma queda significativa ($p < 0,001$) na PAM quando comparado ao grupo TDF. Os dados referentes a PAM estão representados na figura 5 e na tabela 1 (Anexos - seção 7).

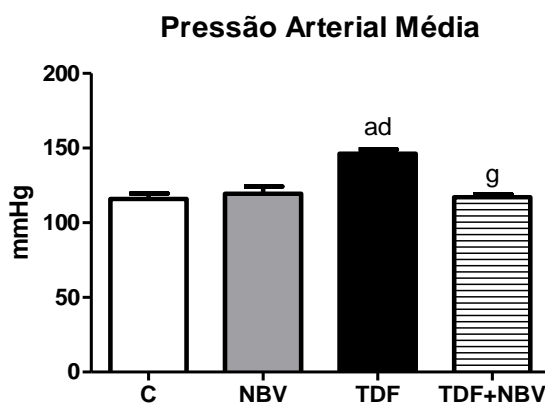


Figura 5 - Pressão arterial média avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$ vs. C; ^d $p < 0,001$ vs. NBV e ^g $p < 0,001$ vs. TDF.

O grupo TDF apresentou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de angiotensina II (pg/mL) quando comparado aos grupos C ($p < 0,05$) e NBV ($p < 0,01$). Resultados semelhantes foram observados nos níveis de angiotensina II tecidual (pg/ μ g prot). O grupo TDF apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nesses parâmetros quando comparado aos grupos C e NBV. O grupo TDF+NBV apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da concentração plasmática e tecidual de angiotensina II quando comparado ao grupo TDF. A concentração plasmática de aldosterona (pg/mL) foi significativamente ($p < 0,001$) maior no grupo TDF quando comparado aos grupos C e NBV. Os animais que receberam TDF+NBV mostraram uma diminuição importante e significativa ($p < 0,001$) nos níveis de aldosterona plasmática quando comparados ao grupo TDF. Em conjunto, estes dados indicam que

o tratamento com nebivolol reverteu a hipertensão observada nos animais TDF possivelmente pelo seu efeito modulatório sobre a expressão dos componentes do SRAA. As concentrações plasmática e tecidual dos componentes do SRAA estão representadas nas figuras 6 e 7 e nas tabelas 2 e 4 (Anexos - seção 7).

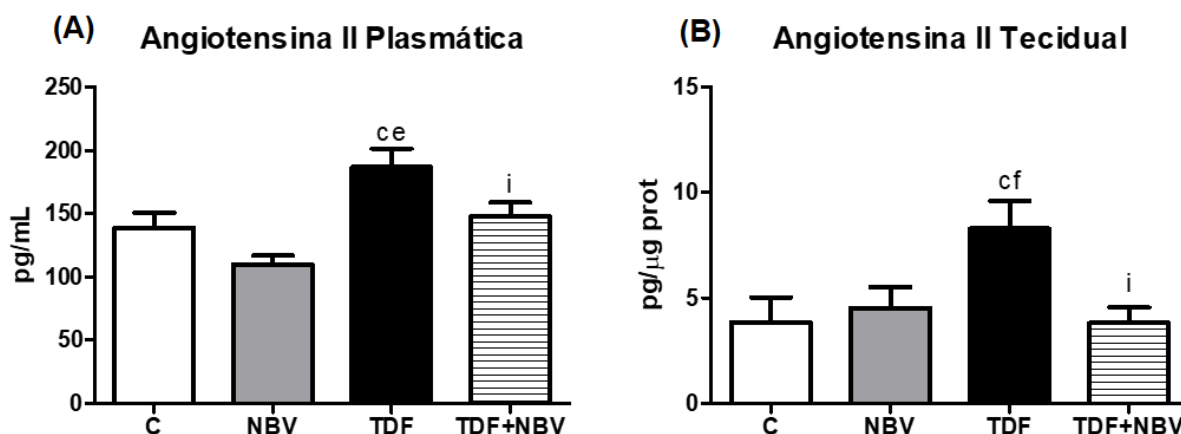


Figura 6 - (A) Concentração plasmática e (B) no tecido renal de angiotensina II avaliadas ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^cp < 0,05 vs. C; ^ep < 0,01, ⁱp < 0,05 vs. NBV e ⁱp < 0,05 vs. TDF.

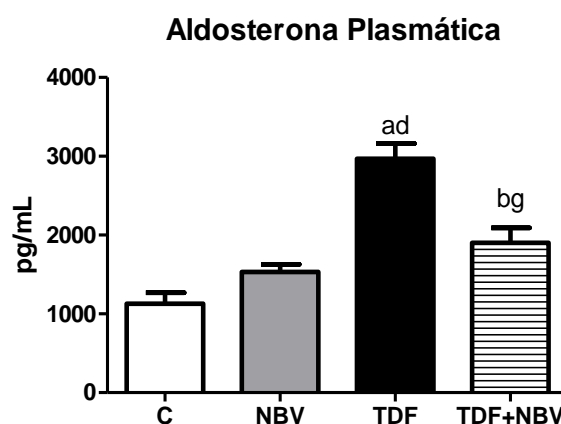


Figura 7 - Concentração plasmática de aldosterona avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^ap < 0,001, ^bp < 0,01 vs. C; ^dp < 0,001 vs. NBV e ^gp < 0,001 vs. TDF.

A restauração da expressão dos componentes do SRAA nos animais TDF+NBV foi acompanhada por uma diminuição da vasoconstrição renal, avaliada pelo FSR (mL/min) e RVR (mmHg/mL/min). Os animais do grupo TDF apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) do FSR quando comparados aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) do FSR quando comparados ao grupo TDF. Além disso, os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) na RVR quando comparados aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição importante e significativa ($p < 0,001$) da RVR quando comparados ao grupo TDF. Os resultados do FSR e da RVR estão representados na figura 8 e na tabela 1 (Anexos - seção 7).

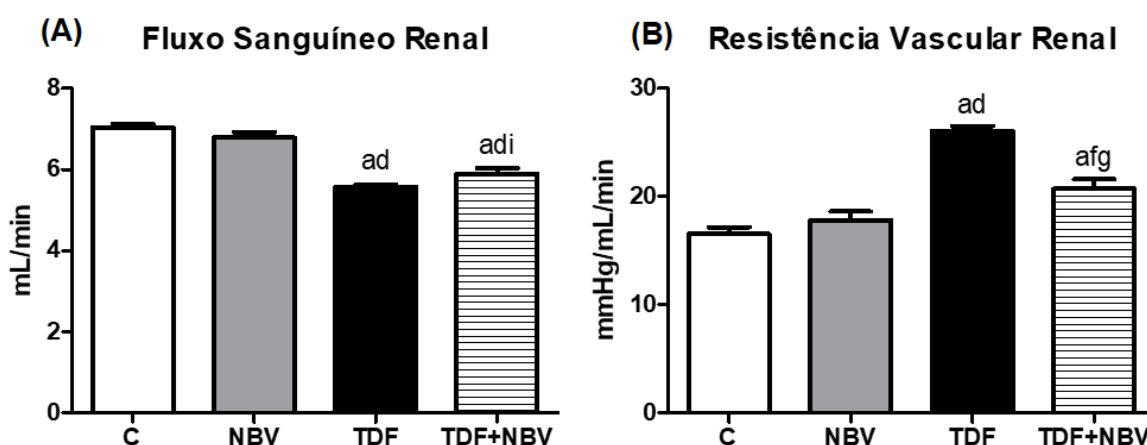


Figura 8 - (A) Fluxo sanguíneo renal e (B) resistência vascular renal avaliados ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$ vs. C; ^d $p < 0,001$, ^f $p < 0,05$ vs NBV; e ^g $p < 0,001$, ⁱ $p < 0,05$ vs. TDF.

A fim de complementar o estudo renovascular, foram avaliados alguns componentes envolvidos na via de sinalização do NO. A concentração plasmática de ADMA (ng/mL) foi significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo TDF quando comparado aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos níveis de ADMA quando comparados aos animais do grupo TDF. Em suporte aos achados referentes ao ADMA, os animais do grupo TDF

apresentaram um desequilíbrio nas principais enzimas responsáveis pela modulação da via do NO, caracterizado pela diminuição significativa da eNOS e um aumento importante da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) quando comparados aos animais dos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$) na expressão proteica de eNOS (%), que foi acompanhado de uma diminuição importante ($p < 0,01$) na expressão proteica de iNOS (%) no tecido renal quando comparados aos animais do grupo TDF. A concentração de ADMA plasmático e a quantificação da expressão de eNOS e iNOS estão apresentadas nas figuras 9 e 10 e nas tabelas 2 e 4 (Anexos - seção 7). Em conjunto, esses resultados sugerem a relevância biológica do ADMA como um inibidor endógeno da NOS e reflete a importância dos efeitos do nebivolol na via do NO para a manutenção da PAM.

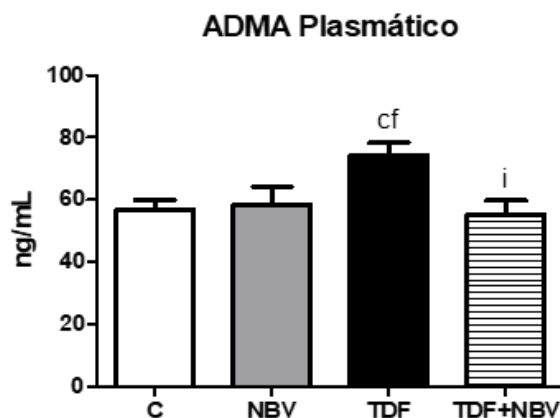


Figura 9 - Concentração plasmática de ADMA avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^cp < 0,05 vs. C; ^fp < 0,05 vs. NBV e ⁱp < 0,05 vs. TDF.

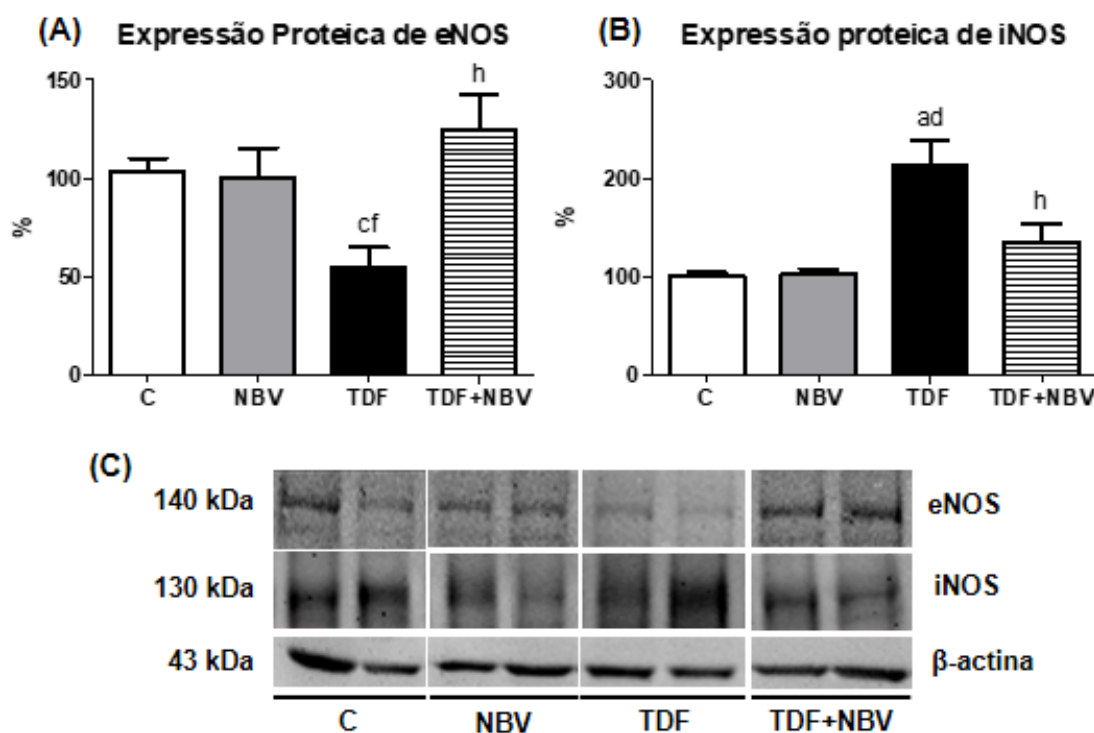


Figura 10 - Análise semiquantitativa da expressão proteica de eNOS e iNOS no tecido renal avaliada ao final dos 30 dias de protocolo. Densitometria da expressão de (A) eNOS e (B) iNOS das amostras de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. (C) Foto ilustrativa da expressão de eNOS, iNOS e β-actina no tecido renal. Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001, ^cp < 0,05 vs. C; ^dp < 0,001, ^fp < 0,05 vs. NBV e ^hp < 0,01 vs. TDF.

As alterações relacionadas ao endotélio vascular glomerular foram acompanhadas de uma melhora, embora não significativa, da expressão da aminopeptidase P (JG12). A imunorreação para JG12 (%) por área de tufo glomerular (%), foi significativamente menor nos animais do grupo TDF quando comparados aos animais dos grupos C (p<0,001) e NBV (p<0,05). Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma tendência de aumento da área positiva para JG12 quando comparados aos animais do grupo TDF. Não houve diferença significativa na área glomerular entre os grupos estudados. Os dados referentes à expressão de JG12 por área glomerular estão representados na figura 11 e na tabela 5 (Anexos - seção 7).

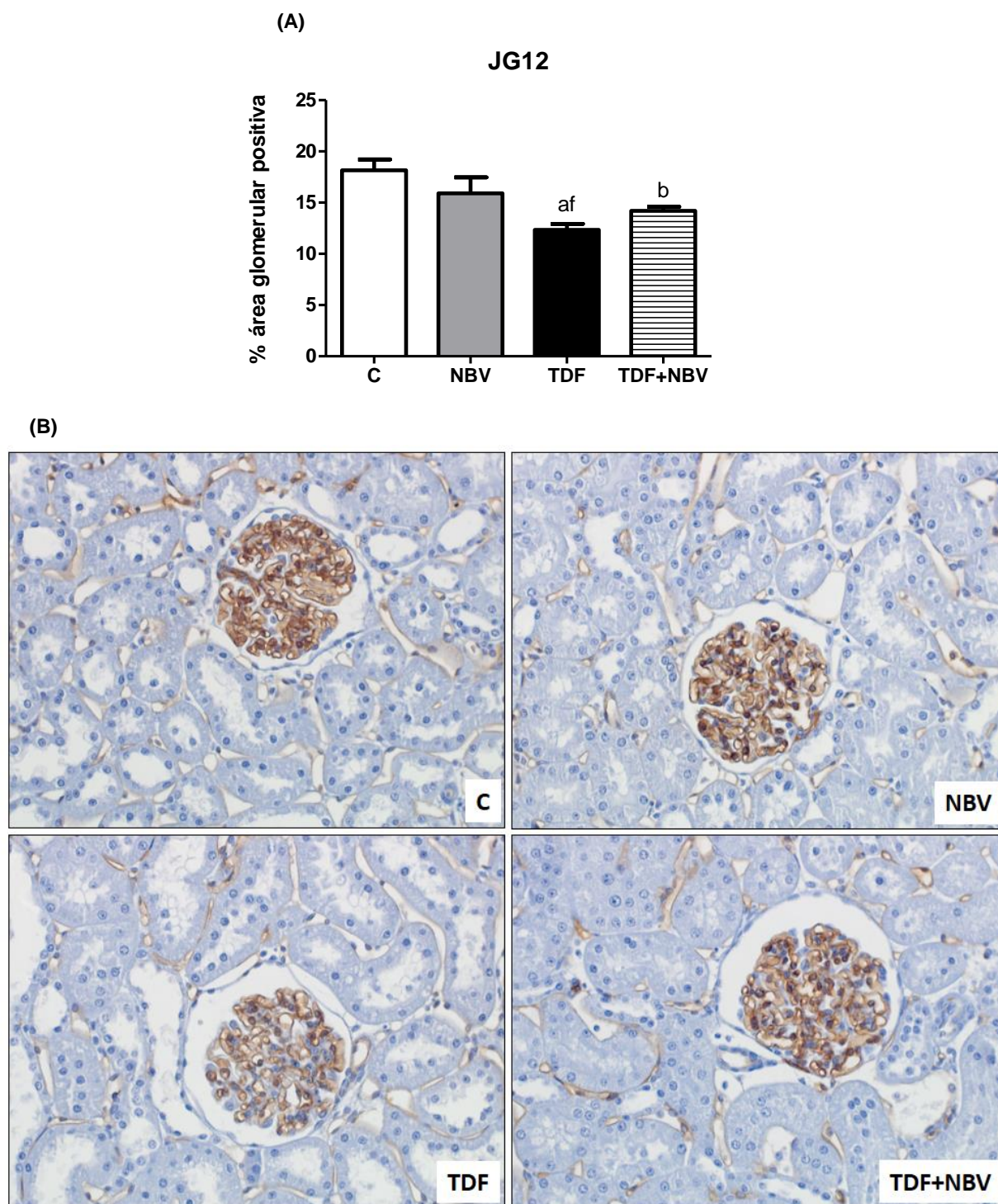


Figura 11 – Expressão da aminopeptidase P (JG12) por área do tufo glomerular no tecido renal. (A) Gráfico de barras da expressão de JG12 avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para JG12 de um rato C, NBV, TDF e TDF+NBV (400x). Valores expressos como média \pm EPM. ^ap < 0,001, ^bp < 0,01 vs.C; e ^fp < 0,05 vs. NBV. Notar que a expressão de JG12 foi menor nos ratos TDF e que o tratamento com NBV mostrou uma tendência de aumento neste parâmetro nos animais do grupo TDF+NBV.

Adicionalmente, os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) no escore de lesão tubular renal quando comparados aos animais dos grupos C e NBV. Foram observadas alterações tais como: necrose tubular, perda de bordura em escova, achatamento das células tubulares e dilatação dos túbulos renais. Os animais do grupo TDF+NBV exibiram uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no escore de lesão tubular quando comparados aos animais ao grupo TDF. Os dados referentes ao escore de lesão tubular estão representados na figura 12 e na tabela 5 (Anexos - seção 7).

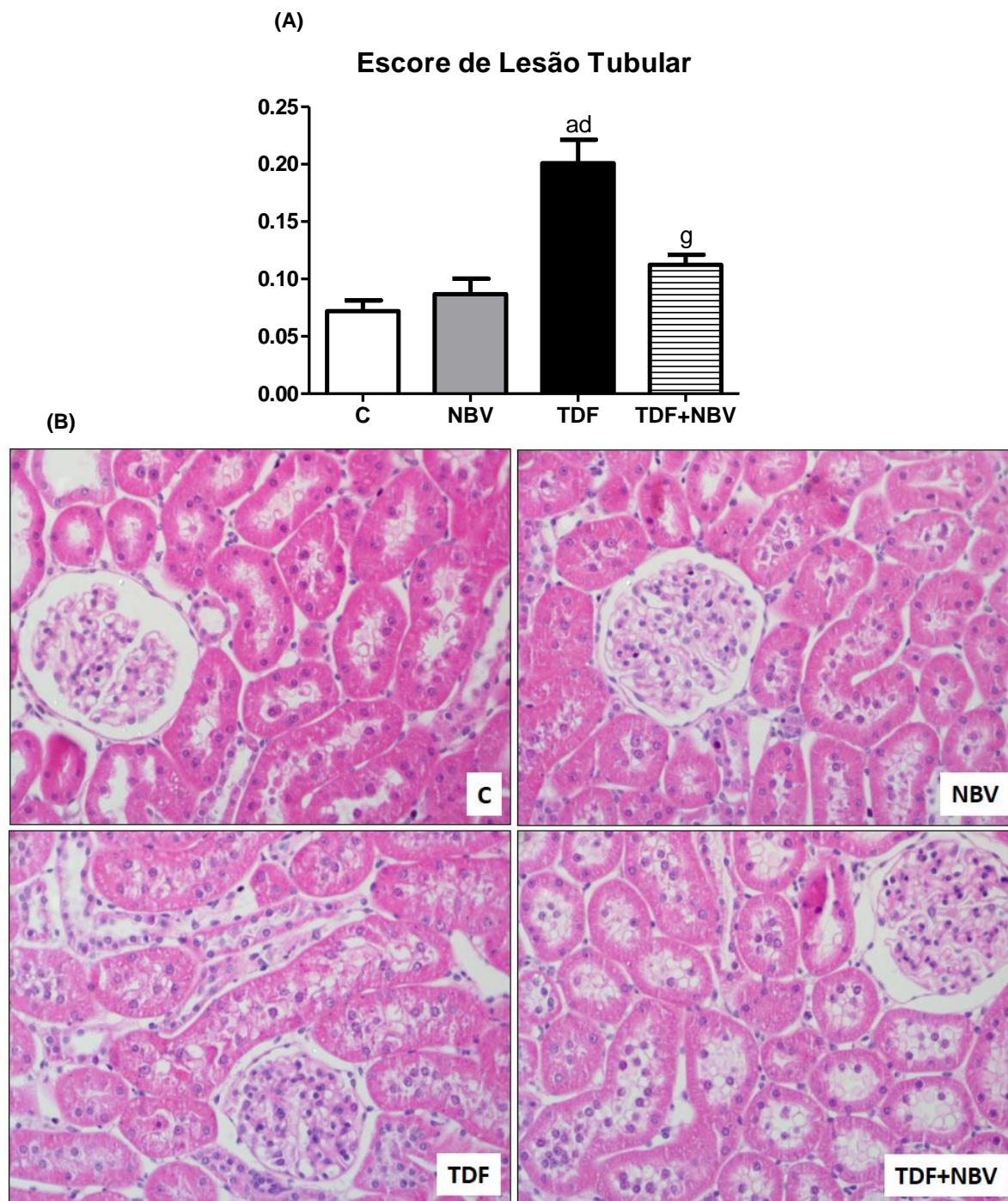


Figura 12 - Escore de lesão tubular renal. (A) Gráfico de barras do escore de lesão tubular renal avaliado ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato C, NBV, TDF e TDF+NBV (400x). Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001 vs. C; ^dp < 0,001 vs. NBV e ^gp < 0,001 vs. TDF. Notar que o escore de lesão foi maior nos ratos TDF e que o tratamento com nebivolol foi capaz de restaurar esse parâmetro nos animais do grupo TDF+NBV.

Acredita-se que o TGF- β 1 seja a citocina pró-fibrótica mais importante na iniciação e progressão da fibrose renal. O grupo TDF apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) da concentração de TGF- β 1 (ng/ μ g prot) no tecido renal quando comparado aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma queda significativa neste parâmetro quando comparados ao grupo TDF ($p < 0,01$). Os dados referentes à concentração de TGF- β 1 no tecido renal estão representados na figura 13 e na tabela 4 (Anexos - seção 7).

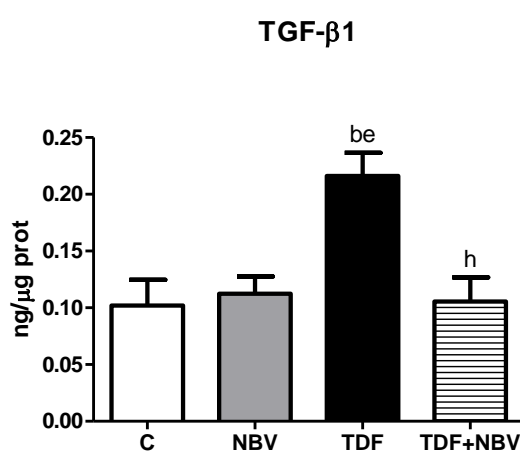


Figura 13 – Quantificação do fator de crescimento TGF- β 1 no tecido renal avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^b $p < 0,01$ vs. C; ^e $p < 0,01$ vs. NBV e ^h $p < 0,01$ vs. TDF.

A concentração de colágeno III (pg/ μ g prot) no tecido renal foi determinada a fim de avaliar a produção e secreção desse componente da matriz extracelular (MEC). Os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de colágeno III quando comparados aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma queda significativa ($p < 0,05$) neste parâmetro quando comparados ao grupo TDF ($p < 0,05$). Os dados referentes a concentração de colágeno III no tecido renal estão representados na figura 14 e na tabela 4 (Anexos - seção 7).

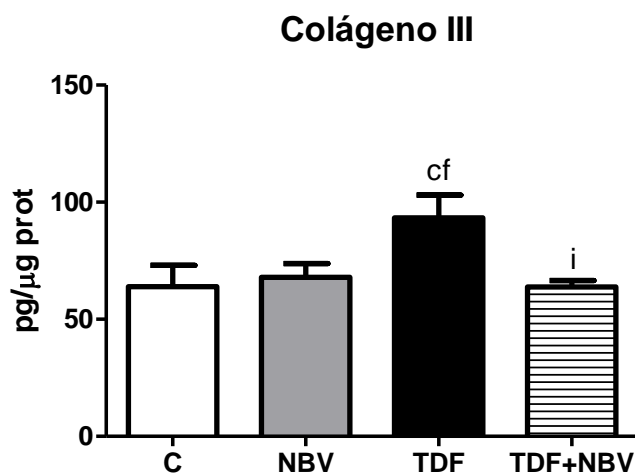


Figura 14 – Quantificação de Colágeno do tipo III no tecido renal avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média ± EPM. ^cp < 0,05 vs. C; ^fp < 0,05 vs. NBV e ⁱp < 0,05 vs. TDF.

O estudo da concentração do biomarcador inflamatório da MCP-1 (ng/μg prot) no tecido renal revelou que o grupo TDF apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) neste parâmetro quando comparado aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão de MCP-1 quando comparados aos animais TDF. Os dados referentes a concentração de MCP-1 estão representados na figura 15 e na tabela 4 (Anexos - seção 7).

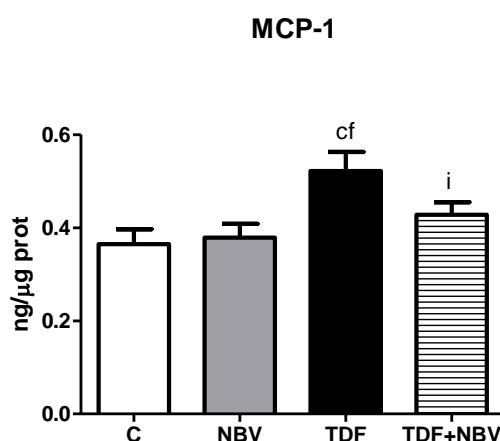


Figura 15 – Quantificação da proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) no tecido renal avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. Valores expressos como média ± EPM. ^cp < 0,05 vs. C; ^fp < 0,05 vs. NBV e ⁱp < 0,05 vs. TDF.

Em concordância com os dados referentes à MCP-1, os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) na porcentagem de células CD68+ no compartimento tubulointersticial quando comparados aos animais dos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) neste parâmetro quando comparados aos animais do grupo TDF. A figura 16 e a tabela 5 (Anexos - seção 7) mostram os resultados para a expressão de células CD68+.

Seguindo com os estudos do perfil inflamatório, os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) da expressão renal de células CD3+ (%) quando comparados aos animais C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na expressão renal de células CD3+ quando comparados aos animais do grupo TDF. Os resultados referentes à expressão renal de células CD3+ estão representados na figura 17 e na tabela 5 (Anexos - seção 7).

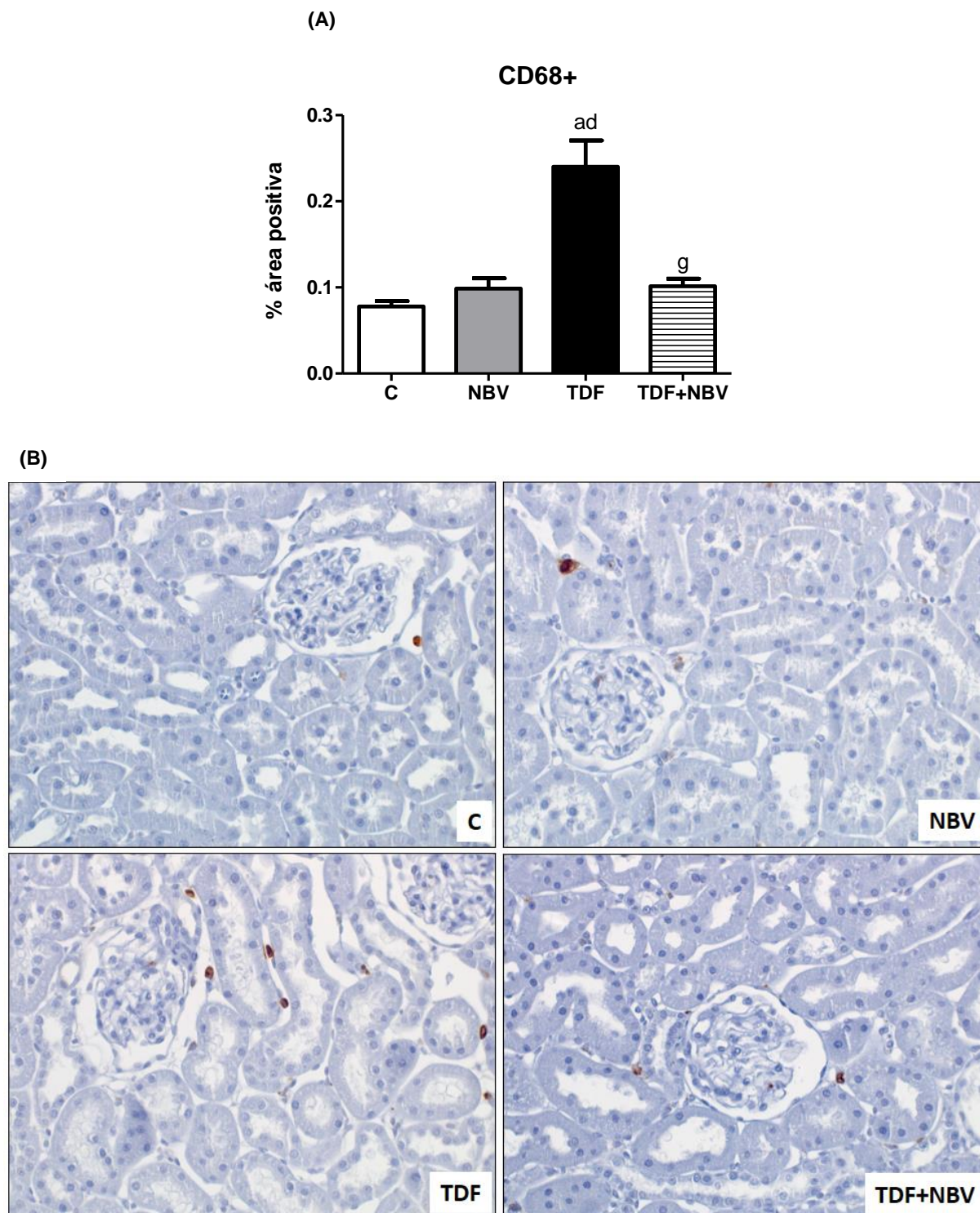


Figura 16 - Expressão de células CD68+ (macrófagos) no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de células CD68+ avaliadas ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. (B) Fotomicrografias representativas da imunolocalização de células CD68+ de um rato C, NBV, TDF e TDF+NBV (400x). Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001 vs. C; ^dp < 0,001 vs. NBV e ^gp < 0,001 vs. TDF. Notar que a expressão de células CD68+ é maior nos ratos TDF e o tratamento com nebivolol melhorou significativamente este parâmetro nos animais do grupo TDF+NBV.

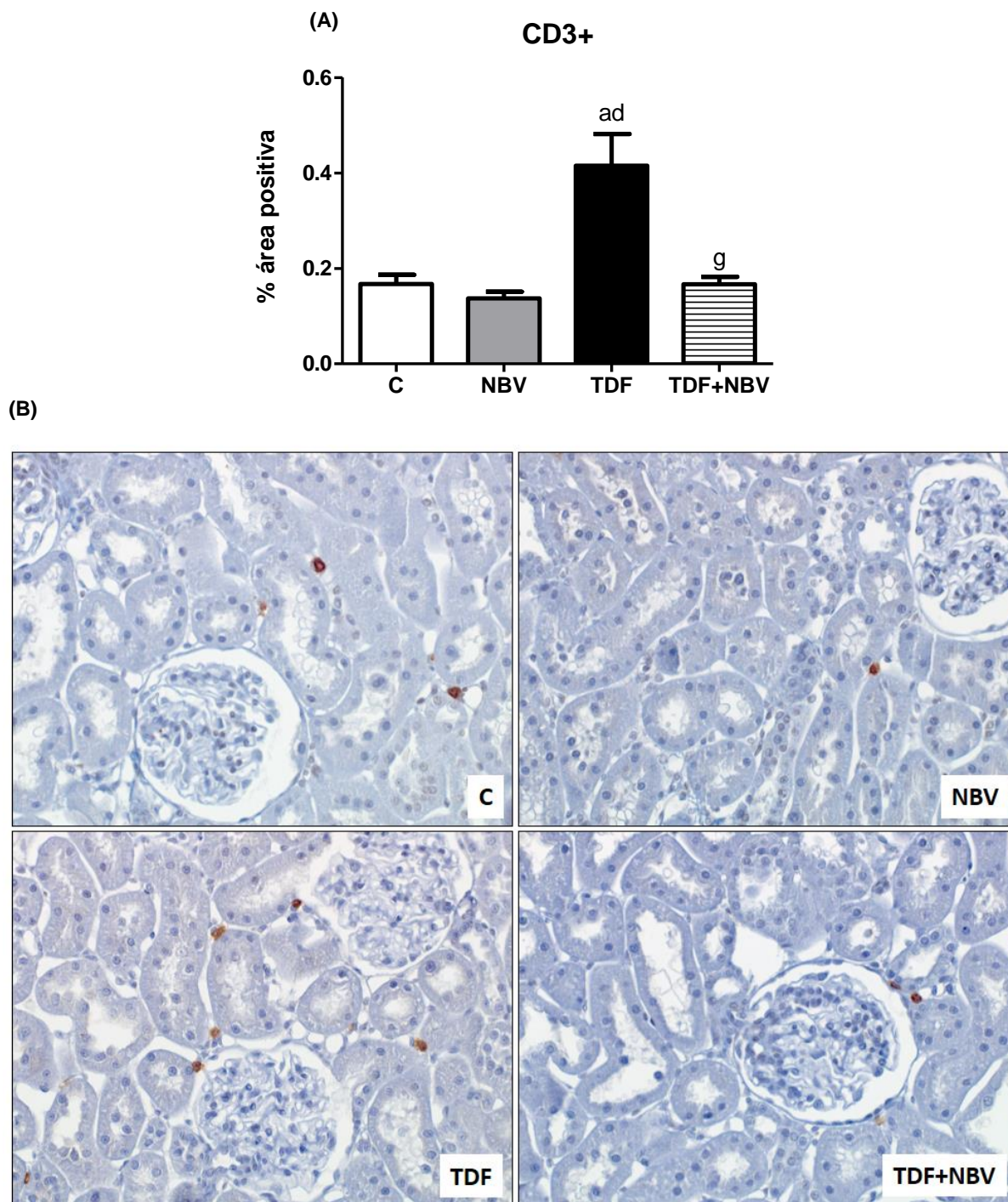


Figura 17 – Expressão de células CD3+ (linfócitos T) no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de células CD3+ avaliadas ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15º ao 30º dia. (B) Fotomicrografias representativas da imunolocalização de células CD3+ de um rato C, NBV, TDF e TDF+NBV (400x). Valores expressos como média \pm EPM. ^ap < 0,001 vs. C; ^dp < 0,001 vs. NBV e ^gp < 0,001 vs. TDF. Notar que a expressão de células CD3+ é maior nos ratos TDF e o tratamento com o nebivolol melhorou significativamente este parâmetro nos animais do grupo TDF+NBV.

O estresse oxidativo foi inicialmente avaliado pelas concentrações de TBARS plasmático, urinário e tecidual. Os resultados estão demonstrados na figura 18 e na tabela 3 (Anexos - seção 7). A concentração plasmática (nmol/mL) e urinária ($\mu\text{mol}/\text{mg creat}$) de TBARS estavam aumentadas significativamente no grupo TDF quando comparado aos grupos C ($p < 0,001$) e NBV ($p < 0,05$). Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na concentração plasmática e urinária de TBARS quando comparados aos animais do grupo TDF. Perfil semelhante foi observado na concentração tecidual (nmol/mg prot) de TBARS. Os níveis de TBARS no tecido renal estavam aumentados significativamente ($p < 0,05$) no grupo TDF quando comparado aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na concentração de TBARS no tecido renal quando comparados aos animais do grupo TDF. Esses resultados sugerem que o tratamento com nebivolol diminuiu a peroxidação lipídica promovida pela administração de tenofovir.

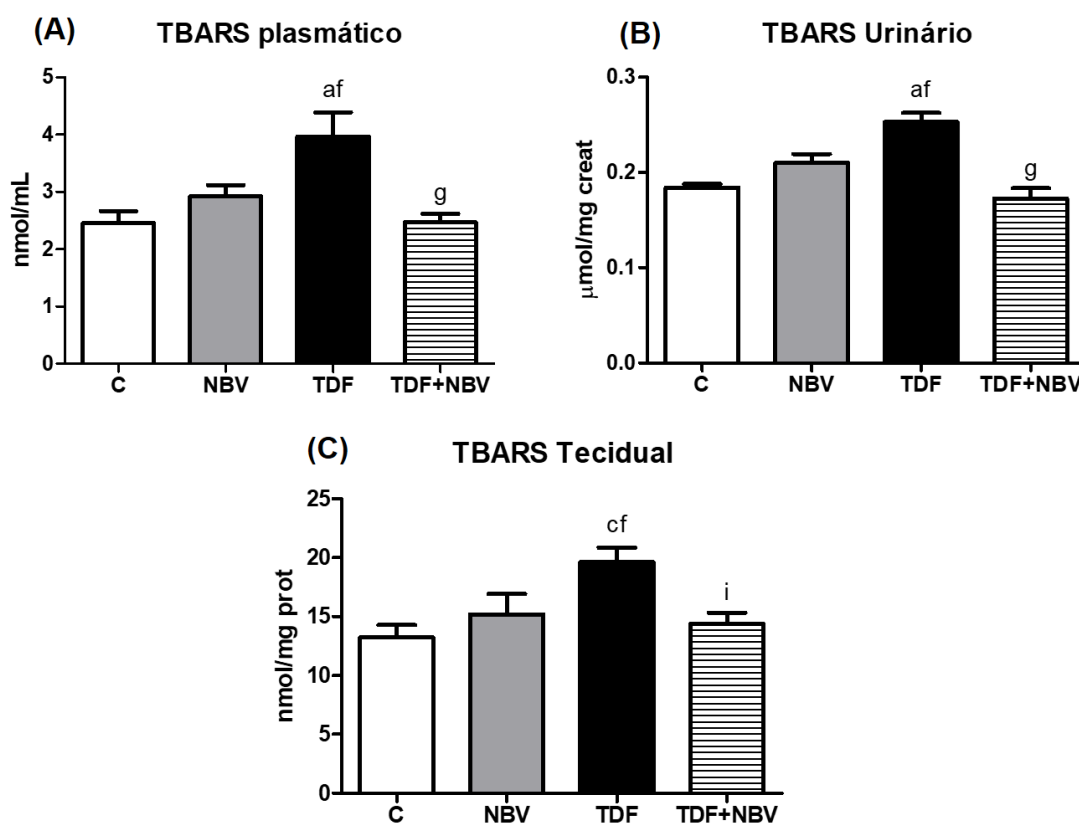


Figura 18 – (A) Concentração plasmática de TBARS, (B) excreção urinária de TBARS e (C) concentração de TBARS no tecido renal avaliadas ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$, ^c $p < 0,05$ vs. C; ^f $p < 0,05$ vs. NBV; ^g $p < 0,001$, ⁱ $p < 0,05$ vs. TDF.

Outro marcador utilizado na avaliação do estado redox é a GSH, um dos principais agentes antioxidantes intracelulares. Os animais do grupo TDF apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da concentração de GSH ($\mu\text{mol/mL}$) quando comparados aos animais dos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de GSH quando comparados aos animais do grupo TDF. Esses resultados corroboram os dados apresentados anteriormente referentes ao estresse oxidativo. A figura 19 e a tabela 3 (Anexos - seção 7) mostram os dados da concentração de GSH.

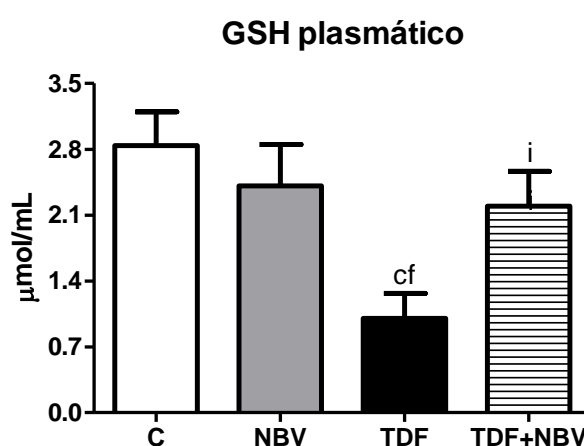


Figura 19 - Concentração plasmática de GSH avaliada ao final dos 30 dias de protocolo de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. Valores expressos como média \pm EPM. ^c $p < 0,05$ vs. C; ⁱ $p < 0,05$ vs. NBV; ^p $p < 0,05$ vs. TDF.

Com o propósito de avaliar mais detalhadamente os efeitos do nebivolol sobre o estresse oxidativo promovido pelo uso de tenofovir, determinamos as expressões proteicas renais das subunidades p47^{phox} e p67^{phox} da NOX, fonte predominante do estresse oxidativo renal. Os nossos resultados demonstraram que a expressão proteica de p47^{phox} (%) estava aumentada ($p < 0,001$) no grupo TDF quando comparado aos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa na expressão proteica de p47^{phox} quando comparados aos animais do grupo TDF. Resultados semelhantes foram observados na expressão proteica de p67^{phox}. Os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) desta subunidade quando comparados aos animais dos grupos C e NBV. Os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da

expressão proteica de p67^{phox} quando comparado aos animais do grupo TDF. Dessa forma, nossos achados indicam que o tratamento com nebivolol está associado a redução da expressão das subunidades necessárias para a atividade da NOX. Os dados referentes a expressão proteica de p47^{phox} e p67^{phox} estão representados na figura 20 e na tabela 4 (Anexos - seção 7).

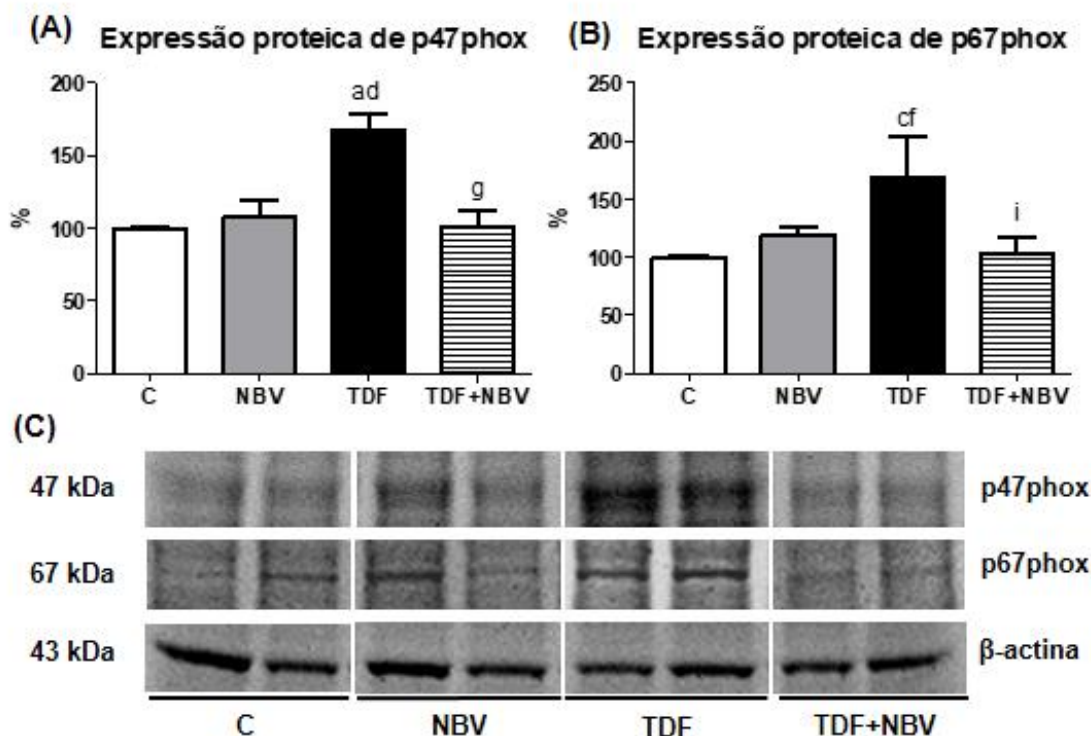


Figura 20 - Análise semiquantitativa da expressão proteica de p47^{phox} e p67^{phox} no tecido renal avaliadas ao final dos 30 dias de protocolo. Densitometria da expressão de (A) p47^{phox} e (B) p67^{phox} das amostras de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. (C) Foto ilustrativa da expressão renal de p47^{phox}, p67^{phox} e β-actina. Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001, ^cp < 0,05 vs. C; ^dp < 0,001, ^fp < 0,05 vs. NBV; ^gp < 0,001, ⁱp < 0,05 vs. TDF.

Para finalizar as análises referentes ao estado redox, determinamos a expressão proteica no tecido renal da manganês superóxido dismutase (MnSOD) e dos principais elementos da via Nrf2/HO-1. O grupo TDF apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) na expressão proteica de MnSOD (%) quando comparado aos grupos C e NBV. O grupo TDF+NBV mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão proteica da MnSOD quando comparado ao grupo TDF. Os dados referentes à expressão proteica da MnSOD estão representados na figura 21 e na tabela 4 (Anexos - seção 7).

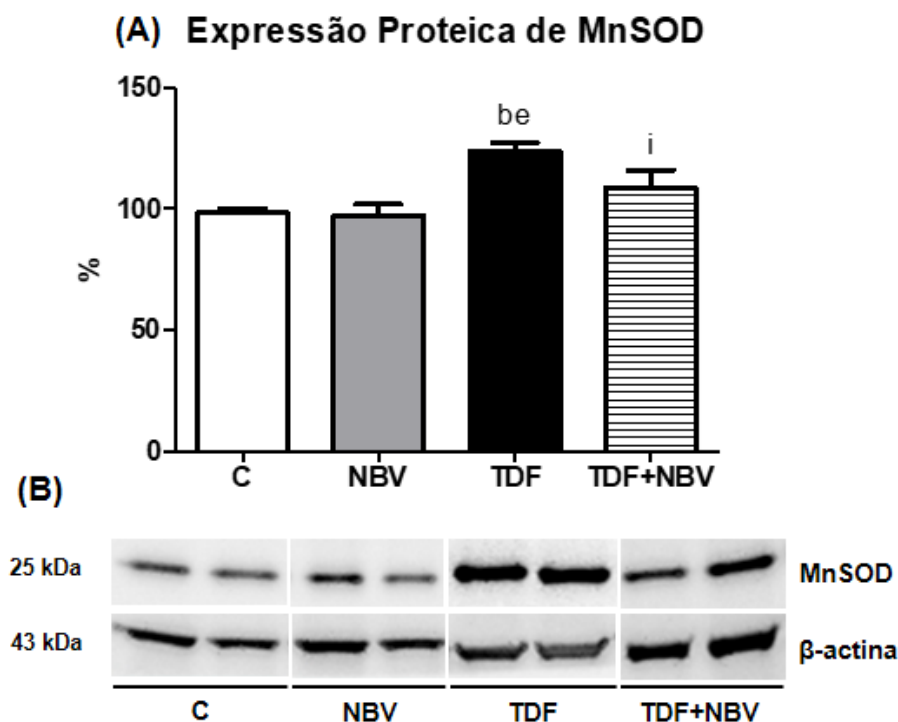


Figura 21 - Análise semiquantitativa da expressão proteica de MnSOD no tecido renal avaliada ao final dos 30 dias de protocolo. (A) Densitometria das amostras de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de neбиволol do 15º ao 30º dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e neбиволol do 15º ao 30º dia. (B) Foto ilustrativa da expressão de MnSOD e β -actina no tecido renal. Valores expressos como média \pm EPM. ^bp < 0,01 vs. C; ^ep < 0,01 vs. NBV; ⁱp < 0,05 vs. TDF.

Perfil semelhante foi observado na avaliação da expressão do fator de transcrição Nrf2 e da enzima HO-1. Os animais do grupo TDF apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) na expressão proteica de Nrf2 (%) quando comparados aos animais dos grupos C e NBV. O grupo TDF+NBV mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na expressão proteica deste fator de transcrição quando comparado ao grupo TDF. Como esperado, o grupo TDF também mostrou uma elevação significativa na expressão proteica de HO-1 (%) quando comparado aos grupos C ($p < 0,001$) e NBV ($p < 0,05$). O grupo TDF+NBV apresentou uma diminuição significativa na expressão desta enzima quando comparado aos grupos C ($p < 0,01$), NBV ($p < 0,01$) e TDF ($p < 0,01$). As quantificações da expressão proteica de Nrf2 e HO-1 estão representadas na figura 22 e na tabela 4 (Anexos - seção 7).

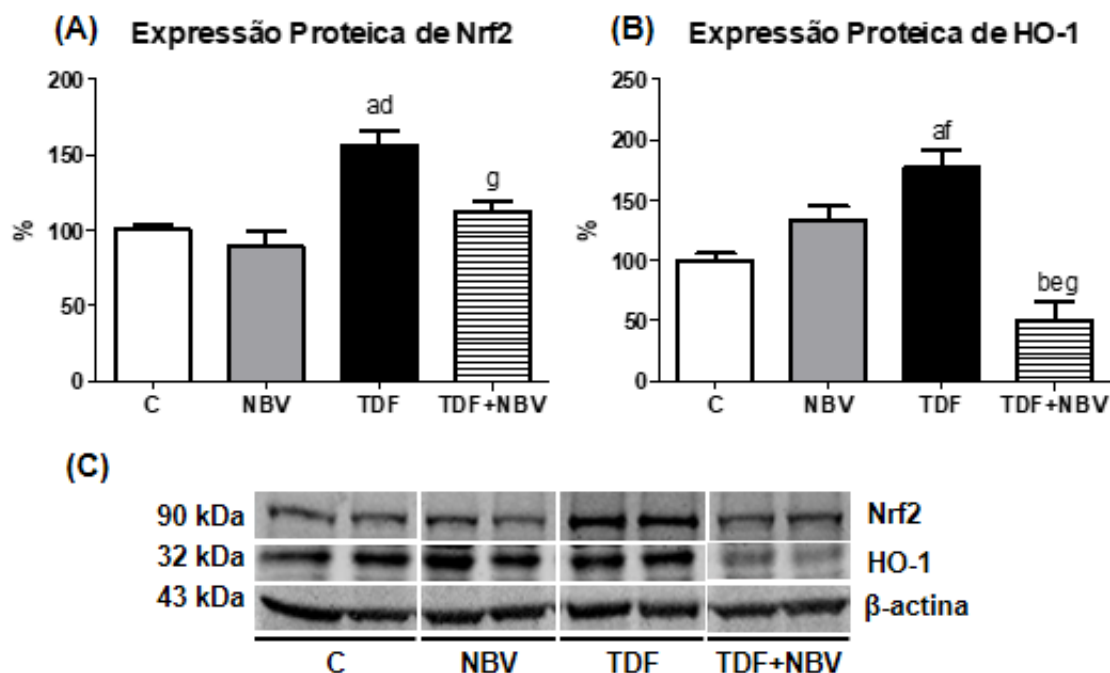


Figura 22 - Análise semiquantitativa da expressão proteica de Nrf2 e HO-1 no tecido renal avaliadas ao final dos 30 dias de protocolo. Densitometria da expressão de (A) Nrf2 e (B) HO-1 das amostras de ratos Controle (C, n=8) tratados com dieta padrão, Nebivolol (NBV, n=8) tratados com dieta padrão por 30 dias adicionada de nebivolol do 15^o ao 30^o dia, Tenofovir (TDF, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e Tenofovir+Nebivolol (TDF+NBV, n=9) tratados com dieta padrão adicionada de tenofovir por 30 dias e nebivolol do 15^o ao 30^o dia. (C) Foto ilustrativa da expressão renal de Nrf2, HO-1 e β-actina. Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001, ^bp < 0,01 vs. C; ^dp < 0,001, ^ep < 0,01, ^fp < 0,05 vs. NBV; ^gp < 0,001 vs. TDF

5. DISCUSSÃO

O número de indivíduos infectados com o HIV tem aumentado nos últimos anos, acometendo principalmente os países subdesenvolvidos [1]. O uso contínuo de tenofovir está associado ao desenvolvimento de nefrotoxicidade podendo levar à IRA ou à doença renal crônica (DRC) [11]. Corroborando dados prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa [14, 22], o presente estudo demonstrou que os animais do grupo TDF apresentaram comprometimento da função renal, hipofosfatemia, hipertensão, dislipidemia, disfunção endotelial e alterações no estado redox. Em contrapartida, o tratamento com nebivolol melhorou a função renal, reduziu a proteinúria, normalizou a PAM, aumentou o FSR e diminuiu a RVR nos animais do grupo TDF+NBV. Além disso, a administração de nebivolol atenuou a lesão renal, reverteu o aumento da expressão dos componentes do SRAA e dos marcadores inflamatórios, mitigou as alterações no perfil lipídico, e normalizou os parâmetros envolvidos na via do NO e o estado redox nos animais TDF+NBV. Esses achados indicam que o nebivolol foi capaz de atenuar a nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir.

O nebivolol atenuou a lesão renal em diferentes modelos experimentais independente da sua ação anti-hipertensiva [44, 45, 47]. No presente estudo, a administração de nebivolol melhorou a TFG e reduziu a proteinúria dos animais previamente tratados com tenofovir. Essa ação está possivelmente associada ao efeito farmacológico específico do nebivolol na capacidade de aumentar a biodisponibilidade de NO, melhorar as defesas antioxidantes e reduzir a fibrose renal [44, 53]. Além disso, Wang *et al.* reportaram que ratos *Zucker* obesos diabéticos (ZDF) tratados com nebivolol apresentaram uma diminuição do dano tubular e do espessamento da membrana basal glomerular e uma restauração dos podócitos, resultando no aumento do clearance de creatinina e na redução da proteinúria [54]. Nossos resultados ainda demonstraram que a integridade vascular do tecido renal dos animais TDF+NBV estava mais preservada em relação aos animais TDF. A JG12 tem sido empregada como um marcador de endotélio vascular. Essa proteína é responsável por manter as células ancoradas na membrana celular juntamente com o complexo glicosil-fosfatidil-inositol [55-58]. O dano causado no endotélio vascular é crítico e desencadeia uma série de mudanças patológicas presentes na progressão da doença renal [56]. O nosso estudo demonstrou que os animais do grupo TDF

apresentaram uma diminuição na expressão glomerular da JG12 e uma tendência de aumento na expressão dessa proteína no endotélio vascular glomerular dos animais TDF+NBV, o que possivelmente contribuiu para a melhora da função renal observada nesses animais.

A proteinúria ocorre geralmente em conjunto com o aumento da PAM em indivíduos com DRC. A hipertensão é um fator de risco bem conhecido e está associada ao comprometimento cardiovascular e à progressão da doença renal [59]. Estudos experimentais [44, 54] e clínicos [60] já demonstraram que o nebivolol diminui a PAM e reverte a disfunção endotelial. Em concordância com os dados previamente publicados, nosso estudo demonstrou que os animais do grupo TDF+NBV apresentaram uma normalização da PAM. Esse resultado foi acompanhado de uma diminuição na concentração plasmática e tecidual de angiotensina II. Corroborando esses achados, os níveis plasmáticos de aldosterona também foram atenuados com o tratamento com nebivolol. O SRAA tem um papel importante no controle da hemodinâmica renal, da pressão sanguínea e na homeostase de sódio [61, 62]. O néfron possui todos os componentes do SRAA: o angiotensinogênio (AGT) sintetizado no túbulo proximal, a renina produzida pelo aparelho justaglomerular e túbulo distal, a enzima conversora de angiotensina (ECA) e os receptores de angiotensina II localizados ao longo do néfron [63]. A angiotensina II é um potente vasoconstritor sistêmico que eleva os níveis da PAM, promovendo a destruição de néfrons e, conseqüentemente, perda de massa renal e piora da DRC [64]. Apesar da secreção renal de renina ser o regulador da formação de angiotensina II, este componente promove diretamente a vasoconstrição e a secreção de aldosterona através da sua ligação com os receptores do tipo 1 de angiotensina II (AT-1) [22]. Blumenfeld *et al.* relataram que os bloqueadores dos receptores β -adrenérgicos são geralmente negligenciados como supressores da secreção de renina e da formação de angiotensina II. Os autores demonstraram que a atividade de renina plasmática e os níveis de angiotensina II e aldosterona foram reduzidos notavelmente durante o uso de β -bloqueadores em pacientes hipertensos [65].

Além da restauração da PAM, o grupo TDF+NBV apresentou um aumento significativo do FSR e uma diminuição importante da RVR. É conhecido que a redução

da produção ou disponibilidade de NO, produzido pela L-arginina via eNOS, está relacionada à disfunção endotelial e hipertensão [66, 67]. O NO renal é sintetizado primariamente pela eNOS e pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). A eNOS é responsável por manter a TFG e o FSR enquanto a nNOS participa no controle da hemodinâmica glomerular. Entretanto, o NO produzido pela iNOS pode levar à apoptose e à peroxidação lipídica. Dessa forma, é plausível assumir que a regulação das 3 isoformas da NOS pelo nebivolol contribui para os seus efeitos protetores no rim [68]. Nosso estudo demonstrou que a melhora dos padrões hemodinâmicos renais está possivelmente associada ao aumento da atividade da isoforma endotelial da NOS e à diminuição da isoforma induzível da NOS, indicando que a ligação do nebivolol aos receptores adrenérgicos β_3 induz a vasodilatação através da modulação destas enzimas nas células endoteliais [42].

Outra característica importante do nebivolol está relacionada à redução da ADMA, um inibidor endógeno competitivo das isoformas da NOS, que também está associada à disfunção endotelial e à inibição da produção de ERO, conferindo a esta droga uma propriedade antioxidante importante. A ADMA inibe a atividade da NOS através do bloqueio da captação de L-arginina pelas células, levando a uma redução nos níveis de NO e resultando em um distúrbio da função endotelial [66, 69]. Níveis plasmáticos elevados de ADMA não estão ligados somente com a disfunção endotelial, mas também ao aumento do estresse oxidativo [66, 69]. Lin *et.al.* reportaram que a elevação da concentração de ADMA está relacionada com o aumento da produção de ERO no modelo experimental de diabetes mellitus [70]. Nosso estudo demonstrou que os animais do grupo TDF apresentaram um aumento na concentração plasmática de ADMA que foi revertido com o tratamento com nebivolol no grupo TDF+NBV. Esses resultados sugerem que a ADMA é um marcador de disfunção endotelial importante e que, possivelmente, a sua diminuição foi responsável pela normalização da expressão proteica de eNOS nos animais do grupo TDF+NBV. A combinação dos efeitos benéficos do nebivolol nas vias do SRAA e do NO resulta em uma proteção cardiovascular [64] e renal e pode justificar a sua eficiência na redução da PAM e na melhora dos parâmetros hemodinâmicos observados em nossos animais do grupo TDF+NBV. Vale ressaltar que a indução da produção de NO é independente do

bloqueio dos receptores adrenérgicos $\beta 1$ e esta característica é específica do nebivolol [42].

O tratamento com nebivolol, além de atenuar a proteinúria e os danos vasculares, foi capaz de reverter o dano renal causado pelo uso contínuo de tenofovir. A redução da expressão de moléculas pró-fibróticas e de marcadores inflamatórios são os principais achados pelos quais o tratamento com nebivolol atenuou o dano renal em nossos animais do grupo TDF+NBV. O TGF- $\beta 1$ é uma citocina fibrogênica com papel importante na iniciação e progressão da fibrose renal por aumentar a produção e inibir a degradação de proteínas da MEC, alterar a interação célula-célula, modular a infiltração de células inflamatórias e a transformação de células residentes [56, 58]. Toblli *et al.* demonstraram que ratos *ZDF* apresentaram um aumento importante na expressão de TGF- $\beta 1$ e que essa alteração foi normalizada após o tratamento com nebivolol [44]. Corroborando esses achados, nosso estudo demonstrou que os animais do grupo TDF apresentaram um aumento da concentração renal do TGF- $\beta 1$, o qual foi revertido com o tratamento com nebivolol, sugerindo que esse pode ser um dos mecanismos envolvidos nos efeitos antifibróticos desse medicamento.

A fibrose intersticial é caracterizada pelo acúmulo de proteínas da MEC como os colágenos I e III. Em excesso, esse acúmulo de proteína da MEC leva à fibrose renal, à redução da taxa de filtração e à progressão para a doença renal em estágio terminal [71]. Consistente com estudos experimentais prévios [44], nossos resultados demonstraram que o tratamento com nebivolol foi eficiente na normalização dos níveis de colágeno III no tecido renal no grupo TDF+NBV. Além dos efeitos benéficos do nebivolol na fibrose renal, estudos reportam que esta droga também está envolvida na prevenção de eventos inflamatórios [44]. A resposta inflamatória é um dos primeiros processos imunológicos desencadeados após a lesão e é caracterizada pela produção de várias moléculas que iniciam o recrutamento de células imunes para os locais afetados [72]. Entre fatores e células presentes durante a inflamação estão a MCP-1, os macrófagos (CD68+) e as células T (CD3+) [56]. A MCP-1 é uma citocina que medeia a resposta inflamatória no rim através do recrutamento e ativação de monócitos e macrófagos [73]. Além disso, a MCP-1 também estimula a produção de citocinas por células inflamatórias, migração de células endoteliais e musculares lisas,

além de proliferação celular [56]. Estudos anteriores demonstraram que o nebivolol promoveu uma redução significativa de marcadores inflamatórios como a MCP-1 e o CD68+ [44]. Em concordância com esses achados, nossos resultados mostraram que a quantificação de MCP-1 e a expressão das células CD68+ e CD3+ no tecido renal estavam diminuídas no grupo TDF+NBV quando comparado ao grupo TDF. Desta forma podemos inferir que as ações benéficas do nebivolol não somente se estenderam à prevenção do aumento dos marcadores da MEC, mas também atenuaram o processo inflamatório.

A síndrome metabólica é caracterizada por hipertensão, resistência à insulina e dislipidemia [44]. A dislipidemia é definida pelo aumento dos níveis de triglicérides e ácidos graxos livres e pela alteração do colesterol total, que engloba a diminuição da concentração de HDL e o aumento sutil dos níveis de LDL [40]. Os animais do grupo TDF apresentaram um aumento nos parâmetros relacionados ao perfil lipídico que foi atenuado com o tratamento com nebivolol no grupo TDF+NBV. Os β -bloqueadores de terceira geração com propriedades vasodilatadoras têm mostrado um efeito favorável ou neutro no perfil metabólico [40]. Dando suporte aos nossos achados, estudos experimentais demonstraram que o nebivolol tem impacto benéfico na dislipidemia, evidenciado pela redução do acúmulo de colesterol total e triglicérides em modelo de diabetes [44]. A combinação do antagonismo de receptores β -adrenérgicos e a vasodilatação mediada por NO não só potencializa o efeito hipotensor do nebivolol como também confere um perfil metabólico favorável, que é clinicamente importante no tratamento de pacientes hipertensos. Os diferentes efeitos do nebivolol no metabolismo lipídico podem estar relacionados com as suas ações na modulação do estresse oxidativo [74].

Estudos sugerem um papel importante dos elementos oxidantes na patogênese da lesão renal em diferentes modelos experimentais [22, 54]. As ERO são fundamentais no desenvolvimento da injúria renal juntamente com a NOX, que é a maior fonte citosólica de produção de ERO [75]. A atividade da NOX é regulada tanto pela expressão de suas subunidades quanto pela fosforilação de p47^{phox} e p67^{phox}, proteínas expressas em locais específicos do néfron de rins de ratos adultos [53, 76, 77]. Em contrapartida, a redução da defesa antioxidante também contribui para o

aparecimento de estresse oxidativo [68]. O estresse oxidativo, por sua vez, promove a proliferação de células musculares lisas, hipertrofia e deposição de colágeno levando ao espessamento do endotélio e ao estreitamento do lúmen vascular [33]. Além disso, as ERO são um importante mediador do dano renal induzido pelo aumento da atividade do SRAA e são consideradas moléculas altamente reativas [78]. As ERO têm capacidade de oxidar lipídios e proteínas, levando à lesão glomerular e tubular e ao aparecimento de proteinúria. As ERO também promovem o desacoplamento da eNOS, suprimindo a atividade desta enzima e causando a redução da biodisponibilidade de NO [78]. Todas essas ações em conjunto agravam ainda mais a disfunção endotelial, resultando em uma lesão vascular importante na fisiopatologia da injúria renal [68].

Em nosso estudo, a administração de tenofovir levou a um aumento da peroxidação lipídica e à diminuição do principal antioxidante intracelular, evidenciado pela elevação da concentração de TBARS plasmático / urinário / tecidual e redução dos níveis plasmáticos de GSH respectivamente, mostrando a influência do estresse oxidativo no desenvolvimento da lesão renal e no aparecimento da hipertensão. Em concordância com esses achados, o grupo TDF apresentou um aumento importante da expressão proteica das subunidades p47^{phox} e p67^{phox} da NOX. No grupo TDF+NBV, o tratamento com nebivolol reverteu completamente os parâmetros referentes ao estresse oxidativo, sugerindo que o nebivolol possui propriedades antioxidantes importantes na melhora da função e na manutenção da hemodinâmica renal neste modelo experimental. Corroborando nossos resultados, Whaley-Connell *et al.* demonstraram que o tratamento com nebivolol normalizou a função endotelial, reduziu a atividade da NOX e das suas subunidades (Rac1, p47^{phox} e p67^{phox}), diminuiu a formação de superóxidos dependente da NOX e aumentou a biodisponibilidade de NO em modelo de ratos transgênicos para Ren2 [53].

A fim de reforçar a participação do estresse oxidativo na patogênese da nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir, bem como os efeitos benéficos do tratamento com nebivolol, foi avaliado a expressão proteica de Nrf2 e HO-1. Nosso estudo demonstrou que o grupo TDF apresentou um aumento na expressão renal de Nrf2 e HO-1 e a administração de nebivolol normalizou a expressão desses parâmetros nos

animais do grupo TDF+NBV, uma vez que o nebivolol corrigiu os níveis de TBARS e de GSH neste grupo. O estresse oxidativo ativa a sinalização citoprotetora dependente de Nrf2, um fator de regulação transcricional de proteínas antioxidantes [79]. A atividade constitutiva do Nrf2 é essencial na manutenção do balanço redox em uma condição basal e a sua indução acontece em resposta ao estresse oxidativo. Com o aparecimento da lesão celular, o Nrf2 é translocado para o núcleo e estimula a produção de genes citoprotetores como a HO-1 [80, 81].

Além da participação na via de sinalização do Nrf2/HO-1, a mitocôndria possui um papel essencial na proteção contra o estresse oxidativo [82]. A mitocôndria é a maior fonte de ERO [83]. Os ânions superóxidos são produzidos através do processo de fosforilação oxidativa associado ao metabolismo de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, resultando na produção de adenosina trifosfato (ATP) na mitocôndria [82]. A produção aumentada de agentes reativos oxidantes altera a função celular via modificação oxidativa de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A mitocôndria mantém um sistema enzimático antioxidante que elimina o excesso de ERO [82]. A MnSOD é um dos componentes principais desse sistema e é responsável por catalisar a primeira etapa envolvida na eliminação das ERO [82, 84]. Nosso estudo demonstrou que o grupo TDF apresentou um aumento na expressão renal de MnSOD, provavelmente em resposta ao aumento do estresse oxidativo, e o tratamento com nebivolol normalizou esse parâmetro nos animais do grupo TDF+NBV. É conhecido que a nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir está relacionada a anormalidades estruturais da mitocôndria que incluem depleção mitocondrial e mudanças importantes no seu tamanho e forma [11]. Além disso, o tenofovir é capaz de comprometer o DNA mitocondrial, resultando em estresse oxidativo [23]. Corroborando os nossos achados, Mustafi *et al.* reportaram que o aumento das taxas metabólicas e a disfunção mitocondrial contribuíram para a elevação da concentração das ERO, a qual foi suprimida pelo aumento dos níveis endógenos de MnSOD, em células cancerígenas. Esses mesmos autores também relataram que o estresse por calor induziu um aumento moderado de MnSOD nos miócitos cardíacos, conferindo uma proteção contra a injúria por hipóxia-reoxigenação [85].

Em conjunto, nossos achados demonstraram que o grupo TDF apresentou um aumento dos três elementos antioxidantes (Nrf2, HO-1 e MnSOD) possivelmente em resposta ao aumento de TBARS e à diminuição de GSH, sugerindo que tanto o sistema enzimático mitocondrial quanto a via de sinalização do Nrf2 são ativados na presença de estresse oxidativo. Entretanto, existem estudos controversos que evidenciaram uma diminuição do Nrf2 e do seu gene citoprotetor HO-1, mesmo na presença de estresse oxidativo e inflamação, indicando que o rim lesado provavelmente comprometeu a ativação do Nrf2 [75, 81, 86, 87]. Apesar do Nrf2, HO-1 e MnSOD serem considerados elementos protetores, o grupo TDF+NBV apresentou uma diminuição da expressão renal dessas moléculas. Esse resultado pode ser explicado devido à ação antioxidante potente do nebivolol, que já é bem descrita na literatura, e possivelmente pela lesão renal moderada encontrada neste grupo, uma vez que a HO-1 é uma proteína de choque térmico responsiva ao dano tecidual [88].

O presente estudo demonstrou que o tratamento com nebivolol foi eficaz na atenuação da nefrotoxicidade induzida pelo TDF através de uma variedade de mecanismos. Primeiro, o nebivolol melhora a disfunção endotelial via modulação da cascata do NO e está envolvido na manutenção da atividade do SRAA. Segundo, o nebivolol possui uma ação antioxidante sistêmica e renal importante devido ao seu efeito modulatório nas vias de sinalização da NOX e do Nrf2/HO-1 e na restauração do desequilíbrio EROS/NO relacionado à ADMA. Por fim, o nebivolol possui uma ação anti-inflamatória e antifibrótica, resultando em uma atenuação da lesão renal.

6. CONCLUSÃO

O tratamento com nebivolol foi capaz de atenuar a nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir através do seu envolvimento na modulação da cascata do NO e na atividade do SRAA, além das suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antifibróticas. Dessa forma, o nebivolol pode ser considerado uma estratégia terapêutica benéfica para retardar a progressão da doença renal em pacientes em tratamento com tenofovir.

7. ANEXOS

Tabela 1 - Peso corporal, parâmetros funcionais e hemodinâmicos

Parâmetros	C	NBV	TDF	TDF+NBV
PC (g)	361±4	351±4	341±7	344±4
TFG (mL/min/100g)	0,91±0,04	0,82±0,04	0,40±0,04 ^{ad}	0,74±0,03 ^{bg}
PAM (mmHg)	115±4	119±5	146±3 ^{ad}	117±2 ^g
FSR (mL/min)	7,03±0,10	6,78±0,13	5,57±0,06 ^{ad}	5,89±0,15 ^{adi}
RVR (mmHg/mL/min)	16,53±0,63	17,83±0,79	26,05±0,46 ^{ad}	20,71±0,87 ^{afg}

PC, peso corpóreo; TFG, taxa de filtração glomerular; PAM, pressão arterial média; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal. Os dados são expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001; ^bp < 0,01 vs C; ^dp < 0,001; ^fp < 0,05 vs NBV; ^gp < 0,001, ⁱp < 0,05 vs. TDF.

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos

Parâmetros	C	NBV	TDF	TDF+NBV
<u>Plasma</u>				
P _{Na} (mEq/L)	137±1	133±3	138±2	139±1
P _K (mEq/L)	3,96±0,13	3,85±0,26	4,02±0,08	4,30±0,11
P _P (mg/dL)	6,72±0,21	7,09±0,24	5,04±0,14 ^{ad}	6,12±0,40 ^h
Colesterol Total (mg/dL)	39,0±2,8	46,2±2,5	51,7±2,2 ^c	39,2±3,7 ⁱ
Triglicérides (mg/dL)	46,07±9,9	74,0±14,4	158,4±19,3 ^{ae}	111,2±11,1 ^{bi}
Angiotensina II (pg/mL)	138,8±12,0	110,1±6,9	186,8±14,7 ^{ce}	147,8±10,9 ⁱ
Aldosterona (pg/mL)	1128±141	1532±98	2970±192 ^{ad}	1903±190 ^{bg}
ADMA (ng/mL)	56±3	58±6	74±4 ^{cf}	55±4 ⁱ
<u>Urina</u>				
VU (mL)	19±1	16±2	16±2	19±1
Proteinúria (mg/dia)	9,3±1,4	11,9±0,8	18,4±1,1 ^{ad}	14,8±0,4 ^{afh}

P_{Na}, concentração de sódio; P_K, concentração de potássio; P_P, concentração de fosfato; ADMA, concentração de dimetilarginina assimétrica; VU, volume urinário. Os dados são expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001, ^bp < 0,01, ^cp < 0,05 vs. C; ^dp < 0,001, ^ep < 0,01, ^fp < 0,05 vs. NBV; ^gp < 0,001, ^hp < 0,01, ⁱp < 0,05 vs. TDF.

Tabela 3 - Avaliação do estado redox

Parâmetros	C	NBV	TDF	TDF+NBV
TBARS _p (nmol/mL)	2,46±0,21	2,92±0,20	3,97±0,42 ^{af}	2,47±0,15 ^g
TBARS _u (µmol/mg creat)	0,18±0,01	0,21±0,01	0,25±0,01 ^{af}	0,17±0,01 ^g
TBARS _t (nmol/mg tecido)	13,22±1,07	15,20±1,73	19,63±1,24 ^{cf}	14,38±0,94 ⁱ
GSH (µmol/mL)	2,84±0,36	2,41±0,44	1,00±0,26 ^{cf}	2,19±0,37 ⁱ

TBARS_p, concentração plasmática de TBARS; TBARS_u, concentração urinária de TBARS; TBARS_t, concentração de TBARS no tecido renal; GSH, concentração plasmática de glutatona. Os dados são expressos como média ±EPM. ^ap < 0,001, ^cp < 0,05 vs. C; ^fp < 0,05 vs. NBV; ^gp < 0,001, ⁱp < 0,05 vs. TDF.

Tabela 4 - Avaliação da expressão / concentração proteica no tecido renal

Parâmetros	C	NBV	TDF	TDF+NBV
<u>Western Blotting</u>				
eNOS (%)	106±6	100±15	55±10 ^{cf}	124±18 ^h
iNOS (%)	100±4	103±4	213±25 ^{ad}	135±19 ^h
p47 ^{phox} (%)	100±1	108±11	167±12 ^{ad}	100±12 ^g
p67 ^{phox} (%)	100±1	119±7	169±35 ^{cf}	104±13 ⁱ
MnSOD (%)	98±2	97±5	124±4 ^{be}	109±7 ⁱ
Nrf2 (%)	100±3	89±11	157±10 ^{ad}	112±8 ^g
HO-1 (%)	100±6	133±12	177±15 ^{af}	49±16 ^{beg}
<u>ELISA</u>				
Angiotensina II (pg/µg prot)	3,84±1,19	4,51±1,01	8,29±1,31 ^{cf}	3,82±0,74 ⁱ
TGF-β1 (ng/µg de prot)	0,10±0,02	0,11±0,01	0,21±0,02 ^{be}	0,10±0,02 ^h
Col III (pg/µg de prot)	63,9±9,1	67,9±5,9	93,3±9,7 ^{cf}	63,8±2,7 ⁱ
MCP-1 (ng/µg de prot)	0,36±0,03	0,38±0,03	0,52±0,04 ^{cf}	0,43±0,03 ⁱ

eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; MnSOD, manganês superóxido dismutase; Nrf2, fator nuclear eritroide 2; HO-1, heme-oxigenase 1; TGF-β1 fator de crescimento transformador β1; Col III, colágeno III; MCP-1, proteína quimiotática para monócitos 1. Os dados são expressos como média ±EPM. ^ap < 0,001, ^bp < 0,01, ^cp < 0,05 vs. C; ^dp < 0,001, ^ep < 0,01, ^fp < 0,05 vs. NBV; ^gp < 0,001, ^hp < 0,01, ⁱp < 0,05 vs. TDF.

Tabela 5 – Análise histomorfológica e avaliação imuno-histoquímica em tecido renal

Parâmetros	C	NBV	TDF	TDF+NBV
Escore de lesão	0,072±0,009	0,086±0,013	0,200±0,020 ^{ad}	0,112±0,008 ^g
Área glomerular (%)	8813±241	8075±243	8091±159	8379±279
CD68+ (% área positiva)	0,07±0,01	0,09±0,01	0,24±0,03 ^{ad}	0,10±0,01 ^g
CD3+ (% área positiva)	0,17±0,02	0,14±0,01	0,42±0,07 ^{ad}	0,17±0,02 ^g
JG12 (% área positiva)	18,2±1,1	15,9±1,5	12,3±0,6 ^{af}	14,2±0,4 ^b

CD68+, células CD68 positivas; CD3+, células CD3 positivas; JG12, aminopeptidase P. Os dados são expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001, ^bp < 0,01, vs. C; ^dp < 0,001, ^fp < 0,05 vs. NBV; ^gp < 0,001 vs. TDF.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. *Global Summary: HIV and hepatitis*. 2022 [cited 2011 02/13]; Available from: https://www.who.int/health-topics/hiv-aids#tab=tab_1.
2. Campos, P., A. Ortiz, and K. Soto, *HIV and kidney diseases: 35 years of history and consequences*. Clin Kidney J, 2016. **9**(6): p. 772-781.
3. Triant, V.A., et al., *Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(7): p. 2506-12.
4. Brown, T.T. and R.B. Qaqish, *Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review*. AIDS, 2006. **20**(17): p. 2165-74.
5. Jao, J. and C.M. Wyatt, *Antiretroviral medications: adverse effects on the kidney*. Adv Chronic Kidney Dis, 2010. **17**(1): p. 72-82.
6. Goulet, J.L., et al., *Aging and infectious diseases: do patterns of comorbidity vary by HIV status, age, and HIV severity?* Clin Infect Dis, 2007. **45**(12): p. 1593-601.
7. Silva Junior, G.B., et al., *Acute kidney injury in AIDS: frequency, RIFLE classification and outcome*. Braz J Med Biol Res, 2010. **43**(11): p. 1102-8.
8. Gandhi, R.T., et al., *Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2022 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel*. JAMA, 2023. **329**(1): p. 63-84.
9. Soler-Palacin, P., et al., *Prospective study of renal function in HIV-infected pediatric patients receiving tenofovir-containing HAART regimens*. AIDS, 2011. **25**(2): p. 171-6.
10. Boyd, S.D., *Management of HIV infection in treatment-naïve patients: a review of the most current recommendations*. Am J Health Syst Pharm, 2011. **68**(11): p. 991-1001.
11. Fernandez-Fernandez, B., et al., *Tenofovir nephrotoxicity: 2011 update*. AIDS Res Treat, 2011. **2011**: p. 354908.
12. Gish, R., et al., *Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(4): p. 341-53.
13. Zhao, S.S., et al., *Comparison of the efficacy of tenofovir and adefovir in the treatment of chronic hepatitis B: a systematic review*. Virol J, 2011. **8**: p. 111.
14. Liborio, A.B., et al., *Rosiglitazone reverses tenofovir-induced nephrotoxicity*. Kidney Int, 2008. **74**(7): p. 910-8.
15. Fung, H.B., E.A. Stone, and F.J. Piacenti, *Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection*. Clin Ther, 2002. **24**(10): p. 1515-48.
16. Kearney, B.P., J.F. Flaherty, and J. Shah, *Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(9): p. 595-612.
17. Van Rompay, K.K., et al., *Biological effects of short-term or prolonged administration of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (tenofovir) to newborn and infant rhesus macaques*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(5): p. 1469-87.
18. FDA. *Food and Drug Administration Report: Background Package for NDA*. Viread: Tenofovir disoproxil fumarate 2001 [cited 2001 02/10]; Available from: www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3792b1_03_fda-tenofovir.pdf.
19. Woodward, C.L., et al., *Tenofovir-associated renal and bone toxicity*. HIV Med, 2009. **10**(8): p. 482-7.
20. Earle, K.E., et al., *Fanconi's syndrome in HIV+ adults: report of three cases and literature review*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(5): p. 714-21.

21. Karras, A., et al., *Tenofovir-related nephrotoxicity in human immunodeficiency virus-infected patients: three cases of renal failure, Fanconi syndrome, and nephrogenic diabetes insipidus*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(8): p. 1070-3.
22. Canale, D., et al., *Vitamin D deficiency aggravates nephrotoxicity, hypertension and dyslipidemia caused by tenofovir: role of oxidative stress and renin-angiotensin system*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103055.
23. Izzedine, H., V. Launay-Vacher, and G. Deray, *Antiviral drug-induced nephrotoxicity*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(5): p. 804-17.
24. Lebrecht, D., et al., *Mitochondrial tubulopathy in tenofovir disoproxil fumarate-treated rats*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009. **51**(3): p. 258-63.
25. Perazella, M.A., *Tenofovir-induced kidney disease: an acquired renal tubular mitochondriopathy*. Kidney Int, 2010. **78**(11): p. 1060-3.
26. Venter, W.D.F., J. Fabian, and C. Feldman, *An overview of tenofovir and renal disease for the HIV-treating clinician*. South Afr J HIV Med, 2018. **19**(1): p. 817.
27. Herlitz, L.C., et al., *Tenofovir nephrotoxicity: acute tubular necrosis with distinctive clinical, pathological, and mitochondrial abnormalities*. Kidney Int, 2010. **78**(11): p. 1171-7.
28. Fioroti, C.E.A., et al., *Tenofovir-induced renal and bone toxicity: report of two cases and literature review*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2022. **64**: p. e10.
29. Ramamoorthy, H., et al., *Mitochondrial pathway of apoptosis and necrosis contribute to tenofovir disoproxil fumarate-induced renal damage in rats*. Hum Exp Toxicol, 2019. **38**(3): p. 288-302.
30. Krata, N., et al., *Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence?* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018. **66**(3): p. 211-220.
31. Nascimento, M.M., et al., *Treatment with beta-blocker nebivolol ameliorates oxidative stress and endothelial dysfunction in tenofovir-induced nephrotoxicity in rats*. Front Med (Lausanne), 2022. **9**: p. 953749.
32. Hong, Y.A. and C.W. Park, *Catalytic Antioxidants in the Kidney*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(1).
33. Coats, A. and S. Jain, *Protective effects of nebivolol from oxidative stress to prevent hypertension-related target organ damage*. J Hum Hypertens, 2017. **31**(6): p. 376-381.
34. Shamekhi Amiri, F., *Recent advances in the treatment of renal diseases with nebivolol: A literature review*. Nephrol Ther, 2016. **12**(3): p. 140-8.
35. Hilar, O. and D. Ezzo, *Nebivolol (bystolic), a novel Beta blocker for hypertension*. P T, 2009. **34**(4): p. 188-92.
36. Olawi, N., et al., *Nebivolol in the treatment of arterial hypertension*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019. **125**(3): p. 189-201.
37. Fongemie, J. and E. Felix-Getzik, *A Review of Nebivolol Pharmacology and Clinical Evidence*. Drugs, 2015. **75**(12): p. 1349-71.
38. Sahana, G.N., Sarala, N., Kumar, T.N., *Nebivolol - pharmacological aspects*. International Journal of Biological & Medical Research, 2011. **2**(2): p. 577-580.
39. Mercanoglu, G., et al., *The effects of nebivolol on apoptosis in a rat infarct model*. Circ J, 2008. **72**(4): p. 660-70.
40. Marketou, M., et al., *Differential Metabolic Effects of Beta-Blockers: an Updated Systematic Review of Nebivolol*. Curr Hypertens Rep, 2017. **19**(3): p. 22.
41. Morsy, M.A. and G.H. Heeba, *Nebivolol Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2016. **118**(6): p. 449-55.

42. Maffei, A. and G. Lembo, *Nitric oxide mechanisms of nebivolol*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2009. **3**(4): p. 317-27.
43. Gandhi, C., R. Zalawadia, and R. Balaraman, *Nebivolol reduces experimentally induced warm renal ischemia reperfusion injury in rats*. Ren Fail, 2008. **30**(9): p. 921-30.
44. Toblli, J.E., et al., *Long-term treatment with nebivolol attenuates renal damage in Zucker diabetic fatty rats*. J Hypertens, 2011. **29**(8): p. 1613-23.
45. Toprak, O., et al., *Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(3): p. 853-9.
46. Dursun, M., et al., *Protective effect of nebivolol on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats*. Bratisl Lek Listy, 2018. **119**(11): p. 718-725.
47. Hewedy, W.A. and D.K. Mostafa, *Nebivolol suppresses asymmetric dimethylarginine and attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity and endothelial dysfunction in rats*. Pharmacol Rep, 2016. **68**(6): p. 1319-1325.
48. Miyaji, T., et al., *Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(5): p. 900-8.
49. Goncalves, J.G., et al., *Vitamin d deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107228.
50. Burnette, W.N., "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
51. Sedlak, J. and R.H. Lindsay, *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent*. Anal Biochem, 1968. **25**(1): p. 192-205.
52. Vogt, B.L. and J.P. Richie, Jr., *Glutathione depletion and recovery after acute ethanol administration in the aging mouse*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(10): p. 1613-21.
53. Whaley-Connell, A., et al., *Nebivolol reduces proteinuria and renal NADPH oxidase-generated reactive oxygen species in the transgenic Ren2 rat*. Am J Nephrol, 2009. **30**(4): p. 354-60.
54. Wang, Y., et al., *Nebivolol ameliorated kidney damage in Zucker diabetic fatty rats by regulation of oxidative stress/NO pathway: Comparison with captopril*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2018. **45**(11): p. 1135-1148.
55. de Braganca, A.C., et al., *Vitamin D Deficiency Aggravates the Renal Features of Moderate Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Rats*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 282.
56. Dos Santos, M.S., et al., *The Restoration of Vitamin D Levels Slows the Progression of Renal Ischemic Injury in Rats Previously Deficient in Vitamin D*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 625647.
57. Li, P., et al., *Treatment of 5/6 nephrectomy rats with sulodexide: a novel therapy for chronic renal failure*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(5): p. 644-51.
58. Sun, D., et al., *Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction*. Life Sci, 2012. **90**(23-24): p. 900-9.
59. Bakris, G., *Proteinuria: a link to understanding changes in vascular compliance? Hypertension*, 2005. **46**(3): p. 473-4.
60. Tzemos, N., P.O. Lim, and T.M. MacDonald, *Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study*. Circulation, 2001. **104**(5): p. 511-4.

61. Patzak, A. and A.E. Persson, *Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007. **16**(1): p. 46-51.
62. Sparks, M.A., et al., *Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology*. *Compr Physiol*, 2014. **4**(3): p. 1201-28.
63. Ramkumar, N. and D.E. Kohan, *Proximal tubule angiotensinogen modulation of arterial pressure*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013. **22**(1): p. 32-6.
64. Araujo Encinas, J.F., et al., *Does nebivolol have renoprotective action in patients with chronic kidney disease conditions? An integrative review*. *Eur J Pharmacol*, 2021. **905**: p. 174180.
65. Blumenfeld, J.D., et al., *Beta-adrenergic receptor blockade as a therapeutic approach for suppressing the renin-angiotensin-aldosterone system in normotensive and hypertensive subjects*. *Am J Hypertens*, 1999. **12**(5): p. 451-9.
66. Alan, C., et al., *Nitric oxide and asymmetric dimethyl arginine (ADMA) levels in an experimental hydronephrotic kidney caused by unilateral partial ureteral obstruction*. *Int Braz J Urol*, 2016. **42**(3): p. 614-20.
67. Moningka, N.C., et al., *Protective actions of nebivolol on chronic nitric oxide synthase inhibition-induced hypertension and chronic kidney disease in the rat: a comparison with angiotensin II receptor blockade*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(3): p. 913-20.
68. Wang, Y., et al., *Nephroprotective effects of nebivolol in 2K1C rats through regulation of the kidney ROS-ADMA-NO pathway*. *Pharmacol Rep*, 2018. **70**(5): p. 917-929.
69. Deneva-Koycheva, T.I., et al., *Plasma asymmetric dimethylarginine levels in healthy people*. *Folia Med (Plovdiv)*, 2011. **53**(1): p. 28-33.
70. Lin, K.Y., et al., *Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. *Circulation*, 2002. **106**(8): p. 987-92.
71. Song, C.J., et al., *Inflammation and Fibrosis in Polycystic Kidney Disease*. *Results Probl Cell Differ*, 2017. **60**: p. 323-344.
72. Conductier, G., et al., *The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases*. *J Neuroimmunol*, 2010. **224**(1-2): p. 93-100.
73. Ascher, S.B., et al., *HIV preexposure prophylaxis with tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine and changes in kidney function and tubular health*. *AIDS*, 2020. **34**(5): p. 699-706.
74. Agabiti Rosei, E. and D. Rizzoni, *Metabolic profile of nebivolol, a beta-adrenoceptor antagonist with unique characteristics*. *Drugs*, 2007. **67**(8): p. 1097-107.
75. Younis, N.N., et al., *Modulation of NADPH oxidase and Nrf2/HO-1 pathway by vanillin in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*. *J Pharm Pharmacol*, 2020. **72**(11): p. 1546-1555.
76. Chabrashvili, T., et al., *Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney*. *Hypertension*, 2002. **39**(2): p. 269-74.
77. Winiarska, K., et al., *Melatonin nephroprotective action in Zucker diabetic fatty rats involves its inhibitory effect on NADPH oxidase*. *J Pineal Res*, 2016. **60**(1): p. 109-17.
78. Habibi, J., et al., *Nebivolol attenuates redox-sensitive glomerular and tubular mediated proteinuria in obese rats*. *Endocrinology*, 2011. **152**(2): p. 659-68.
79. Shi, S., et al., *Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway*. *Biosci Rep*, 2019. **39**(1).

80. Yonova, D.T., I.; Georgieva, I.; Dimitrova, V.; Arabadjieva, D.; Velkova, N., *Oxidative stress (OS) in chronic kidney disease (CKD): A mini review*. Nephrology and Renal Diseases, 2018. **3**(3): p. 1-3.
81. Zoja, C., A. Benigni, and G. Remuzzi, *The Nrf2 pathway in the progression of renal disease*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29 Suppl 1**: p. i19-i24.
82. Kitada, M., et al., *Manganese Superoxide Dismutase Dysfunction and the Pathogenesis of Kidney Disease*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 755.
83. Kezic, A., et al., *Mitochondria-Targeted Antioxidants: Future Perspectives in Kidney Ischemia Reperfusion Injury*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 2950503.
84. Glover, M., et al., *Overexpression of mitochondrial antioxidant manganese superoxide dismutase (MnSOD) provides protection against AZT- or 3TC-induced endothelial dysfunction*. Antiviral Res, 2014. **111**: p. 136-42.
85. Banerjee Mustafi, S., et al., *Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt*. Cell Stress Chaperones, 2009. **14**(6): p. 579-89.
86. Kim, H.J., et al., *Role of intrarenal angiotensin system activation, oxidative stress, inflammation, and impaired nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 activity in the progression of focal glomerulosclerosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **337**(3): p. 583-90.
87. Kim, H.J. and N.D. Vaziri, *Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F662-71.
88. Gois, P.H.F., et al., *Allopurinol attenuates rhabdomyolysis-associated acute kidney injury: Renal and muscular protection*. Free Radic Biol Med, 2016. **101**: p. 176-189.