UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM

PRISCILLA MENDES CORDEIRO

**Efeito da *Justicia acuminatissima* na injúria renal aguda isquêmica:
estudo experimental**

São Paulo

2016

PRISCILLA MENDES CORDEIRO

**Efeito da *Justicia acuminatissima* na injúria renal aguda isquêmica:
estudo experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades USP – UFAM em Enfermagem na Saúde do Adulto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

Linha de Pesquisa: Tecnologia na Saúde do Adulto

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Fernandes Vattimo

São Paulo

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____

Data:___/___/___

Catálogo na Publicação (CIP)
Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Cordeiro, Priscilla Mendes

Efeito da *Justicia acuminatissima* na injúria renal aguda isquêmica: estudo experimental-- São Paulo, 2016. 70p.

Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orient: Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Fernandes Vattimo

Área de concentração: Enfermagem na saúde do adulto

1. Injúria renal aguda 2. Fitoterapia 3. Plantas Medicinais 4. Antioxidantes 5. Enfermagem
I. Título.

Nome: Priscilla Mendes Cordeiro

Título: Efeito da *Justicia acuminatissima* na injúria renal aguda isquêmica: estudo experimental.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades USP – UFAM em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

Aprovado em: ____/____/____

Comissão Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Darci Mendes e José Cordeiro, meus irmãos, Daniel e Rubens Mendes, que me amam incondicionalmente e me apoiam sempre no que faço, em especial minha mãe.

Aos meus filhos amados, companheiros e amigos, Lyandra Cordeiro e Adolfo Neto, que são sinônimos de amor verdadeiro, pela compreensão de nossas restrições e da distância no período de elaboração deste trabalho.

Aos meus familiares, Mendes e Cordeiro, que estiveram ao meu lado, apoiando e acreditando no alcance de mais um sonho. Em especial a minha vizinha Dagmar Souza Cordeiro (in memoriam), meu vizinho João Boanerges E. Cordeiro (in memoriam), exemplos de amor e de vida.

Aos meus amigos derradeiros, de longas datas, de datas curtas, mas que acompanharam, torceram e estenderam as mãos nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^ª Dr^a Maria de Fatima Fernandes Vattimo, que convidou, orientou e confiou em mim para executar este experimento. Obrigada pela confiança, orientação e oportunidade ímpar na realização desta pesquisa padrão ouro.

À equipe do LEMA, em especial Dra. Cassiane Dezoti, Dra. Mirian Watanabe, Sheila Fernandes, que fizeram parte desse processo, provando que sonho que se sonha juntos vira realidade. Obrigada pela transferência de conhecimento, paciência e o trabalho em equipe.

Aos docentes da escola de enfermagem da USP, em especial a Prof^ª Dr^a Katia Grillo, que se preocupou e me prestigiou em vários momentos desta trajetória. Obrigada a todos pela construção do conhecimento nas disciplinas realizadas em Manaus e em São Paulo.

Aos funcionários da FEUSP, desde a guarita à direção. Obrigada pelo apoio.

Ao pesquisador Rildo Volpini, pelo trabalho de análise histológica dos rins. Obrigada pela colaboração.

A Betty, colegas do curso de RAPG, Prof. Paiva, Prof^a Célia Cristina Cunha e Sarah Diva pela direção na edição do texto. Muito obrigada pela contribuição.

À Prof^a Dr^a Nair Chasse, que disponibilizou e dedicou do seu tempo para auxiliar no andamento deste DINTER. Obrigada pela dedicação.

A todos os meus colegas do DINTER, que me acompanharam desde o momento da seleção até o desfecho deste estudo. Em especial Abel Muri Gama Santiago, o qual me incentivou e caminhou comigo do início até o final. A Riziolêia Marina que acreditou na minha capacidade e me apoiou em todos os momentos. Obrigada a todos pelo incentivo, ajuda e por acreditarem que juntos conseguiríamos alcançar esta meta.

Aos poucos colegas do colegiado de Enfermagem e direção do ISB – UFAM que deram o apoio necessário no momento desta qualificação, mesmo diante de tantos percalços. Em especial à Prof^a Hermelinda Albuquerque e ao Prof. Brenner Kássio. Obrigada pelo apoio.

À pessoa especial Profª Msc Gisele Torrente que incentivou meus passos na nefrologia.

Obrigada pelo incentivo e pelo despertar nesta área.

Aos meus amigos de São Paulo (SP) e do Amazonas, que me acolheram e me acompanharam nesta trajetória em SP: Ivillín Hiorranna, Ingrid Merllin, Fernando Faustino, Hindira Alana, Sandra Damasceno, Ângela, Hadelândia, Lisbeth, Ellen, Zilmar, Ana Paula, Alaidistânia, José Ricardo, Zelina, Braian Sanches e Carlota Michelle e família.

A todos os meus familiares e amigos que acreditaram na realização deste sonho. Agradeço de coração.

Agradeço a Deus!

“Você não sabe o quanto eu caminhei, para chegar até aqui. Percorri milhas e milhas antes de dormir. Eu não cochilei.” (Cidade Negra)

Cordeiro PM. Efeito da *Justicia acuminatissima* na injúria renal aguda isquêmica: estudo experimental [Tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2016.

RESUMO

Introdução: Injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome cuja etiologia mais frequente é isquemia reperfusão. Diversos estudos clínicos e pré-clínicos sobre IRA têm sido desenvolvidos no sentido de esclarecer os seus mecanismos fisiopatológicos e as possíveis intervenções farmacológicas com efeito renoprotetor. Merecem destaque os resultados renoprotetores de alguns fitomedicamentos. Esse estudo avaliou o efeito da *Justicia acuminatissima*, planta da região amazônica com propriedades anti-inflamatória e antioxidante, sobre o modelo experimental mencionado. **Objetivo:**

Avaliar a função renal, o perfil oxidativo e a histologia renal dos ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal, tratados com *Justicia acuminatissima* (sara tudo).

Métodos: ensaio pré-clínico com Ratos Wistar, adultos, machos (250-350g), distribuídos nos grupos SHAM, Isquemia 30 minutos e Isquemia + sara tudo (1,0g/kg, via oral, 1 vez). Foram avaliados os parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial média - PAM, frequência cardíaca - FC, resistência vascular renal – RVR e fluxo sanguíneo renal – FSR), função renal - FR (*clearance* de creatinina - Clcr), estresse oxidativo (peróxidos urinários – PU, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARs, óxido nítrico – NO e tióis no tecido renal) e histologia renais.

Resultados: O grupo Isquemia demonstrou declínio na FR, associado ao aumento de PU, TBARs e NO, além da redução dos tióis. O pré-tratamento com “sara tudo” atenuou a lesão funcional, com elevação do Clcr, redução dos marcadores oxidativos (PU, TBARs e NO) e elevação de tióis. Quanto à hemodinâmica renal, o grupo Isquemia demonstrou elevação da RVR e redução do FSR ($p<0,05$), enquanto que o tratamento com sara tudo induziu melhora significativa desses parâmetros. A análise histológica confirmou edema, infiltrado, achatamento e necrose tubular no grupo Isquemia, enquanto que o grupo tratado com “sara tudo” apresentou melhora desses parâmetros. **Conclusão:** A proteção renal da *Justicia acuminatissima*, na IRA isquêmica, caracterizou-se por melhora significativa da função renal, reduzindo a lesão oxidativa, com impacto positivo na histologia renal.

Descritores: Injúria renal aguda; Isquemia / Reperfusão; Fitoterápicos; *Justicia acuminatissima*.

Cordeiro PM. Effect of *Justicia acuminatissima* in ischemic acute kidney Injury: experimental study [thesis]. São Paulo: School of Nursing at the University of Sao Paulo; 2016.

ABSTRACT

Introduction: Acute Kidney Injury (AKI) is a syndrome with growing prevalence, which ischemic-reperfusion is most frequent cause. Several clinical and pre-clinical studies about AKI have been developed to verify the pathophysiological mechanisms and the possible pharmacological interventions. The renoprotector effect of some phytomedicine in AKI induced by ischemia in rats model must be highlighted. This study evaluated the effect of *Justicia Acuminatissima* (sara tudo), plant from the Amazon region with antiinflammatory and antioxidant properties, in experimental model of AKI. **Objective:** To evaluate renal function, oxidative profile and renal histology in rats submitted to renal ischemia-reperfusion treated with *Justicia Acuminatissima*. **Method:** pre-clinical trial with Wistar rats, adult, male (250-350g), divided into groups: SHAM, Ischemia 30 minutes and Ischemia + (sara tudo) (1,0g/Kg, gavage, once). Hemodynamics parameters (medium arterial pressure-MAP; heart rate-HR; renal vascular resistance-RVR and renal blood flow- RBF), renal function - RF (creatinine clearance), oxidative stress (urinary peroxides-UP, thiobarbituric acid reactive substances- TBARS, nitric oxide- NO and thiols in renal tissue) and kidney histological analysis were evaluated. **Results:** The ischemia group demonstrated a decline on renal function (RF) associated with increase in UP, NO and TBARS and reduction in thiols levels. The pre-treatment with “sara tudo” resulted in understatement of functional injury, increase of crCl and reduction of oxidative biomarkers (UP, TBARS and NO) and enhancement of thiols levels. Considering renal hemodynamics, the ischemia group demonstrated increase in RVR with the decrease in RBF. The treatment with “sara tudo” induced significant improvement in these parameters. Histological analysis confirmed edema, infiltrated, flatness and tubular necrosis in ischemia group, while the “sara tudo” group presented amelioration in these parameters. **Conclusion:** The renoprotective effect of *Justicia Acuminatissima*, in ischemic AKI, features significant improvement in renal function, reducing the oxidative damage with positive impact in renal histology.

Keywords: Acute kidney injury, ischemia reperfusion, *Justicia acuminatissima*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - As cinco fases evolutivas na clínica da injúria renal aguda (IRA) induzida por isquemia e reperfusão	24
Figura 2 - <i>Jusiticia acuminatissima</i> ou sara tudo ou sara tudo de quintal.....	27
Figura 3 - Gaiola metabólica: coletor de diurese nas 24h.....	35
Figura 4 - Cortes histológicos dos grupos	48

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Função renal global. São Paulo, 2016.....43

Tabela 2 - Parâmetros hemodinâmicos. São Paulo, 2016.....44

Tabela 3 - Perfil oxidativo. São Paulo, 2016.....46

Tabela 4 - Alterações tubulointersticiais do tecido renal. São Paulo, 2016.....47

LISTA DE ABREVIATURAS

i.p.	intraperitoneal
v.o.	via oral
vs	<i>versus</i>

LISTA DE SIGLAS

ADH	hormônio antidiurético
ATP	trifosfato de adenosina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIP	catalogação na publicação
Clcr	<i>clearance</i> de creatinina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CrS	creatinina sérica
CrU	creatinina urinária
DINTER	doutorado interinstitucional
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRC	doença renal crônica
eNOS	óxido nítrico endotelial
EEUSP	Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERMO	espécies reativas do metabolismo de oxigênio
FC	frequência cardíaca
FG	filtração glomerular
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fox-2	método xilenol laranja versão-2
FR	função renal
FSR	fluxo sanguíneo renal
FU	fluxo urinário
GERA	Grupo de Estudo em Lesão Renal Aguda
GSH	glutathione
GSH – Px	glutathione peroxidase
GSSG	glutathione oxidada
HE	hematoxilina-eosina
ICAM-1	moléculas de adesão intercelular – 1
I/R	isquemia - reperfusão
ICB-USP	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo
IRA	injúria renal aguda

ISQ	isquemia
ISQ + ST	isquemia + sara tudo
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
LEMA	Laboratório Experimental de Modelos Animais
MDA	malondealdeído
NTA	necrose tubular aguda
NTK	células natural <i>killer</i>
PAM	pressão arterial média
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PU	peróxido urinário
RFG	ritmo de filtração glomerular
RVR	resistência vascular renal
SHAM	controle cirúrgico
SUS	Sistema único de saúde
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFG	taxa de filtração glomerular
TLRs	toll-like
TSR	terapia substitutiva renal
USP	Universidade de São Paulo
VCAM	moléculas de adesão celular vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	microlitro
μM	micromolar
BHT	2[6]-di-tert-butil-p-cresol
$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	tween-20
$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$	ácido pícrico
Ca^{+}	cálcio
CH_3COONa	acetato de sódio
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico)
DTPA	dietilenotriamina – N,N,N',N' – pentaacetato
Fe^{2+}	ferro II (ferroso)
Fe^{3+}	ferro III (férico)
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	ácido sulfúrico
K+	potássio
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/dl	miligrama por decilitro
min	minutos
ml	mililitro
ml/min	mililitro por minuto
mM	milimolar
mm^2	milímetro quadrado
n	números de animais estudados
Na+	sódio
$\text{Na}_2\text{O}_4\text{W}$	tungstato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NaNO_2	nitrito de sódio
nm	unidade de medição de comprimento da onda de luz visível
nmol	nanomolar

NO	óxido nítrico
NO ₂	nitrito
NOS	óxido nítrico sintase
° C	graus Celsius
O ₂	oxigênio
O ₂ ^{•-}	superóxido
OH ^{•-}	radical hidroxila
ONOO ⁻	peróxido nitrito
p	nível de significância do resultado estatístico
rpm	rotações por minuto
SOD	superóxido dismutase
TCA	ácido tricloroacético
TBS	solução salina-trizma
TBST	solução salina-trizma com detergente tween 20
TEMED	N, N, N', N' – tetrametil etileno diamina
α	coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	30
2.1 GERAL.....	30
2.2 ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 TIPO DE ESTUDO	32
3.2 MATERIAIS.....	32
3.2.1 Reagentes.....	32
3.2.2 Animais	33
3.2.3 Fitoterápico	33
3.3 PROCEDIMENTOS	33
3.3.1 Modelo isquemia-reperfusão por trinta minutos	33
3.3.2 Administração da <i>Justicia acuminatissima</i>	34
3.3.3 Grupos e Protocolo experimental	34
3.3.4 Gaiola metabólica	35
3.3.5 Coleta de amostras e preparo do tecido renal.....	35
3.4 MÉTODOS	36
3.4.1 Avaliação da função renal: <i>clearance</i> de creatinina.....	36
3.4.1.1 Dosagem de creatinina plasmática	36
3.4.1.2 Dosagem da creatinina urinária.....	37
3.4.1.3 Cálculo do <i>clearance</i> de creatinina.....	37
3.4.2 Hemodinâmica renal	37
3.4.3 Avaliação dos metabólitos oxidativos.....	38
3.4.3.1 Método FOX para peróxido urinário.....	38

3.4.3.2 Dosagem de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) na urina.....	39
3.4.3.3 Dosagem de óxido nítrico	39
3.4.3.4 Dosagem de tiois não proteicos no tecido renal.....	40
3.4.4 Análise Histológica	40
3.5 LOCAL	41
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4 RESULTADOS	43
4.1 FUNÇÃO RENAL	43
4.2 HEMODINÂMICA.....	44
4.3 PERFIL OXIDATIVO	45
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL.....	47
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO.....	68

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome caracterizada pela interrupção abrupta da função renal por diversas causas, sendo a isquemia reperfusão I/R uma das etiologias mais frequentes. Condutas preventivas podem amenizar os efeitos deletérios da IRA I/R, entretanto os resultados com fármacos capazes de interferir no curso da síndrome ainda não mostram consistência suficiente para a sua incorporação na prática. A utilização de plantas medicinais, com recursos naturais e renováveis, pode responder a uma hesitação e interromper a paralisia na tomada de decisões na clínica do paciente com IRA, uma vez que representa uma alternativa de menor custo, melhor desempenho clínico, econômico e social, além de abranger populações cujo acesso e crença na halopatia são irregulares.

A doença renal atinge em torno de 10 % da população mundial e representa importante preocupação na saúde pública, devido ao aumento de sua prevalência, impacto na economia e na taxa de morbimortalidade. No Brasil, de acordo com o Censo de Diálise publicado em 2013, o número de pacientes com doença renal crônica (DRC) em tratamento dialítico duplicou na última década, passando de 42.695 em 2000 para 97.586 em 2012. Todavia, o número de pacientes que desenvolve algum grau da doença é superior ao que é identificado, pois se estima que entre 50 a 70% dos pacientes chegam a óbito sem usufruir de qualquer modalidade de terapia substitutiva renal (TSR), ou por escassez no serviço de saúde ou até mesmo por ser uma doença silenciosa, acontecendo a morte antes mesmo de se formular o diagnóstico. O mesmo acontece com a prevalência da IRA, que aumenta no cenário das doenças renais. ⁽¹⁾

Os rins desenvolvem funções hemodinâmicas e bioquímicas, realizando atividades como filtração, reabsorção, funções endócrinas e metabólicas, imprescindíveis para homeostase corporal. A produção de urina caracteriza-se pelos produtos da degradação do metabolismo, proporcionando o equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-básico. Os glomérulos filtram cerca de 1.500 ml de sangue/min, gerando 180 ml/min de um fluido praticamente livre de células e

proteínas. Os túbulos renais realizam a reabsorção, secreção de íons e outras substâncias, proporcionando equilíbrio homeostático, regulado por hormônios, do sistema renina-angiotensina-aldosterona e o hormônio antidiurético (ADH), incluindo o vasodilatador óxido nítrico. ⁽²⁾

Estes mecanismos fisiológicos exigem um elevado grau de complexidade estrutural, em que os vasos sanguíneos, glomérulos, túbulos e interstício são os componentes alvos no acometimento de alguma disfunção renal. As patologias do sistema renal são tão complexas quanto sua estrutura, portanto estudar os componentes morfológicos citados anteriormente facilita o entendimento das manifestações clínicas que afetam cada um deles. Isso não descarta a possibilidade de um mesmo agente afetar mais de uma estrutura, assim como uma das estruturas comprometidas afetar outra secundariamente. Entre as manifestações clínicas mais recorrentes na disfunção renal, destaca-se a azotemia como a síndrome mais comum, acompanhada ou não da oligúria ou anúria, independentemente da etiologia da doença. ⁽³⁻⁵⁾

Dentre as diversas patologias renais, cabe ressaltar a doença renal crônica que ocorre lenta e progressivamente, comprometendo glomérulos, além da já mencionada IRA, que ocorre de forma abrupta com efeitos deletérios iniciais pelos túbulos renais e endotélio vascular. ^(4,5)

A IRA é uma síndrome que tem demonstrado incidência crescente nas últimas décadas e com perspectivas de agravamento em virtude do aumento de expectativa de vida somado com as comorbidades. Estima-se que até 5% dos pacientes internados podem desenvolver IRA, sendo essa mais prevalente nos criticamente enfermos, frequentemente necessitando de tratamentos dialíticos. O retardo no diagnóstico e a manutenção da causa resultam em prolongamento da permanência no hospital, o que pode determinar evolução para a cronicidade, disfunções cardiológicas e até óbito. ⁽⁶⁻⁸⁾

A *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) define clinicamente a IRA na existência de decréscimo do volume urinário menor que 0,50 ml/kg/h por 6 horas; e/ou aumento da creatinina sérica acima de 0,3 mg/dl em 48 horas ou superior a 1,5 mg/dl, a qual se conheça ou se presuma ter ocorrido pelo menos nos 7 dias que precederam a manifestação. ⁽⁹⁾

A IRA classifica-se de acordo com sua etiologia, podendo ser pré-renal quando ocorre a hipoperfusão renal; renal quando compromete o próprio parênquima renal e pós-renal, quando é proveniente de obstrução do fluxo urinário. Há situações clínicas que consistem em risco para a IRA, como idade avançada, doença renal prévia, uso de agentes nefrotóxicos, cirurgias de grande porte, transplante renal, quadros infecciosos sistêmicos graves e liberação de pigmentos (mioglobina, hemoglobina, bilirrubina). ^(9,10)

Esse cenário abrangente de ocorrência da IRA, hospitalar e também comunitária, com pouca ou nenhuma possibilidade de intervenção, pressupõe que a medida mais efetiva para seu controle é a prevenção. O principal condutor para a formulação de protocolos clínicos é conhecer o delineamento epidemiológico da síndrome, além de manusear conceitualmente os mecanismos fisiopatológicos e fatores de riscos envolvidos.

A maioria dos casos de IRA é desencadeado por isquemia, hipóxia ou nefrotoxinas que induzem a necrose tubular aguda (NTA). Na hipovolemia, uma série de alterações vasculares atua para manter redução do fluxo sanguíneo renal (FSR) e o ritmo de filtração glomerular (RFG), evoluindo para a IRA isquêmica. A duração do insulto determina se poderá ser revertida, uma vez que as células afetadas são passíveis de reparos, recuperando oxigênio e substratos metabólicos ofertados pelo retorno do fluxo sanguíneo. Contudo, em lesões mais graves, a reperfusão induz lesão exacerbada e acelerada, agravando o estado de oxidação e de inflamação. A I/R envolve mecanismos fisiopatológicos deletérios como resposta inflamatória, alterações hemodinâmicas, disfunção tubular, lesão nas células epiteliais, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e lesão no endotélio, que podem evoluir para lesão renal e até morte celular. ^(5,10-15)

Na clínica, ela está frequentemente relacionada com a sepse, choque cardiogênico e disfunção de múltiplos órgãos, considerada uma das consequências mais graves após a cirurgia cardíaca e o transplante renal. ⁽¹⁰⁻¹²⁾

A evolução da IRA isquêmica pode acontecer em cinco fases: pré-renal, iniciação, expansão, manutenção e reparo (Figura 01). ^(12, 16-18)

A fase pré-renal se refere às causas hemodinâmica ou nefrotóxica que comprometem o tecido renal, por hipoperfusão renal, resposta inflamatória e redução do fluxo sanguíneo renal. Nessa fase, a integridade celular ainda está preservada. ⁽¹²⁾ A fase de iniciação ocorre com decréscimo da TFG, resultando na depleção do trifosfato de adenosina (ATP), aumento do Ca^{+} citosólico, somado à formação de citocinas pró-inflamatória endotelial e EROs. Nesta fase constataram-se lesões tubulares e vasculares. ^(16,19)

A depleção de ATP induz a lesão tubular, leva à perda de polarização e translocação de moléculas de adesão, em que o transportador $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ -ATPase, que normalmente se localiza na membrana plasmática basolateral, migra para a membrana plasmática apical, reduzindo assim a eficiência do transporte transcelular de sódio e aumento do sódio intraluminal para o túbulo distal. ⁽¹⁸⁾ A lesão no endotélio ocorre com desequilíbrio entre agentes vasodilatadores (óxido nítrico, prostaglandinas E2 e prostaciclina) e vasoconstrictores (tromboxane A2, adenosina, endotelina, angiotensina I, leucotrieno C4). ^(13,17,19) A injúria isquêmica danifica a função de barreira do endotélio, resultando em desorganização da integridade endotelial devido à destruição da adesão celular, como também interrompe a ligação das células endoteliais. Desta forma, a permeabilidade vascular endotelial aumenta a infiltração de leucócitos para o parênquima renal. ^(15, 18, 20)

Figura 01 - As cinco fases evolutivas na clínica da IRA induzidas por isquemia e reperfusão relacionadas à TFG e o tempo em dias. FONTE: Adaptado de Sutton, 2002⁽¹²⁾, consultado no medicinanet. 2016.

A fase de extensão é caracterizada pela lesão microvascular. A lesão no endotélio favorece a produção de molécula de adesão, promovendo a interação leucócito-endotélio, aumentando a geração de EROs, promovendo a agregação plaquetária, obstruindo a microvasculatura renal e intensificando a resposta inflamatória. As características da disfunção endotelial na IRA isquêmica são congestão na região medular, existência de focos hemorrágicos, estase e infiltrado inflamatório. (15, 21-24)

Como mencionado anteriormente, na isquemia renal ocorre a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) ou espécies reativas do metabolismo de oxigênio (ERMO), devido à depleção de ATP, consideradas altamente tóxicas para os néfrons. A produção de EROs é realizada pelas células em condição de hipóxia, resultando da interação do endotélio com as células de defesa. Contudo, estudos demonstram que a produção de EROs é ainda mais intensa na reperfusão renal. O retorno da oxigenação induz a produção de EROs na matriz celular, oxidando proteínas, lipídios e DNA celular. (17, 25-26)

Nos sistemas aeróbicos é fundamental o equilíbrio entre agentes oxido-redutores e sistema de defesa antioxidante, gerado endogenamente como: catalase, glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A GSH é o tiol mais abundante no meio intracelular, sendo considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante celular, protegendo contra lesões resultantes da exposição de ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Além disso, diminui a suscetibilidade à lesão renal induzida por isquemia reperfusão. (25)

O excesso de EROs, resultante da isquemia, determina o desequilíbrio entre o sistema de defesa de antioxidantes e a produção de oxidantes. A reintrodução de O_2 no tecido renal aumenta a geração do superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), associada com a redução dos antioxidantes GSH e SOD. (25-26)

Durante a fase clínica conhecida como manutenção, as células sofrem reparação, migração, apoptose e proliferação em uma tentativa de restabelecer e manter a integridade celular e túbulo. A TFG é mantida estável, embora em nível baixo, determinado pela gravidade do evento inicial. A reparação celular e os resultados da fase de reorganização da função celular melhoram lentamente a

função renal. Na fase de reparação ocorre a diferenciação e repolarização celular, levando à recuperação da TFG. ⁽¹²⁾

Apesar de décadas de pesquisas, a IRA isquêmica ainda dispõe de poucas terapias que interfiram no processo patogênico, entretanto buscam-se intervenções que possam minimizar os efeitos pró-inflamatórios e oxidativos. ⁽²⁷⁾ Estudos experimentais com fitomedicamentos demonstram resultados satisfatórios, como, por exemplo, o efeito antioxidante da *Uncaria tomentosa* e da *Isoflavona*. Demonstrou-se que ambas foram capazes de promover a proteção renal, com aumento do *clearance* de creatinina e redução de metabólitos oxidativos no modelo de lesão renal aguda induzida pela isquemia em ratos. ^(28,29)

No Brasil, apenas em 2006 se estabeleceu a política para o uso de plantas medicinais no serviço público por meio da Portaria nº 971, Decreto nº 5.813, em 03 de maio de 2006. Essa resolução aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), permitindo a prática de tratamento médico por meio da utilização de plantas medicinais e fitoterápicos, propiciando dessa forma a abertura de novos mercados e a superação de barreiras. A fitoterapia vem crescendo no âmbito mundial para condutas terapêuticas preventivas e curativas, estimulando a etnobotânica para avaliação dos extratos de plantas para diversos mecanismos de ação, entre eles antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hemorragica e anestésica. ⁽³⁰⁾

No Amazonas, em especial em alguns municípios do Estado, as dificuldades de acesso ao serviço de saúde e medicamentos, a confiança nas medicações “caseiras”, somadas aos custos reduzidos das plantas, colaboram para a população local fazer uso de plantas medicinais, mesmo que de forma empírica, baseada em indicações consolidadas por anos de interação cultural.

A biodiversidade de plantas medicinais na região do Amazonas é grande, destacando-se a *Justicia acuminatissima* (JA, Miq.) Bremek, Acanthaceae (Figura 02). Ela é um subarbusto encontrado no norte do Brasil, popularmente conhecida como “sara tudo” ou “sara tudo-de-quintal”. Suas folhas são amplamente usadas na preparação de chás consumidos para a cicatrização, como anti-inflamatório e outras indicações. É disseminado ainda o uso do “sara tudo” para o tratamento da infecção do trato urinário. ⁽³¹⁻³⁴⁾

As folhas de *Justicia acuminatissima* são simples, lanceoladas em forma, com ápice acuminado, cuneiforme base, com margem *crenate* e pinadas venação. Os ápices são verdes em ambos os lados, púberes e têm uma consistência membranosa. Eles apresentam geralmente uma extensão de 9 cm de comprimento e 13 cm de largura e entre 3 e 5 cm de sua região central. ⁽³¹⁾

A medicina tradicional no mundo todo faz uso da planta do mesmo gênero em tratamento de várias complicações de saúde, incluindo dores reumáticas, artrites, diabetes, doenças cardíacas, distúrbios gastrointestinais e até mesmo AIDS. No geral utilizam-se as folhas e as raízes. O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Justicia acuminatissima* resultou no isolamento de compostos de diferentes classes químicas, principalmente esteroides e triterpenos. Frações de diclorometano e acetato de etilo exibiram elevada atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. ^(34- 35)

Figura 02 – *Jusiticia acuminatissima* ou “sara tudo” ou “sara tudo de quintal”. Fonte: Foto de Lyandra Cordeiro, 2014.

Estudos que investigaram as propriedades anti-inflamatórias da *Justicia acuminatissima* mostraram que taninos condensados, cumarinas e saponinas formam a maioria dos metabólitos secundários nas folhas. As saponinas agem inibindo receptores de glucocorticóides, relacionados com a resposta inflamatória. As cumarinas possuem atividades antitumorais, bacteriostática e alta capacidade de diminuir edemas. Esses achados reforçam o conceito de que a espécie é rica em compostos biologicamente ativos e tem boa capacidade anti-inflamatória, sendo

confiável para inibir a inflamação por diferentes etiologias, seja de estímulo químico ou físico. Ressalte-se ainda que taninos condensados são descritos como bons antioxidantes. (36, 37)

O grupo de pesquisa GERA (Grupo de Estudo em Lesão Renal) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo (EEUSP) vem desenvolvendo experimentos em modelo animal (ratos), com intervenções com plantas medicinais que atuam na nefroproteção da IRA induzida por isquemia, sepse, nefrotoxicidade, *diabetes melitus*, com resultados significativos na melhora da função renal e redução dos danos oxidativos. (38-42)

O uso corriqueiro pela população amazonense, com pouco ou nenhum resultado consistente sobre os reais benefícios do “sara tudo”, e a ausência de evidências que confirmem o seu efeito em doenças agudas motivaram o desenvolvimento dessa investigação, cuja hipótese é que o “sara tudo” possa determinar resposta renoprotetora na exposição renal à isquemia em ratos.

Estudos em modelos animais permitem a transposição de situações clínicas à bancada, em uma tentativa de, no isolamento de variáveis não abordáveis no humano, poder identificar mecanismos fisiopatológicos e respostas fisiológicas às manipulações medicamentosas ou mecânicas. A identificação dessas particularidades visa elucidar as bases fisiopatológicas da síndrome, mas também fornecer subsídios para a fundamentação de pensamento crítico na tomada de decisões clínicas pela equipe de saúde, particularmente para o enfermeiro.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- ✓ Avaliar o efeito da *Justicia acuminatissima* sobre a injúria renal aguda isquêmica em ratos

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito da *Justicia acuminatissima* sobre a função renal de ratos submetidos à isquemia renal de 30 minutos;
- ✓ Avaliar a hemodinâmica renal dos animais submetidos à isquemia renal com e sem o tratamento da *Justicia acuminatissima*;
- ✓ Avaliar o perfil oxidativo renal dos animais submetidos à isquemia renal com e sem o tratamento da *Justicia acuminatissima*;
- ✓ Realizar análise histopatológica dos rins dos animais isquêmicos tratados com e sem a *Justicia acuminatissima*.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental com modelo animal, utilizando ratos da raça Wistar, considerado estudo primário, intervencional e analítico.

3.2 MATERIAIS

3.2.1 Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com sistema Nanopure da Barnsead. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico da marca Sigma-EUA, exceto quando especificado no texto. A seguir, está descrita a lista de abreviaturas de reagentes e soluções:

- ✓ BCIP 4-bromo-3-clorofosfato
- ✓ BHT 2 [6] – di-tert-butil-p-cresol
- ✓ DTNB 5,5' – ditio-bis (ácido nitrobenzóico)
- ✓ DTPA dietilenotriamina – N, N, N', N' – pentaacetato
- ✓ Fe ²⁺ ferro II (ferroso)
- ✓ Fe ³⁺ ferro III (férico)
- ✓ NaNO₂ nitrito de sódio
- ✓ NBT cloreto de nitrotetrabenzólico
- ✓ NO₂ – nitrito
- ✓ TCA- ácido tricloroacético
- ✓ TBS solução salina – trizma
- ✓ TBST solução salina-trizma com detergente tween 20
- ✓ TEMED N, N, N', N'- tetrametil etileno diamina

3.2.2 Animais

Os procedimentos necessários para realização deste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) sob protocolo nº 126/15 /CEUA – FMUSP (Anexo A).

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 250-350g, fornecidos pelo ICB-USP, mantidos no biotério do LEMA em gaiolas coletivas com até 03 animais, com ambiente térmico adequado, ciclos alternados de dia e noite com livre acesso a água e ração durante todo o experimento.

3.2.3 Fitoterápico

O fitoterápico de intervenção neste estudo é descrito como *Justicia acuminatissima*, também conhecido popularmente como sara tudo ou sara tudo-de-quintal. Foi adquirido em forma de pó, industrializado e comercializado na capital de Manaus-Am.

A dosagem foi ajustada baseada no estudo sobre a planta e por meio de estudo piloto.

3.3 PROCEDIMENTOS

3.3.1 Modelo de injúria renal aguda isquêmica em trinta minutos

Os animais de todos os grupos foram anestesiados com Thiopentax® (tiopental sódico 40-50mg/kg) intraperitoneal (i.p.) e submetidos à laparotomia. No grupo **SHAM**, o controle cirurgia, foi realizada a laparotomia para simulação da isquemia renal, sem clampeamento dos pedículos renais, por 30 minutos.

No grupo **Isquemia**, foi feito o clampeamento bilateral dos pedículos renais por 30 minutos, com clamps vasculares não traumáticos. Após esse período, os clamps foram retirados para se restabelecer a perfusão renal. No grupo **Isquemia + sara tudo**, todos os animais receberam 1.000 mg/Kg de *Justicia acuminatissima*, por gavagem, uma hora (1h) antes do ato cirúrgico. Após uma hora, eles foram submetidos à laparotomia para o procedimento de isquemia.

Todos os animais foram avaliados na recuperação anestésica e receberam analgésicos no pós-operatório, sendo o biotério do LEMA o local de sua recuperação, por um período de repouso nas 24h.

3.3.2 Administração da *Justicia acuminatissima* (sara tudo)

No grupo Isquemia + sara tudo os animais receberam 1.000 mg/Kg de *Justicia acuminatissima*, por gavagem, uma hora (1h) antes da cirurgia. ⁽³²⁾

3.3.3 – Grupos e Protocolo experimental:

Sham

Laparotomia com simulação da isquemia renal por 30 minutos.

Isquemia (ISQ)

Laparotomia para clampeamento bilateral dos pedículos renais por 30 minutos.

Isquemia + sara tudo (ISQ+ST)

Animais receberam 1.000 mg/Kg de *Justicia acuminatissima*, por gavagem 1 hora antes da laparotomia para isquemia.

3.3.4 Gaiola metabólica

Seguido do protocolo, após 24 horas de repouso e recuperação pós operatória, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para obtenção de amostras de diurese de 24h, para estudos da função renal e estresse oxidativo (Figura 03).

Figura 03 – Gaiola metabólica para coleta da diurese nas 24h. FONTE: <http://www.analiticaweb.com.br/p.php?tit=gaiola-metabolica-rato-camundongo-suporte-rack-harvard>. (Consultado março, 2016).

3.3.5 Coleta de amostra e preparo do tecido renal

Após a coleta da diurese, os ratos foram anestesiados com Thiopentax® (tiopental sódico 40-50mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) e submetidos à laparotomia para a mensuração do fluxo sanguíneo renal, que ocorreu pela a artéria renal esquerda, isolada e envolvida por pobres ultrassônicos. A pressão arterial média (PAM) foi registrada por meio da cateterização da artéria carótida esquerda. A coleta de sangue foi feita por punção em aorta abdominal para posterior dosagem de creatinina sérica.

Foi realizada a secção do rim esquerdo, que foi imerso em solução de Metacarn por 24h e após este período foi conservado em etanol 70% e embebido em parafina para cortes histológicos. A coloração do tecido renal fez-se com hematoxilina-eosina e montagem final das laminas para posterior análise.

A seguir, procedeu-se a secção do rim direito, que foi imediatamente resfriado e acondicionado a -4°C para posterior mensuração das substâncias

oxidantes. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados de acordo com as normas éticas para manuseio de animais em laboratório, segundo a cartilha de orientação de descarte de resíduo no sistema da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Avaliação da função renal: Clearance de creatinina (Clcr)

A creatinina é o marcador sorológico padrão utilizado para detectar IRA. Apesar de suas limitações e de outros biomarcadores existentes, sua análise é de baixo custo e a molécula mostra boa estabilidade química na rotina clínica. A TFG pode ser avaliada pelo clearance de creatinina, que consiste na quantidade de creatinina sérica relacionada com a creatinina urinária. A função renal nesta pesquisa foi avaliada pelo clearance de creatinina, por meio do método de Jaffé descrito a seguir: ^(43, 44)

3.4.1.1 Dosagem de creatinina plasmática

A desproteinização do plasma é a primeira fase para a dosagem da creatinina plasmática. Para tal, 0,5ml de plasma diluído em 1,5ml de água destilada (1:5) receberam 0,25 ml de tungstato de sódio 10% e 0,25 ml de ácido sulfúrico 0,75N. Após homogeneização, a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 5000rpm e 1,5 ml do sobrenadante reservado para próxima fase.

Ao sobrenadante foram adicionados 0,3 ml de hidróxido de sódio 0,75 N e 0,3 ml de ácido pícrico 0,036 M. A solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente. Por fim, realizou-se a leitura em espectrofômetro de absorvância em 520 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

3.4.1.2 Dosagem de creatinina urinária

Para a dosagem de creatinina urinária foi preparada a seguinte solução: 0,05 ml de urina diluída em 5 ml de água destilada (1:1000), 1 ml de hidróxido de sódio a 0,75 N e 1 ml de ácido pícrico a 0,036 M. Os mesmos procedimentos descritos para mensuração de creatinina plasmática foram utilizados para mensuração da creatinina urinária.

3.4.1.3 O Clcr foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Clcr} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dl)} \times \text{fluxo urinário (ml/min) de 24 horas}}{\text{creatinina plasmática}}$$

Os valores do Clcr foram expressos em ml/min.

3.4.2 Hemodinâmica renal

Mensuração do fluxo sanguíneo renal ocorreu pela a artéria renal esquerda, isolada e envolvida por pobres ultrassônicos. A resistência vascular renal (RVR) foi calculada através da seguinte fórmula: $\text{RVR} = \text{PAM} / \text{FSR}$. O indicio da IRA está na diminuição da TFG, implicando na alteração hemodinâmica caracterizada pela resistência vascular renal (RVR), caracterizada por nefropatia vasomotora. ⁽¹⁷⁾

3.4.3 Avaliação dos metabólitos oxidativos

3.4.3.1 Método FOX para peróxidos urinários

Os peróxidos são considerados como potenciais indicadores da formação ou resultantes de espécies reativas de oxigênio. A mensuração direta de peróxidos pode ser realizada através do método FOX-2, o qual consiste na utilização de ferro-xilenol laranja para determinação dos níveis de peróxidos. ⁽⁴⁵⁾

Os peróxidos, quando diluídos em solução ácida, oxidam o íon Fe^{2+} para íon Fe^{3+} , como demonstrado na reação abaixo:

O xilenol laranja [ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3'' – bis (metilamino) ácido diacético] apresenta alta seletividade para o íon Fe^{3+} produzindo um complexo de coloração azul-arroxeadado ($\alpha = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). ⁽⁴⁶⁾

A solução FOX-2 foi preparada utilizando, ordenadamente, os seguintes reagentes:

- ✓ 90 ml de metanol
- ✓ 10 ml de água destilada
- ✓ 100 μM xilenol laranja
- ✓ 4 mM BHT (2[6] – di-tert-butil-p-cresol)
- ✓ 25 mM da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- ✓ 250 μM de sulfato ferroso de amônio

Na etapa seguinte, acrescentou a 900 μl desta solução, 100 μl da amostra da urina. Após homogeneização a solução permaneceu em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. A solução foi centrifugada para retirada de resíduos e mantida em gelo por aproximadamente 10 minutos. A leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 560 nm. ⁽⁴⁷⁾

Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária expressos por nmol de peróxidos/grama creatinina ^(48,49).

3.4.3.2 Dosagem de TBARS (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúricos urinário)

O Malondealdeído (MDA) é frequentemente analisado para a determinação dos índices de peroxidação lipídica por ser um dos principais produtos desta cascata. O método para detecção deste produto é realizado por meio do ácido tiobarbitúrico ao qual ele reage ⁽⁵⁰⁾. A dosagem consiste na diluição de 0,2 ml de urina em 0,8 ml de água. A essa solução foram adicionados 1,0 ml de TCA 17,5% e 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico 0,6% pH2. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em banho maria (água fervente), por 20 minutos para que ocorra a reação. Ao término do tempo, a solução foi resfriada em gelo e acrescentou a mesma 1,0 ml de TCA 70%. As amostras foram homogeneizadas, tampadas e incubadas por 20 minutos. Ao fim desta etapa, as soluções foram centrifugadas por 15 minutos 3000rpm e a leitura realizada em espectrofotometria em absorbância de 534nm ^(50,51).

A quantidade de MDA foi calculada através da fórmula:

$$\frac{\text{Abs} \cdot 20}{0,156 \cdot \text{Cr urinária}} = \text{nmoles de TBARS/ Cr urinária}$$

3.4.3.3 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A síntese de NO foi avaliada pela quantificação de nitrito (NO₂) através do método de Griess. A reação é colorimétrica e se baseia na reação dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido (pH entre 2,5 e 5,0). O equacionamento da mensuração de NO foi ajustado para valores de creatinina urinária e todos os valores obtidos foram estabilizados em nmol de NO por grama de creatinina urinária. ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾.

3.4.3.4 Análise de tióis solúveis não proteicos no tecido renal

A quantificação dos tióis seguiu com a homogeneização do tecido renal dos animais dos diferentes grupos com 2ml de solução 10 nM de acetato de sódio (CH_3COONa) 0,5%, tween-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) e 100 μM DTPA (dietilenotriamina-N,N,N',N'-penta-acetato) em pH 6,5. O homogenato foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C para retirada de *debris* teciduais. Uma alíquota foi reservada para imediata mensuração de proteínas totais. A segunda alíquota foi precipitada com TCA a 10% (1:1) e novamente centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração de tióis totais.

O volume de 400 μl das amostras precipitadas e diluídas foram homogeneizadas em 200 μl da solução com 1 mM de DTNB (5,5'- ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) e 100 mM de tampão Tris em pH 8,0. Após 10 minutos em temperatura ambiente, a quantidade de tióis foi determinada pela média da absorbância demonstrada em 412nm ($\alpha=13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A leitura foi realizada em espectrofotômetro ⁽⁵²⁾.

O equacionamento da mensuração de tióis solúveis foi ajustado para a contagem de proteínas total presentes no tecido renal, que exigiu a mensuração de proteínas por meio do uso do kit (BioRad, EUA) baseado no método Brad-ford, utilizando a albumina sérica bovina como padrão. Todos os valores obtidos foram estabilizados por nmol por mg de proteínas totais ⁽⁵²⁻⁵³⁾.

3.4.4 Análise Histológica

Após a eutanásia do animal, o rim esquerdo foi imediatamente isolado seccionado transversalmente em cortes de 2-3 mm de espessura e mantido por 24 horas em solução de Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial 10%). Após este período a solução fixadora foi trocada por álcool 70%, onde os tecidos renais permaneceram até o momento da inclusão em parafina. O tecido renal foi cortado em secções de 4 μm que foram

desparafinizadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE), a qual consiste em corar o tecido para que se estabeleçam ligações salina com radicais ionizáveis presentes no mesmo, facilitando assim a visualização de suas estruturas. Em seguida, foi realizada a análise do comprometimento tubulointersticial do córtex renal dos animais estudados. As alterações tubulointersticiais foram definidas conforme o aparecimento de edema e infiltrado do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação tubular, áreas focais de desnudamento da membrana basal e necrose tubular. Para avaliação do comprometimento tubulointersticial foi utilizado o escore de Shi ⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾, graduado de 0 a 4, onde 0 = normal; 0,5 = pequenas áreas focais; 1 = envolvimento de menos de 10% do córtex e da medula renal externa, 2 = envolvimento de 10 a 25% do córtex renal externa, 3 = envolvimento de 25 a 75% do córtex e da medula renal externa e 4 = alterações extensivas mais de 75% do córtex e da medula externa.

3.5 LOCAL

O estudo foi desenvolvido no Laboratório experimental de Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo (EEUSP), coordenado pela Prof^a Dr^a Maria de Fátima Fernandes Vattimo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e para a análise estatística foi utilizada a análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls Multiple para comparações entre os grupos, usando GraphPad Prism 6.01® software, com nível de significância $p < 0,05$.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 FUNÇÃO RENAL: CLEARANCE DE CREATININA

De acordo com a tabela 1, os animais dos três grupos não apresentaram diferenças na variável peso. (SHAM: 291 ± 31 ; ISQ: 292 ± 11 ; ISQ + ST: 284 ± 23).

O grupo SHAM apresentou resultados da função renal considerados como parâmetro de normalidade (SHAM: $0,97 \pm 0,06$).

O grupo ISQ demonstrou aumento significativo no fluxo urinário (ISQ: $0,031 \pm 0,001$ versus SHAM: $0,011 \pm 0,001$, $p < 0,001$). No grupo ISQ + ST observou-se redução do fluxo urinário comparado ao grupo ISQ e ao grupo SHAM (ISQ + ST: $0,008 \pm 0,002$ versus ISQ: $0,031 \pm 0,002$ e SHAM: $0,011 \pm 0,001$; $p < 0,001$).

O grupo ISQ apresentou redução significativa do clearance de creatinina comparado com o grupo SHAM (ISQ: $0,12 \pm 0,01$ versus SHAM: $0,97 \pm 0,06$; $p < 0,001$). O pré-condicionamento com sara tudo atenuou a redução da função renal nos animais submetidos à isquemia. (ISQ + ST: $0,42 \pm 0,17$ versus ISQ: $0,12 \pm 0,01$; $p < 0,001$).

Tabela 1 - Função renal global dos diversos grupos. São Paulo-2016.

	n	Peso (g)	Fluxo Urinário (ml/min)	CrU (mg/dl)	CrS (mg/dl)	Clcr/100g (ml/min)
SHAM	6	296 ± 18	$0,011 \pm 0,001$	$77,2 \pm 19,0$	$0,30 \pm 0,09$	$0,97 \pm 0,06$
ISQ	5	292 ± 11	$0,031 \pm 0,001^a$	$19,7 \pm 7,0^a$	$2,15 \pm 0,65^a$	$0,12 \pm 0,01^a$
ISQ + ST	8	291 ± 31	$0,008 \pm 0,002^{ab}$	$72,1 \pm 23,8^b$	$0,48 \pm 0,13^b$	$0,42 \pm 0,17^{ab}$

Sendo CrU - creatinina urinária; CrS - creatinina sérica; Clcr - clearance de creatinina; ISQ - Isquemia; ISQ + ST - Isquemia + Sara tudo.

^a $p < 0,001$ vs SHAM

^b $p < 0,001$ vs ISQ

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão.

4.2 HEMODINÂMICA RENAL

Na tabela 2 encontram-se os parâmetros hemodinâmicos dos diversos grupos. O grupo SHAM mostra os valores de normalidade das variáveis.

A frequência cardíaca dos grupos SHAM, ISQ e ISQ + ST não mostraram diferenças significativas.

A PAM do grupo ISQ foi semelhante àquela demonstrada pelo grupo SHAM. Observou-se redução da PAM no grupo ISQ+ST quando comparado ao SHAM (ISQ + ST: $90 \pm 16,1$ versus SHAM: $115 \pm 11,0$; $p < 0,05$), porém, sem repercussão na hemodinâmica renal.

O grupo ISQ demonstrou redução no FSR quando comparado ao grupo SHAM (ISQ: $4,0 \pm 0,6$ versus SHAM: $11,0 \pm 2,0$; $p < 0,05$). O grupo ISQ + ST demonstrou melhora no nível do FSR quando comparado ao grupo ISQ. (ISQ + ST: $7,7 \pm 1,3$ versus ISQ: $4,0 \pm 0,6$; $p < 0,05$).

O grupo ISQ demonstrou aumento na RVR quando comparado ao grupo SHAM (ISQ: $26,3 \pm 4,1$ versus SHAM: $10,9 \pm 1,8$). No grupo tratado com ISQ + ST a RVR foi reduzida quando comparado ao grupo Isquemia (ISQ + ST: $12,1 \pm 3,1$ versus ISQ: $26,3 \pm 4,1$; $p < 0,05$).

Tabela 2 - Parâmetros hemodinâmicos dos diversos grupos. São Paulo-2016.

Grupos	n	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FSR (ml/min)	RVR (mmHg/ml min)
SHAM	6	455 ± 60	$115 \pm 11,0$	$11,0 \pm 2,0$	$10,9 \pm 1,8$
ISQ	5	481 ± 64	$104 \pm 3,7$	$4,0 \pm 0,6^a$	$26,3 \pm 4,1^a$
ISQ + ST	8	517 ± 53	$90 \pm 16,1^a$	$7,7 \pm 1,3^b$	$12,1 \pm 3,1^b$

Sendo FC – frequência cardíaca; PAM – pressão arterial média; FSR – fluxo sanguíneo renal; RVR - resistência vascular renal; ISQ – Isquemia; ISQ + ST – Isquemia + sara tudo.

^ap <0,05 vs SHAM

^bp <0,05 vs ISQ

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão.

4.3 PERFIL OXIDATIVO

Os resultados das variáveis que determinam o perfil oxidativo encontram-se na tabela 03.

Quanto aos peróxidos urinários, PU, o grupo que demonstrou valores de referência de normalidade nesse parâmetro foi o SHAM ($5,6 \pm 0,4$). Os PUs no grupo ISQ demonstraram aumento significativo quando comparados ao grupo SHAM (ISQ: $13,6 \pm 0,6$ versus SHAM: $5,6 \pm 0,4$; $p < 0,05$), enquanto que o grupo ISQ + ST apresentou valores reduzidos em relação ao grupo ISQ (ISQ + ST: $4,3 \pm 2,7$ versus ISQ: $13,6 \pm 0,6$; $p < 0,001$).

Quanto às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na urina (TBARS urinário), observou-se que o grupo SHAM apresentou resultados considerados referência de normalidade nesse parâmetro ($56,7 \pm 7,2$).

Os TBARS no grupo ISQ apresentaram aumento estatisticamente significativos quando comparados aos do grupo SHAM (ISQ: $113,7 \pm 15,6$ versus SHAM: $56,7 \pm 7,2$; $p < 0,05$), enquanto que o grupo ISQ + ST apresentou valores reduzidos em relação ao grupo ISQ (ISQ + ST: $62 \pm 20,0$ versus ISQ: $113,7 \pm 15,6$; $p < 0,05$).

A mensuração de óxido nítrico (NO) mostrou que o grupo SHAM apresentou valores considerados padrão de normalidade ($30,2 \pm 2,2$). O grupo Isquemia demonstrou elevação dos níveis de NO urinário quando comparado com o grupo SHAM (ISQ: $76,6 \pm 6,6$ versus SHAM: $30,2 \pm 2,2$; $p < 0,001$).

O grupo ISQ + ST mostrou redução da liberação de NO quando comparado com grupo Isquemia (ISQ + ST: $13,2 \pm 15,0$ vs ISQ: $76,6 \pm 6,6$; $p < 0,001$). Esse grupo tratado também mostrou diferença estatisticamente significativa na quantidade de NO quando comparado ao grupo SHAM (ISQ + ST: $13,2 \pm 15,0$ vs SHAM: $30,2 \pm 2,2$; $p < 0,001$).

Os resultados dos tióis no tecido renal confirmam valores de referência no grupo SHAM ($46,1 \pm 6,0$).

O grupo submetido à Isquemia apresentou valores reduzidos na concentração de tióis no tecido renal em relação ao grupo SHAM (ISQ: $19,9 \pm 0,9$ versus SHAM: $46,1 \pm 6,0$ $< 0,05$). Os animais do grupo ISQ + ST apresentaram tióis aumentados quando comparados ao grupo ISQ e ao grupo SHAM. (ISQ + ST: $31,0 \pm 5,9$ versus ISQ: $19,9 \pm 0,9$ versus SHAM: $46,1 \pm 6,0$; $p < 0,05$).

Tabela 3- Resultado do perfil oxidativo, avaliados pelos parâmetros peróxidos urinários, TBARS, óxido nítrico e tióis. São Paulo, 2016.

Grupos	n	Peróxidos urinários (nmol/ g de creatinina urinária)	TBARS Urinário (nmol/ g de creatinina urinária)	Óxido nítrico (μ mol/g de creatinina urinária)	Tióis no tecido renal (nmol/ mg de proteína)
SHAM	7	$5,6 \pm 0,4$	$56,7 \pm 7,2$	$30,2 \pm 2,2$	$46,1 \pm 6,0$
ISQ	6	$13,6 \pm 0,6$ a	$113,7 \pm 15,6$ a	$76,6 \pm 6,6$ c	$19,9 \pm 0,9$ a
ISQ + ST	8	$4,3 \pm 2,7$ d	$62,0 \pm 20,0$ b	$13,2 \pm 15,0$ cd	$31,0 \pm 5,9$ ab

Sendo ISQ – Isquemia; ISQ + ST – Isquemia + sara tudo.

a $p < 0,05$ vs SHAM

b $p < 0,05$ vs Isquemia

c $p < 0,001$ vs SHAM

d $p < 0,001$ vs Isquemia

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL

Foi realizada a análise de lesão tubulointersticial através da Escala de Shih, com os graus de lesão de 0 a 4. A tabela 4 apresenta o grau de lesão tubulointersticial de todos os grupos, conforme a escala citada anteriormente, tendo o grupo SHAM como referência de normalidade ($0,2 \pm 0,1$).

Nesta variável o tecido renal do grupo ISQ apresentou lesão, comparado com grupo SHAM. (ISQ: $2,5 \pm 0,2$ versus SHAM: $0,2 \pm 0,1$; $p < 0,001$). O tratamento com sara tudo induziu redução estatisticamente significativa comparado ao grupo ISQ. (ISQ + ST: $0,7 \pm 0,4$ versus ISQ: $2,5 \pm 0,2$; $p < 0,001$).

Tabela 4 – Alterações tubulointersticial no tecido renal. São Paulo-2016.

Grupos	n	Quantificação da alteração tubulointersticial
SHAM	7	$0,2 \pm 0,1$
ISQ	6	$2,5 \pm 0,2^a$
ISQ + ST	8	$0,7 \pm 0,4^{ab}$

Sendo ISQ – Isquemia; ISQ + ST – Isquemia + sara tudo.

^a $p < 0,01$ vs SHAM

^b $p < 0,001$ vs ISQ

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão.

A Figura 04 representa as alterações tubulointersticiais segundo a escala de Shih dos grupos: SHAM (A), Isquemia (B) e Isquemia + sara tudo (C). O grupo SHAM (A) não demonstrou alterações tubulointersticiais. Entretanto, o grupo ISQ (B) demonstrou: edema, infiltrado inflamatório difuso do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação da luz tubular, áreas focais de desnudamento da membrana basal e necrose tubular. O grupo ISQ + ST (C) mostrou diminuição dos infiltrados inflamatórios difusos, edema, achatamento celular, porém não demonstrou área de necrose.

Figura 04: Cortes histológicos para análise da área tubulointersticial (aumento de 200X) dos grupos: SHAM (A), ISQ (B) e ISQ + ST(C).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O reconhecimento da medicina tradicional como integrante no Sistema Único de Saúde permite que o desenvolvimento de fitomedicamentos apresente-se como alternativa de tratamento, com perspectivas positivas no mercado nacional e internacional. ^(56,57) No entanto, apesar da extensa diversidade de plantas medicinais na flora brasileira, não há notícias de protocolos de intervenções farmacológicas dessa natureza incorporados à clínica, mostrando a escassez de condutas preventivas com fitoterápicos para IRA I/R. Esse estudo avaliou o efeito da *Justicia acuminatissima*, planta medicinal do Amazonas popularmente conhecida como “sara tudo”, em ratos submetidos ao modelo IRA I/R. Os resultados confirmaram o efeito renoprotetor desse fitomedicamento no modelo experimental instituído.

A IRA é caracterizada por aumento da creatinina sérica, redução no *clearance* de creatinina e/ou redução na produção de urina. Na clínica, o declínio da função, os distúrbios hemodinâmicos, o processo inflamatório e o estresse oxidativo desencadeados pela isquemia e reperfusão são descritos como os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a IRA. ⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾ De fisiopatologia complexa, a IRA continua a ser um desafio para pesquisadores no sentido de se identificar com precisão o momento crítico para a tomada de decisão clínica e a adoção de intervenções preventivas.

Neste contexto, estudos de bancada são providentes para responder a essa demanda científica e clínica, pois buscam transpor alternativas terapêuticas inovadoras frente à epidemiologia desfavorável da IRA isquêmica.

Esta pesquisa avaliou a função renal global por meio do *clearance* de creatinina em modelo de IRA isquêmica em ratos saudáveis adultos. Os seus resultados confirmaram que a hipoperfusão transitória de 30 minutos, por meio do clampeamento dos pedículos renais, desencadeia resposta de redução do *clearance* de creatinina com intensificação do mecanismo redox, além de determinar o comprometimento do parênquima renal. Apesar da redução do *clearance*, o modelo de isquemia implementado induziu aumento do fluxo urinário, que pode estar associado ao defeito de reabsorção tubular pós-isquêmico. ⁽¹⁸⁾

A lesão de isquemia reperfusão implica, em primeiro momento, vasoconstricção severa que favorece a hipóxia, principalmente do córtex renal. Num segundo momento, a manutenção da hipóxia resulta em comprometimento da integridade celular. O *clearance* de creatinina é um marcador dinâmico que reflete a taxa de filtração glomerular. Logo, em modelos de isquemia reperfusão, a atividade das células tubulares está comprometida, resultando na diminuição da taxa de filtração glomerular TGF. Watanabe et al demonstraram severa redução do *clearance* de creatinina em animais submetidos à isquemia de 30 minutos ⁽²⁹⁾. O modelo experimental de IRA isquêmica reproduz com minúcia o que ocorre na condição pós-transplante renal na clínica, cuja prevalência é de 20-35% e está associada a um declínio na taxa de filtração glomerular ⁽⁶⁰⁾.

Por outro lado, neste estudo, os animais isquêmicos tratados com “sara tudo” demonstraram melhora da função renal, evidenciada pelo aumento no *clearance* de creatinina. A função renal melhorada provavelmente associa-se às propriedades anti-inflamatórias da *Justicia acuminatissima*, comprovadas em outros estudos.

Correa et al estudaram a composição química do extrato aquoso da *Justicia acuminatissima*, no qual foi investigada a presença de doze substâncias (friedelina, ácido gálico, 1,8-hydroxiquinone, lupeol, rutina, estigmasterol, quercetina, ácido cumarico -p, kaempferol, naringenina, escopoletina e umbeliferona). Outro estudo que utilizou experimento com ratos, induzindo edema por meio de contusão, mostrou que o composto químico estigmasterol glicosilada e glicosilada beta-sitosterol, encontrado na *Justicia acuminatissima*, agiu como anti-inflamatório, evidenciado pela redução do edema na pata do animal. ^(34, 36)

Outros estudos, que utilizaram intervenções com plantas medicinais em animais com IRA, apresentaram resultados de melhora na função renal, o que corrobora os resultados deste estudo realizado com o “sara tudo”. Em modelo de IRA isquêmica de 30 minutos, observou-se elevação da creatinina sérica, aumento da excreção da fração de sódio, redução da creatinina urinária, com consequente declínio do *clearance* de creatinina. Os animais tratados com os fitoterápicos *Tribulus terrestris*, *Rosa Canina* e *Osthole* demonstraram diminuição da ureia e creatinina plasmática e aumento no *clearance* de creatinina. ⁽⁶¹⁻⁶³⁾

O efeito de melhora no equilíbrio de água, excreção urinária de sódio e osmolalidade urinária também se confirmou em estudos que se utilizaram do tratamento com *Glycyrrhizin* e *Rehmannia glutinosa* em modelo de IRA I/R em ratos. (64,65)

Complementando os dados apresentados acima, este estudo avaliou também a hemodinâmica renal nos animais, demonstrada na elevação da resistência renal total e consequente redução do fluxo sanguíneo renal. Sabe-se que na IRA isquêmica ocorre redução na taxa de filtração glomerular, que é resultado de deficiência subjacente na regulação hemodinâmica, também conhecida como nefropatia “vasomotora”, caracterizada por um aumento sustentado na resistência vascular renal. Respostas hemodinâmicas renais foram estudadas em modelos animais na lesão por isquemia-reperfusão renal. Observou-se que, após a retirada da oclusão das artérias renais, o fluxo sanguíneo renal total é restaurado aos níveis basais dentro de minutos, seguido por um declínio subsequente que se mantém por várias horas após o insulto. O aumento da resistência é interpretado como uma resposta vascular a eventos celulares provocados pela isquemia inicial e corresponde à ativação de compostos vasoativos, espécies reativas de oxigênio e/ou vias inflamatórias que podem afetar a perfusão. (17)

A injúria isquêmica lesiona a barreira do endotélio, comprometendo a sua integridade, devido à interferência na adesão celular e aumento na pressão intratubular. Há que se considerar ainda o desequilíbrio entre os agentes vasodilatadores e vasoconstrictores, proporcionando aumento na vasoconstricção, com elevação da resistência renal total e consequente redução do fluxo sanguíneo renal, além da diminuição do coeficiente de ultrafiltração. (13,17, 19)

Curiosamente o tratamento com *Justicia acuminatissima* induziu redução na pressão arterial sistêmica nos ratos isquêmicos, no entanto não se observou impacto na hemodinâmica renal. A melhora nos parâmetros hemodinâmicos é sugestiva e corrobora a melhora no ritmo de filtração glomerular e diminuição na RVR, que estão interligados.

Pesquisa que utilizou *Dioclea violácea* em ratos com IRA I/R demonstrou melhora nos parâmetros hemodinâmicos no grupo tratado, com diminuição da resistência vascular renal. (66)

No estudo ora apresentado, avaliou-se ainda o efeito do “sara tudo” no perfil oxidativo dos animais submetidos à IRA I/R. Os resultados mostraram aumento dos peróxidos urinários, TBARS e óxido nítrico, bem como redução nos tióis no tecido renal. Está descrito na isquemia tecidual o ocorrido de uma série de processos metabólicos e enzimáticos, entre eles o estresse oxidativo. Com as reservas de ATP em depleção, grande quantidade de espécies reativas de oxigênio é gerada, ocasionando o estresse oxidativo, que consiste no desequilíbrio dos agentes antioxidantes (glutathione reduzida – GSH-Rd, superóxido dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GSH) e produção de oxidantes (Radicais livres- $\text{OH}^\cdot$, peróxido de hidrogênio- H_2O_2 , superóxido - $\text{O}_2^\cdot$, peroxinitrito - $\text{ONOO}^\cdot$). ⁽⁶⁷⁾

A isquemia induz redução da fosforilação oxidativa e dos níveis de ATP, levando ao aumento do cálcio, H_2O e Na^+ e diminuição do K^+ citosólico, ocasionando tumefação celular, perda de microvilosidades, perda de fosfolípidios, alterações do citoesqueleto, radicais livres, degradação lipídica, proteases, lesão na membrana e morte celular. Contudo, o dano tecidual se exacerba com a reperfusão, pois a reoxigenação ocasiona um aumento na formação de mais EROs, peroxidação lipídica, lesões de células endoteliais, permeabilidade vascular aumentada, ativando as células de defesas e sistema complemento. ⁽⁶⁸⁾

Os sistemas enzimáticos (SOD, GSH-Rd, GSH) e não enzimáticos que contribuem para o bloqueio ou inativação dos radicais livres entram em desequilíbrio com os níveis de EROs gerados na I/R e tornam-se insuficientes para combater a oxidação. A SOD corresponde a uma família de enzimas com diversos grupos prostéticos em sua composição e possui ação antioxidante, uma vez que catalisa o peróxido de hidrogênio, enquanto a GSH-Px também possui ação antioxidante, catalisando o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos. ⁽²⁵⁾

Experimento animal utilizando modelo isquemia I/R 30 e 45 minutos apresentou dados semelhantes de lesão oxidativa, caracterizada pelo aumento dos níveis de peróxidos urinários, óxido nítrico, TBARS e a diminuição nos níveis de tióis no tecido renal. Naquele estudo, a isquemia de 45 minutos foi mais agressiva e determinou resposta oxidativa mais severa. ⁽⁶⁹⁾

Nesse estudo, o tratamento com “sara tudo” desencadeou melhora nos parâmetros de oxidação, com diminuição dos peróxidos urinários, óxido nítrico e

TBARS urinários, somada ao aumento dos níveis de tióis no tecido renal. O “sara tudo” confirmou seu efeito antioxidante, equivalente a outros estudos.

Estudos comprovam que a *Justicia acuminatissima* possui um composto químico denominado tanino condensado, que, ao reduzir a quantidade de NO em ratos, mostrou ser um bom potencial antioxidante. ⁽³⁶⁾

O *Silymarin*, um extrato composto polifenólico de sementes e frutas do *Silybum marianum* e *Cynara cardunculus* (fitoterápico da Turquia), utilizado em pesquisa de base em ratos submetidos à IRA I/R, agiu como antioxidante no tecido renal, demonstrado pela diminuição do MDA e NO, somado ao aumento das enzimas glutathione peroxidase (GSH- Px) e superóxido-dismutase (SOD), comparado ao grupo isquemia. ⁽⁷⁰⁾

O uso da *Isoflavona* e *Uncaria tomentosa* em ratos com isquemia reperfusão renal mostrou ação antioxidante caracterizada por diminuição dos valores de peróxidos urinários, TBARS e elevação no nível dos tióis do tecido renal. ^(28,29)

Os resultados de histologia renal desse estudo confirmaram alterações tubulointersticiais, com presença de edema, infiltrado inflamatório difuso do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação da luz tubular, áreas focais de desnudamento da membrana basal e necrose tubular nos animais submetidos ao modelo IRA I/R. O condicionamento prévio com *Justicia acuminatissima* induziu diminuição nas alterações do tecido renal submetido à isquemia reperfusão, evidenciada pela redução dos infiltrados inflamatórios difusos, edema e achatamento celular. O *Tribulus terrestris*, utilizado em ratos submetidos à IRA isquêmica, mostrou diminuição da lesão no tecido renal, similar às características descritas neste referido estudo. ⁽⁶¹⁾

Esses achados se assemelham àqueles descritos em humanos que incluem apagamento e perda de borda em escova túbulo proximal, perda irregular de células tubulares, áreas focais de dilatação tubular proximal e distal tubular e áreas de regeneração celular em condições presumidas como isquêmicas. ^(71,72)

Sumariamente, este estudo mostrou que o pré-condicionamento com *Justicia acuminatissima* reduziu os efeitos deletérios ocasionados pela injúria renal aguda induzida por isquemia e reperfusão em ratos. Estes resultados foram evidenciados pela melhora na hemodinâmica renal com diminuição da resistência

vascular renal e aumento do fluxo sanguíneo renal, elevação do *clearance* de creatinina, redução dos índices de oxidação, com diminuição dos níveis de peróxido urinário, TBARS, NO e aumento dos níveis de tióis, além do impacto positivo no tecido renal dos animais. Tais achados sugerem que esse fitomedicamento pode ser um adjuvante na terapia de prevenção ou tratamento de condições de exposição do rim a eventos isquêmicos.

Diante da possibilidade de intervir para evitar ou amenizar os efeitos deletérios da isquemia e a inexistência de protocolos efetivos na prevenção da IRA I/R na clínica, destaca-se a importância de mais estudos de base para elucidar as manifestações fisiopatológicas ocorridas na isquemia e reperfusão e as possibilidades terapêuticas disponíveis na flora nacional.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

✓ O tratamento prévio com *Justicia acuminatissima* em ratos submetidos ao modelo de isquemia renal determinou atenuação da lesão, com elevação do *clearance* de creatinina, redução da resistência vascular total e aumento do fluxo sanguíneo renal.

✓ O pré-tratamento com *Justicia acuminatissima* confirmou sua atividade antioxidante ao reduzir os metabólitos oxidativos, com diminuição do TBARS, peróxidos urinários e NO, somados ao aumento de tióis.

✓ A intervenção realizada com *Justicia acuminatissima* nos animais com isquemia reperfusão renal reduziu a lesão tubulointersticial.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Sesso R, Lopes AA, Thomé FS, Lugon J, Watanabe Y, Santos DR. Diálise Crônica no Brasil - Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2012. J Bras Nefrol 2013; 34:272-7.
2. Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. J. Bras. Patol. Med. Lab 2007; 43 (5): 329-337
3. Drummond BE, Wingert RA. Insights into kidney stem cell development and regeneration using zebrafish. World Journal of Stem Cells 2016; 8 (2): 22-31.
4. Dressler GR. The cellular basis of kidney development. Annu Rev Cell Dev Biol 2006; 22: 509-529.
5. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. Compr Physiol 2012; 2 (2): 1303-1353.
6. Chertow GM, Burdiak E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality length of stay, and costs in hospitalized patients. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 3365-3370
7. Ferraz RRN, Deus RB. Incidência de insuficiência renal aguda na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de um hospital paulista. Acta Paul Enferm 2009; 22 (1): 497-500.
8. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term Risk of Mortality and Other Adverse Outcomes After Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation 2009; 53 (6): 961-973.
9. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Kidney inter Suppl 2012; 2: 1-138.

10. Hugh RB, Michael RC, Wilfred L. Acute Renal Failure. In; Barry M. Brenner, The Kidney, Philadelphia, Saunders 2004; 27: 1215-1270
11. Harty J. Prevention and management of acute kidney injury. Ulster Med J 2014; 83 (3): 149-157.
12. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. Kidney international 2002; 62: 1539-1549.
13. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. J Clin Invest 2011; 121 (11): 4210-21
14. Kher A, Wang M, Tsai BM, et al. Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia–reperfusion Injury. Cardiovascular Research 2005; 67: 594-603.
15. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. Kidney International 2004; 66 (2): 496–9.
16. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney. Kidney International. 2007; 72: 151-156.
17. Basile DP, Yoder MC. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2014; 14 (1): 3–14.
18. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? Kidney Int 2004; 66:480-485.
19. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. Microvasc Res 2009; 77 (1): 4-7.

20. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CI. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm* 2009; 12p.

21. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths – the proximal vs distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney int* 2010; 77 (1): 9-16.

22. Li L, Okusa MD. Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury. *Seminars in nephrology* 2010; 30: 268–277.

23. Wu D, Chen X, Ding R, Qiao X, Shi S, Xie Y, Hong Q, Feng Z. Ischemia/reperfusion induce renal tubule apoptosis by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and l-type Ca^{2+} channel opening. *J Am Nephrol* 2008; 28: 487-499.

24. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates Kidney ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117: 2847–2859

25. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, Sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43 (1): 61-68.

26. Jassem W, Heatan ND. The role of mitochondria in ischemic reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int* 2004; 66 (2): 514-17.

27. Rattiff BB, Rabadi MM, Vasko R, Yasuda K, Goligorsky S. Messengers without borders: mediators of systemic inflammatory response in AKI. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 529-536.

28. Vattimo MF, Silva NO. Uncaria tomentosa and acute ischemic Kidney injury in rats. *Rev Esc Enferm USP* 2011; 45 (1): 194-8

29. Watanabe M, Neiva LBM, Santos CX, Laurindo FM, Vattimo MFF. Isoflavone and the heme oxygenase system in ischemic acute kidney injury in rats. *Food Chem. Toxicol* 2007; 45: 2366–2371.
30. Evangelista SS, Sampaio FC, Parente RC, Bandeira MFCL. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. *Rev. bras. Plantas med* 2013; 15 (4): 513-519.
31. Verdam MCS, Ohana DT, Araújo MGP, Guilhon-Simplicio F, Mendonça MS, Pereira MM. Morphology and anatomy of *Justicia acuminatissima* leaves. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012. 22 (6): 1212-1218.
32. Côrrea GM. Estudo fitoquímico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae): caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e detecção de produtos radiolíticos [tese]. Minas Gerais: Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
33. Côrrea GM, Alcântara AFC. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* – a review. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012; 22: 220–238.
34. Côrrea GM, Abreu VGC, Martins DAA, Takahashi JA, Fontoura HS, Cara DC, Piló-Veloso D, Alcântara AFC. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). *Int. J. Pharm. P* 2014; 6: 75–81.
35. Côrrea GM, Abreu VGC, Silva TM, Martins DAA, Fontoura HS, Cara DC, Piló-Veloso D, Alcântara AFC. Glycosylated luteolin derivatives isolates from leaves of *Justicia acuminatissima* – structural elucidation and anti-inflammatory activity investigated by experimental and theoretical methods. *Int J Pharm Phytochem* 2014; 29: 1256–1265.
36. Verdam MCS, Guilhon-Simplicio F, Barbosa GS, Magalhães AL, Oliveira CIFB, Almeida PDO et al. Anti-inflammatory action of *Justicia acuminatissima* leaves. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2015; 25 (3): 264-268.

37. Verdam MCS, Ohana DT, Lima ES, Pereira MM, Gáspari JF. Estudo da influência de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea. *Visão Acadêmica* 2009; 10: 35–39.
38. Santos FN, Watanabe M, Vasco CF, Fonseca CD, Vattimo MFF. Antioxidant protection of statins in acute kidney injury induced by sepsis. *Rev. Esc. Enferm. USP* 2014; 48 (5): 826-826.
39. Teshima CAS, Watanabe M, Fonseca CD, Vattimo MFF. Sinvastatina e lesão renal aguda isquêmica em ratos. *Acta Paul. Enferm* 2012; 25 (1): 86-89.
40. Nascimento EL, Watanabe M, Fonseca CD, Schlottfeldt FS, Vattimo MFF. Efeito renoprotetor do *Echinodorus macrophyllus* na lesão renal induzida. *Acta Paul Enferm* 2014; 27 (1): 12-17
41. Cordeiro PM, Schlottfeldt FS, Fernandes SM, Martins DM, Fonseca CD, Watanabe M, Vattimo MF. Prevention of amphotericin B nephrotoxicity through use of phytotherapeutic medication. *Rev Esc Enferm USP* 2015; 49 (Esp): 73-78.
42. Fernandes SM, Cordeiro PM, Watanabe M, Fonseca CD, Vattimo MFF. The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Arch Endocrinol Metabol* 2015; 2-7.
43. Dórea EL, Yu L, De Castro I, Campos SB, Ori M, Vaccari EM, et al. Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8 (9): 1415-22.
44. Peres LAB, Cunha JAD, Schäfer AJ, Silva AL, Gaspar AD, Scarpari DF et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. *J. Bras. Nefrol* 2013; 35 (3): 229-236
45. Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydrogen peroxide assay with the ferric-xyleneol orange complex. *Anal Biochem* 1999; 273 (2): 149-155.

46. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol Orange for measurement of hydroperoxides. *Meth enzymol* 1994; 233: 182-9.

47. Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262 (3): 605-609.

48. Benerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta* 2003; 334 (1/2): 205-9.

49. Halliwell B. Long LH, Yee TP, Lim S, Kelly R. Establishing biomarkers of oxidative stress: the measurement of hydrogen peroxide in human urine. *Curr Med Chem* 2004; 11(9): 1085-92.

50. Shimizu MHM, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Libório AB, Sanches TRC, et al. N-acetylcysteine protects against renal Injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23 (10): 3067-73.

51. Walker PD, Shan SV. Reactive oxygen metabolites in endotoxin induced acute renal failure in rates. *Kidney Int* 1990; 38: 1125-32.

52. Akerboom TPM, Sies H. Assay glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77: 373-82.

53. Read SM, Northcote DH. Minimization of the response to different protein of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* 1981; 116 (1): 53-64.

54. Shi W, Hines W, Neilson EG. Effects of cyclosporine A development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int* 1988; 33 (6): 1113-8.

55. Francescato HDC, Costa RC, Silva CGA, Coimbra TM. Treatment p38 MAPK inhibition attenuates cisplatin nephrotoxicity starting after beginning of renal damage. *Life Sci* 2009; 84 (17-18): 590-7.
56. Macedo EV, Gemal AL. A produção de fitomedicamentos e a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Ver Bras Farm* 2009; 90 (4): 290 – 297.
57. Brasil. Decreto no 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 23 jun. 2006.
58. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia – reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-266.
59. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras* 2002; 17 (6): 417-423
60. Orban JC, Quintard H, Cassuto E, Jambou P, Samat-Long C, Ichai C. Effect of N-Acetylcysteine Pretreatment of Deceased Organ Donors on Renal Allograft Function: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation*. 2015; 99 (4): 746-753.
61. Najafi H, Firouzifar M, Shafaat O, Changizi AS, Hosseini N. Protective effects of *Tribulus terrestris* L extract against acute Kidney Injury induced by reperfusion Injury in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases* 2014; 8: 292-8.
62. Changizi AS, Najafi H, Jalalvandi S, Hosseini N. Protective effects of *Rosa canina* L fruit extract on renal disturbances induced by reperfusion Injury in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases* 2013; 7: 290-8.
63. Zheng Y, Lu M, Ma L, Zhang S, Qiu M, Wang Y. Osthole ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 2013; 183 (1): 347-54.

-
64. Lee HS et al. *Rehmannia glutinosa* Ameliorates Renal Function in the Ischemia Reperfusion-Induced Acute Renal Failure Rats. *Biol. Pharm. Bull* 2005; 28 (9): 1662—1667.
65. Lee HS et al. *Glycyrrhizin* Ameliorates Renal Function Defects in the Early-phase of Ischemia-induced Acute Renal Failure. *Phytother. Res* 2003; 17: 947–951.
66. Freitas FPS, et al. *Dioclea violacea* lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in an experimental model of acute kidney injury. *Am J Transl Res* 2015; 7 (12): 2573-2588.
67. Percário S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. *Rev. Nutr.* 2010; 23 (2): 259-267.
68. Ferrari RS, Andrade CF, Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 1-14.
69. Watanabe M. Intervenção farmacológica na lesão renal aguda isquêmica em ratos: resposta funcional e histológica tempo dependente. [tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2010.
70. Turgut F, et al. Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. *Int Urol Nephrol* 2008; 40: 453–460.
71. Racusen LC: The morphologic basis of acute renal failure. In: *Acute Renal Failure*, edited by Molitoris BA, Finn WF, Philadelphia, W.B. Saunders, 2001; 1–12.
72. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J AM Soc Nephrol*. 2006; 17(6): 1503-20.

Anexo

ANEXO

Anexo A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTO ANIMAL

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito da Justícia acuminatíssima na injúria renal aguda isquêmica: estudo experimental” protocolo nº 126/15 sob a responsabilidade de Maria de Fátima Fernandes Vattimo e Priscilla Mendes Cordeiro, apresentado pelo Departamento de Enfermagem Médico Cirúrgica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 23.09.2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/2016
Espécie/linhagem	Rato Wistar
Nº de animais	28
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério ICE

CEUA-FMUSP, 23 de Setembro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br