

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem

**Efeito protetor do fitomedicamento *Vitis Vinifera L* na lesão
renal aguda induzida pelo Tacrolimus**

Wanessa Teixeira Silva

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem

**Efeito protetor do fitomedicamento *Vitis Vinifera L* na lesão renal aguda
induzida pelo Tacrolimus**

Wanessa Teixeira Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Enfermagem na saúde do adulto,
PROESA, para obtenção do título de
mestre.

Linha de pesquisa: Tecnologia na
saúde do adulto

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

São Paulo
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU 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

Silva, Wanessa Teixeira

Efeito protetor do fitomedicamento *Vitis Vinifera L* na lesão renal aguda induzida pelo Tacrolimus. / Wanessa Teixeira Silva. – São Paulo; 2010.

51p.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

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

1. Enfermagem 2. Lesão renal aguda 3. Nefrotoxicidade 4.

Antioxidantes I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, que, com amor e companheirismo, me ajudou a transpor todos os obstáculos da vida e me deu apoio e incentivo em todas as empreitadas.

Ao meu esposo, André, pelo amor, confiança, compreensão, apoio e auxílio não apenas para realização deste trabalho, mas em todos os momentos difíceis de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Maria de Fátima Fernandes Vattimo pelo aprendizado, confiança, apoio constante, paciência e dedicação. Obrigada pela oportunidade.

Ao estatístico, Ricardo Luís Barbosa pela fundamental contribuição na análise estatística dos dados deste trabalho.

Ao biomédico Dr Rildo A. Volpini, pelos préstimos no estudo histopatológico.

Ao Dr Luiz Estevam Ianhez, pela doação do Tacrolimus, sem o qual esse estudo não seria possível.

À amiga, funcionária do LEMA, Neusa da Silva Oliveira, pela contribuição e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas do LEMA, Mirian, Cassiane, Luciana, Carolina, Natalha e Juliana pela amizade e auxílio nas dificuldades.

À gerente da UBS Jd. Fanganiello, Rosangela Leitão, pela compreensão.

Aos meus padrinhos, Walter e Walquíria, pelo amor de pais.

Aos meus avós, pelo carinho a mim dedicado.

Aos meus irmãos, Antonio Carlos e Leandro, pelo amor, união e incentivo.

Ao meu pai, Antonio Tadeu, pelo amor incondicional.

A minha família, pelo carinho e apoio.

Agradeço principalmente a DEUS por ter colocado em minha vida pessoas tão maravilhosas e especiais sem as quais não chegaria onde estou.

EPÍGRAFE

"A Enfermagem é uma arte; e para realizá-la como arte, requer uma devoção tão exclusiva, um preparo tão rigoroso, quanto a obra de qualquer pintor ou escultor; pois o que é tratar da tela morta ou do frio mármore comparado ao tratar do corpo vivo, o templo do espírito de Deus? É uma das artes; poder-se-ia dizer, a mais bela das artes!"
(*Florence Nightingale*)

Silva WT. **Efeito protetor do fitoterápico *Vitis Vinifera L* na lesão renal aguda induzida pelo Tacrolimus.** [dissertação] São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2010.

RESUMO

As lesões renais agudas (LRAs) nefrotóxicas correspondem a 30% dos casos de LRA. A nefrotoxicidade é efeito indesejável de diversos fármacos de uso rotineiro na clínica, entre eles as drogas imunossupressoras. A nefrotoxicidade do Tacrolimus (Fk 506) é uma das causas de LRA após o transplante renal. Com a ampla utilização do Fk 506 nas terapias imunossupressoras e devido ao seu potencial nefrotóxico que pode levar à perda do enxerto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito renoprotetor do extrato de *Vitis vinifera L*, um fitomedicamento com efeito antiinflamatório e antioxidante, na nefrotoxicidade induzida pelo Tacrolimus em ratos. Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 250 – 300g, todos tratados 1x/dia por 5 dias, conforme os seguintes grupos: Salina (grupo controle) (NaCl 0,9%, 0,1ml por gavagem); Vitis (*Vitis vinifera L* 3mg/kg por gavagem), Fk (Tacrolimus 0,5mg/kg por gavagem) e Fk+Vitis (Tacrolimus 0,5mg/kg + 3mg/kg por gavagem). Foram avaliados a função renal (FR) (clearance de creatinina, método Jaffé); os peróxidos urinários (PU) (FOX-2), o malondealdeído (MDA-TBARS) e a histologia renal. Os dados desse estudo confirmaram a lesão nefrotóxica de caráter oxidativo induzida pelo Tacrolimus. A *Vitis vinifera L* demonstrou efeito renoprotetor significativo, com melhora na FR, redução dos níveis de peroxidação lipídica e proteção histológica. Esse estudo confirmou a renoproteção da *Vitis vinifera L* na LRA induzida pelo Tacrolimus.

Palavras-chave: lesão renal aguda. Nefrotoxicidade. Antioxidantes. Tacrolimus. *Vitis vinifera L*.

Silva WT. **Protective effect of the phytomedicine *Vitis Vinifera L* in acute kidney injury by Tacrolimus.** [dissertação] São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2010.

ABSTRACT

The nephrotoxic injury corresponds to 30% of the acute kidney injury (AKI) cases. Nephrotoxicity is an undesirable effect of several drugs used in the clinic, among them, the immunosuppressors drugs. The Tacrolimus (FK 506) nephrotoxicity is the main cause of AKI after kidney transplantation. Being Fk 506 widely used in the immunosuppressive therapies and due to its nephrotoxic effect that can lead to the loss of graft, the aim of this study was evaluate the renoprotective action of *Vitis Vinifera L* extract , a phytomedicine with antioxidant and antiinflammatory effects in the nephrotoxicity induced by FK 506 in rats. Wistar rats, male, adults, weight ranging from 250-300g were used, all treated once/day for 5 days, as the following groups: Saline (control group) (NaCl 0.9%, 0,1ml per gavage), *Vitis* (*Vitis vinifera L*, 3mg/Kg per gavage), FK (Tacrolimus 0.5mg/Kg per gavage) and FK+*Vitis* (Tacrolimus 0.5mg/Kg per gavage + *Vitis vinifera L*, 3mg/Kg per gavage). Renal Function (RF) (creatinine clearance, Jaffé method), urinary peroxides (FOX-2), malondialdehyde (MDA-TBARS) and the kidney histological were evaluated. The data of this study confirmed the oxidative kidney injury by Tacrolimus. The *Vitis vinifera L* showed significant renoprotective effect, with improvement in the RF, a reduction in lipid peroxidation and histological protection. This study confirmed the renoprotective effect of *Vitis Vinifera* in the AKI by Tacrolimus.

Keywords: acute kidney injury. Nephrotoxicity. Antioxidants. Tacrolimus. *Vitis vinifera L*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de espera para transplante (ativos e semi-ativos). São Paulo, 2009	12
Tabela 2 - Parâmetros globais da função renal e fluxo urinário dos grupos: Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis. São Paulo, 2010	30
Tabela 3 - Resultados referentes aos valores de peróxidos urinários dos grupos: Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis. São Paulo, 2010	32
Tabela 4 - Resultados referentes aos valores de TBARS urinários dos grupos: Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis. São Paulo, 2010	33
Tabela 5 - Resultados referentes aos valores do escore de Shih realizado no tecido renal, nos grupos: Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis. São Paulo, 2010	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Evolução do número de transplantes no Brasil de 1999 a 2009 11
- Figura 2** - Diagrama do critério de RIFLE, incluindo as modificações recomendadas por AKIN 16
- Figura 3** - Cortes histológicos dos rins de ratos corados com hematoxilina-eosina. A - grupo Vitis, B - grupo Fk, C - grupo Salina e D - grupo Fk+Vitis 35

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	absorbância
ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
AZA	azatioprina
CAPD	diálise peritoneal ambulatorial contínua
Clcr	clearance de creatinina
CsA	ciclosporina A
DRC	doença renal crônica
ECA	enzima conversora de angiotensina
EROs	espécies reativas de oxigênio
ET	endotelina
Fk 506	tacrolimus
FOX	método xilenol laranja versão
FOX – 2	método xilenol laranja versão 2
FR	função renal
HD	hemodiálise
HDL	lipoproteína de alta densidade
i.p.	intraperitoneal
K_f	coeficiente de ultrafiltração
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LRA	lesão renal aguda
MDA	malondealdeído
MMF	micofenolato mofetil
NTA	necrose tubular aguda
OPCs	proantocianidinas oligoméricas
TBARS	substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

Resumo	05
Abstract	05
Lista de tabelas	07
Lista de figuras	08
Lista de abreviaturas	09
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Materiais	24
3.1.1 Animais	24
3.1.2 Grupos experimentais	24
3.2 Métodos	25
3.2.1 Método de Jaffé (Clearance de creatinina)	25
3.2.2 Método FOX-2 para peróxidos urinários	26
3.2.3 Método TBARS	27
3.2.4 Análise histológica	28
3.3 Local	28
3.4 Análise Estatística	28
4. RESULTADOS	31
4.1 Função Renal	31
4.2 Perfil oxidativo	33
4.2.1 Peróxidos urinários	33
4.2.2 TBARS urinários	33
4.3 Análise histológica	35
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	46

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), nos últimos anos, o número de transplante de órgãos cresceu significativamente, como podemos observar na figura abaixo.

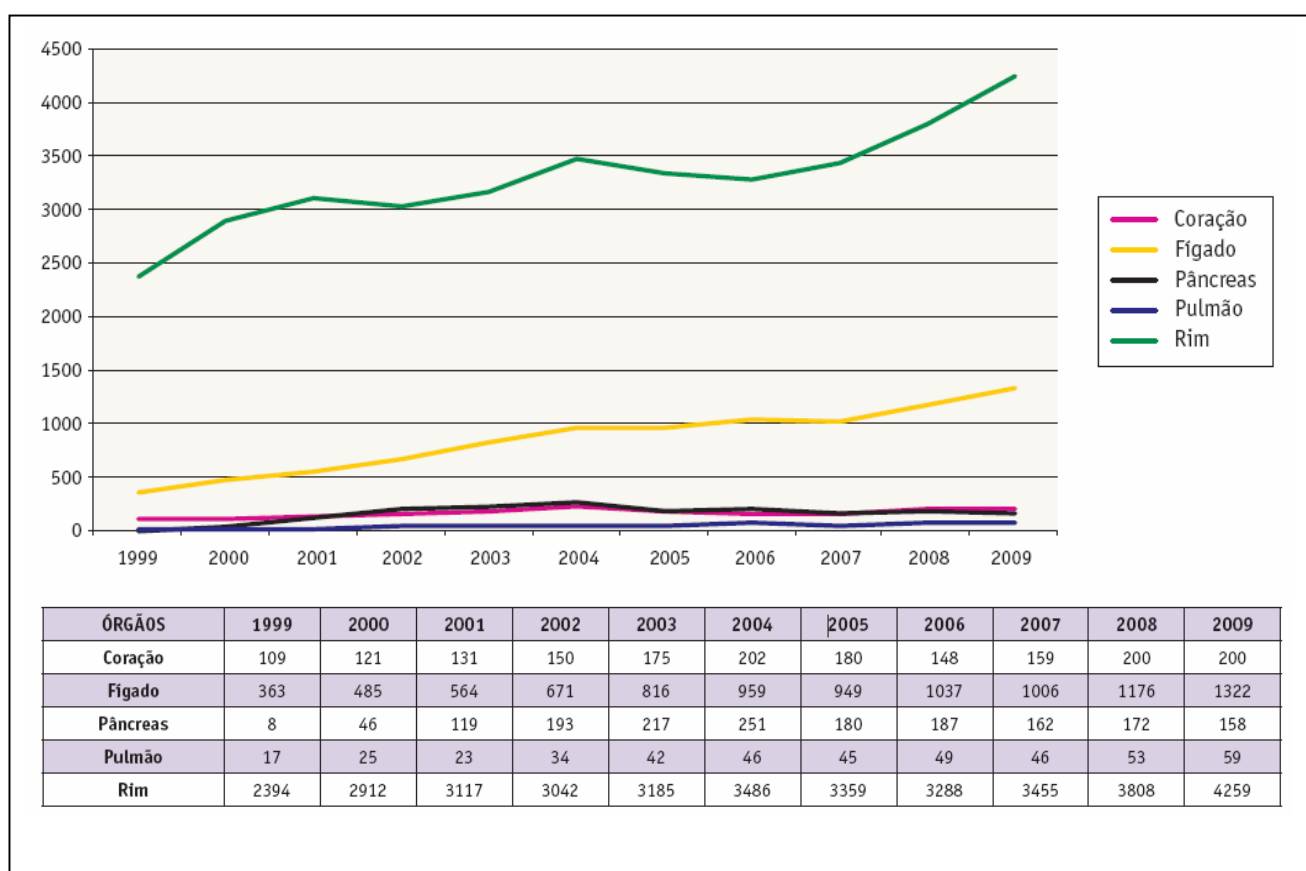


Figura 1: Evolução do número de transplantes no Brasil de 1999 a 2009. (Fonte: http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXV_n4/index.aspx?idCategoria=2)

As metas propostas para 2009 ultrapassaram as expectativas. O objetivo era atingir 4000, contudo foram realizados 4259 transplantes renais, sendo esses os melhores resultados já obtidos no país ⁽¹⁾.

O transplante renal (TR) é a melhor alternativa de tratamento para a insuficiência renal crônica em termos de qualidade de vida e custo-efetividade. Estudos que compararam os custos e a qualidade de vida entre pacientes submetidos à hemodiálise (HD), diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD) e transplante renal demonstraram que o último representa a escolha mais econômica e que proporciona melhor sobrevida.^(2,3) Um desses estudos utilizou o QALY (Quality Adjusted Life Year), ano de vida ajustado por qualidade, medido pelo índice de Rosser, para avaliar a efetividade de cada modalidade. Esse método considerou mais efetivo o tratamento que proporcionou melhor sobrevida em 1 e 3 anos. O resultado foi: HD 0,864; CAPD 0,879 e TR 0,978; o que demonstrou que os pacientes submetidos ao TR possuem melhor sobrevida⁽²⁾. Quanto ao custo, observou-se que nos primeiros seis meses de tratamento foram gastos U\$32,566; U\$25,504 e U\$38,265 e nos seis meses seguintes passaram a ser U\$26,272; U\$24,218 e U\$7,420 com HD, CAPD e TR, respectivamente. Sendo que o custo com o TR foi declinando anualmente⁽³⁾.

Apesar do aumento do número de transplantes e desse se caracterizar como melhor tratamento aos pacientes com DRC, ainda é grande o número de pacientes na fila de espera por um órgão, como demonstrado a seguir:

Tabela 1 - Lista de espera para transplante (ativos e semi-ativos), São Paulo - 2009

	Coração	Córnea	Fígado	Pâncreas	Pulmão	Rim	Rim/Pâncreas
Espírito Santo	3	474	44	-	-	1035	-
Minas Gerais	32	3.094	202	12	6	2.539	18
Rio de Janeiro	11	3.321	782	3	3	3.672	25
São Paulo	89	151	1.651	76	89	10.283	406
Brasil	305	23.756	4.304	124	161	34.640	576

Fonte: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Lista_de_Espera_2009.pdf

O aumento do número de pacientes transplantados e a quantidade de pacientes na fila de espera têm elevado ainda mais o interesse por terapias imunossupressoras com melhores resultados e menores efeitos indesejáveis, uma vez que, como comentado anteriormente, o transplante renal, à semelhança da terapia dialítica é um tratamento em que o paciente necessitará se submeter ao uso de medicamentos imunossupressores por toda a vida.

Os medicamentos imunossupressores mais freqüentemente utilizados no transplante renal são a Ciclosporina (CsA) ou o Tacrolimus (Fk 506); a Azatioprina (AZA) ou o Micofenolato Mofetil (MMF) e a Prednisona ⁽⁴⁾. Devido sua eficácia e eficiência, o Tacrolimus foi, em 2003, o inibidor do calcineurina mais utilizado nos transplantes no Estados Unidos da América, sendo prescrito em 67% dos transplantes renais, 89% dos de fígado, 81% dos de rim/pâncreas, 77% dos de pâncreas, 65% dos de pulmão, 48% dos de coração/pulmão e 42% dos de coração⁽⁵⁾.

O Tacrolimus é um antibiótico macrolídico. Seu efeito imunossupressor ocorre por meio da inibição da calcineurina impedindo a ativação das células Th e a produção de interleucinas (IL-2, IL-3, IL-4), gama-interferon, fator de necrose tumoral alfa e fatores estimuladores de colônias de macrófagos e granulócitos^(6, 7).

O Fk 506 surgiu como uma alternativa para o uso da Ciclosporina A, já que, *in vitro*, demonstrou ser aproximadamente 100 vezes melhor que a CsA⁽⁷⁾. Comparando-se as duas drogas, o Fk 506 demonstrou menor taxa de rejeição aguda e crônica, melhor função renal em longo prazo no pós-transplante e menores índices de hiperlipidemia e hipertensão ⁽⁵⁾.

Os principais efeitos indesejáveis do Tacrolimus são: tremores, diarreia, constipação, dor de cabeça, dor abdominal, hipertensão, náuseas, decréscimo da função renal e aumento da creatinina, ou seja, a nefrotoxicidade. Desses, o último é o mais significativo, considerando que o transplante visa à reapropriação da função da renal perdida por causas clínicas diversas.

A nefrotoxicidade do Fk 506 é uma das causas da lesão renal aguda após o transplante renal ⁽⁸⁾. Os mecanismos dessa nefrotoxicidade ainda não foram totalmente compreendidos, porém parecem estar associados ao aumento da produção de radicais livres de oxigênio ⁽⁹⁾.

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) resulta em um desequilíbrio redox, ou seja, desbalanço entre oxidantes e antioxidantes endógenos. Este desequilíbrio, denominado stress oxidativo, é um processo deletério que desencadeia oxidação de proteínas celulares, peroxidação lipídica e lesão aos ácidos nucléicos, levam ao dano celular funcional e necrose; comprometem a regeneração tecidual; a ação de fatores de crescimento e de proliferação celular; a regulação de alguns sistemas como o vascular e homeostático e os processos imunológicos e inflamatórios ^(10,11).

As EROs são produzidas fisiologicamente em pequenas quantidades, pois são essenciais ao controle de algumas funções, tais como a regulação da produção de óxido nítrico (NO), o tônus vascular e a resposta imune; também estão envolvidas no processo de apoptose celular (morte celular programada); entre outros ⁽¹⁰⁾.

As principais EROs produzidas são o radical superóxido (O₂⁻), o radical hidroxila (OH⁻) e o não radical peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para que a homeostase celular seja mantida, algumas enzimas antioxidantes têm papel fundamental, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), que degrada o radical superóxido e a catalase e a glutatona redutase, que eliminarão o peróxido de hidrogênio ^(12,13).

Há uma série de mecanismos citados relacionados à nefrotoxicidade do Fk 506, entre eles destacam-se defeitos isolados da função tubular, infiltração leucocitária intersticial e vasoconstrição glomerular. Eventualmente, dependendo da dose e tempo de terapia, a lesão renal aguda (LRA) pode determinar a evolução para doença renal crônica, com perda do enxerto ⁽¹⁴⁾.

A lesão renal aguda é uma síndrome que já levou mais de 25 nomes e 35 definições. Após consenso internacional, tal lesão foi caracterizada pelo

rápido declínio da função renal, definida por um aumento absoluto da creatinina sérica de pelo menos 0,3mg/dl, elevação de 50% (1,5 vezes) do valor basal ou redução do fluxo urinário, documentado como oligúria ou menor que 0,5ml/kg por hora por mais de seis horas ^(15,16).

As questões clínicas relativas ao controle da LRA não se restringem à sua definição. A dificuldade em comparar resultados terapêuticos entre estudos e instituições também está associada à ausência, por meios diagnósticos usuais, de estratificação da gravidade dessa síndrome. Ou seja, até há pouco tempo, o paciente obtinha diagnóstico de LRA, caracterizado exclusivamente pela elevação da creatinina, contudo, não é era possível quantificar o grau de lesão em que se encontrava. Esse desencontro conceitual e clínico fazia com que pacientes em diferentes graus de LRA tratados da mesma maneira, sendo o inverso também verdadeiro, paciente com graus de lesão semelhantes recebiam tratamentos díspares. Além disso, não era possível prever a evolução do paciente. Nesse sentido, foi proposto e se encontra aplicado clinicamente, o sistema classificador da LRA apresentado abaixo: o RIFLE. Esse sistema gradua o estágio de lesão do paciente em “Risco, Lesão, Insuficiência, Perda e Estágio final de doença renal”. Há que se ressaltar que o RIFLE abriga duas categorias de disfunção crônica e por esse motivo foi substituído por outro classificador, o AKIN, que conta apenas com os três primeiros estágios.

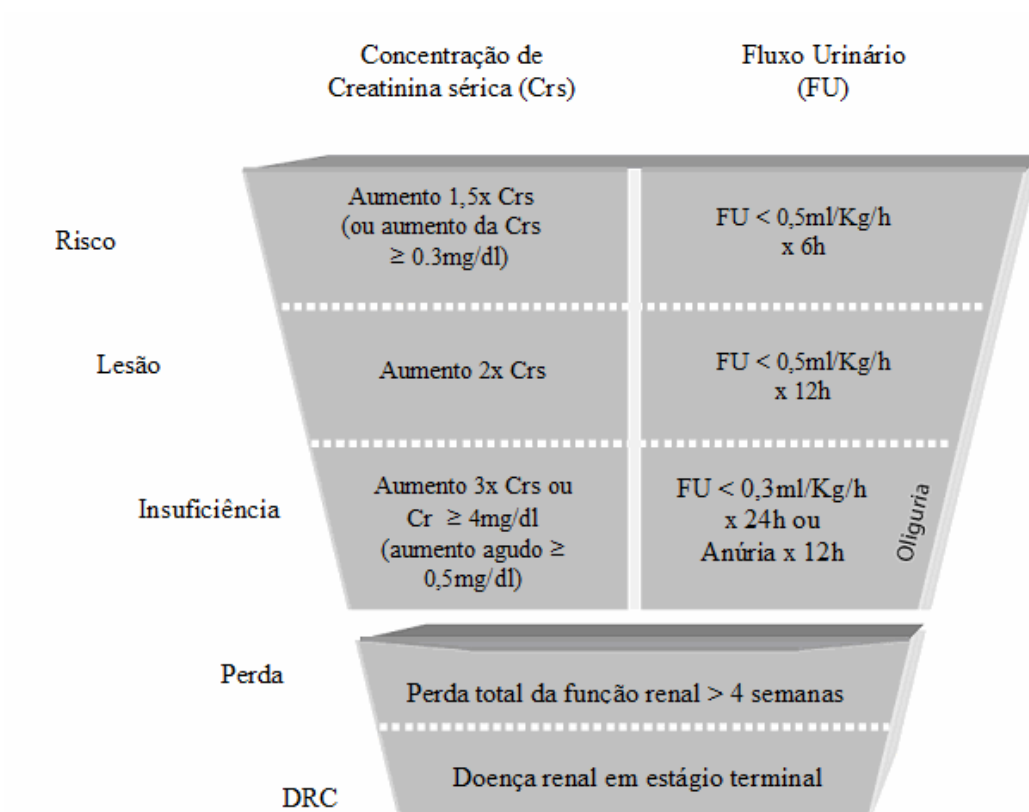


Figura 2: Diagrama do critério de RIFLE, incluindo as modificações recomendadas por AKIN (adaptado)⁽¹⁶⁾.

A LRA tradicionalmente é classificada em pré-renal, renal ou intrínseca e pós-renal⁽⁹⁾.

Na LRA pré-renal a integridade anatômica e funcional do rim está preservada, porém há uma redução da função renal devido a hipoperfusão glomerular. Essa síndrome é normalmente causada por hipovolemia aguda, como nos casos de diminuição do débito cardíaco, depressão do volume extracelular, redistribuição de fluidos, vasoconstrição intra-renal primária e obstrução reno-vascular^(9,17). A hipoperfusão renal prolongada pode causar

lesão e necrose das células tubulares, levando à necrose tubular aguda (NTA)⁽⁹⁾.

A LRA pós-renal ocorre por obstrução do trato urinário causando, conseqüentemente, interrupção do fluxo urinário. Ela é potencialmente reversível quando se utiliza o tratamento apropriado e o mais precocemente possível⁽¹⁸⁾.

A LRA intrínseca é a segunda modalidade mais comum de LRA, depois da pré-renal. Por volta de 70% a 90% dos casos desse tipo de LRA ocorrem devido a NTA, isquêmica ou nefrotóxica. Caracteriza-se por perda quase total, porém reversível, da função renal, que algumas vezes requer tratamento dialítico⁽⁹⁾.

As LRAs nefrotóxicas correspondem a 30% dos casos de LRA renal. A nefrotoxicidade é efeito indesejável de diversos fármacos de uso rotineiro na clínica. Destacam-se nessa lista antibióticos, antiinflamatórios, antineoplásicos, drogas imunossupressoras e contrastes radiológicos.

As drogas imunossupressoras têm reservado um capítulo à parte no estudo da nefrotoxicidade em decorrência do incremento no número de transplantes diversos. Esse estudo dará ênfase à investigação da nefrotoxicidade Tacrolimus.

A LRA pelo Fk 506 está associada à diminuição do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular, possivelmente ocasionado pela vasoconstrição das arteríolas glomerulares e a contração das células mesangiais em resposta aos distúrbios de oxidação já mencionados⁽¹⁹⁾. O aumento da secreção de endotelina (ET), bem como da ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), fazem crer que o decréscimo do coeficiente de ultrafiltração glomerular (K_f) possa ser um dos fatores determinantes da redução da filtração glomerular induzida por esse imunossupressor⁽¹⁹⁾.

Muitos estudos têm se voltado para a identificação de agentes com efeito renoprotetor que possam atenuar a nefrotoxicidade de fármacos não substituíveis. Contudo, por vezes, o próprio medicamento de proteção se revela

tóxico, valorizando o uso de agentes com menor potencial para efeitos indesejáveis, como os fitomedicamentos.

A fitoterapia, que consiste em terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, tem se tornado cada vez mais popular. São considerados medicamentos fitoterápicos aqueles cuja matéria-prima é exclusivamente originária de vegetais, descartando-se qualquer medicamento que inclua em sua composição outras substâncias ativas isoladas ou a associação dessas a extratos vegetais. Os fitoterápicos que apresentam eficácia e segurança comprovada por estudos clínicos podem ser chamados de fitomedicamentos. Por esse motivo, a terminologia empregada nesse estudo para se referir à *Vitis Vinifera L* será fitomedicamento^(20,21).

Atualmente, aproximadamente 25% das drogas mundialmente prescritas são derivadas de plantas e 11% das drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde são originárias de plantas. Além disso, um grande número de drogas sintéticas possui um precursor natural. Estima-se que 60% dos medicamentos anti-tumorais e antibióticos tem origem natural. Alguns medicamentos considerados extremamente importantes na clínica são derivados de plantas, tais como digoxina (*Digitalis ssp*), atropina (*Atropa belladonna*) e codeína e morfina (*Papaver somniferum*)⁽²²⁾.

A aplicação dos fitomedicamentos na rotina terapêutica em diferentes situações clínicas poderá representar alternativa viável e significativa, particularmente em território nacional, cuja flora é tão diversificada e abundante. Esse fato pode, inclusive, se constituir em vantagem econômica se comparada a outras alternativas medicamentosas mais rotineiras.

O extrato seco de *Vitis vinifera L* é um fitomedicamento que contém proantocianidinas oligoméricas (OPCs), que são um flavonóide. Esses elementos são capazes de neutralizar radicais livres de ferro e oxigênio, sendo de 15 a 20 vezes mais potentes que a vitamina E⁽²³⁾.

Diversos estudos experimentais com animais e *in vitro* já demonstraram as diferentes ações biológicas e farmacológicas dos flavonóides. Essas ações incluem seu efeito antioxidante, hipogliceminante, anti-tumoral, redutor de perda óssea e como redutor dos níveis de LDL (colesterol ruim) e aumento do HDL (colesterol bom), por meio do aumento reverso de colesterol. Outros estudos apontam sua eficácia na LRA isquêmica, como anti-hipertensivo, agindo na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e como antioxidante, reduzindo o nível de peróxidos urinários e na LRA por rabiomiólise, melhorando a função tubular e reduzindo os níveis de peróxidos e malondaldeído urinários^(24,25,26,27).

Considerando o efeito tóxico da Ciclosporina que, assim como o Tacrolimus age por meio da inibição da calcineurina podendo causar stress oxidativo, um estudo demonstrou que o extrato de uva protegeu o tecido ovariano de ratas da lesão oxidativa através da redução dos níveis de malondaldeído neste tecido. Esse mesmo estudo também evidenciou o declínio da produção do radical superóxido, por meio da inibição da enzima xantina oxidase em ratas que foram suplementadas com extrato de uva⁽²⁸⁾. Não há relatos de efeitos colaterais, tampouco toxicidade, relacionados à *Vitis vinifera L.*

A tentativa de atenuar a nefrotoxicidade do Tacrolimus com medicamentos que exibem outras toxicidades pode estabelecer relação de sinergismo e incorrer em maior número de efeitos indesejáveis. O uso de fitomedicamentos representa uma alternativa com menor risco e pode aumentar a vida do enxerto.

Considerando a ampla utilização do Tacrolimus nas terapias imunossupressoras e ressaltando que seu potencial nefrotóxico pode levar à perda do enxerto, este estudo visa verificar o efeito renoprotetor do extrato de *Vitis vinifera L* na nefrotoxicidade induzida pelo Fk 506 em estudos experimentais com ratos.

OBJETIVOS

1 OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar o efeito do Tacrolimus e da *Vitis Vinifera L* sobre a função renal de ratos.

Específicos:

- Avaliar a função renal (FR) de ratos submetidos ao tratamento com Tacrolimus.
- Avaliar o efeito renoprotetor do *Vitis vinifera L* sobre a função renal de ratos submetidos ao tratamento com Tacrolimus.
- Avaliar o perfil oxidativo renal dos animais tratados com Tacrolimus e *Vitis vinifera L*.
- Realizar análise histológica dos rins dos animais tratados com Tacrolimus e *Vitis Vinifera L*.

Material e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Os procedimentos necessários para a realização do 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 IV da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados ratos wistar, machos, adultos, pesando entre 250-300g. Os mesmos foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração durante todo o experimento e permaneceram em condições térmicas adequadas e ciclos alternados entre dia e noite.

3.1.2 Grupos experimentais

- Grupo Controle: animais que receberam somente solução de cloreto de sódio, 0,1 ml, por gavagem, durante cinco dias, uma vez ao dia
- Grupo FK: animais que receberam Tacrolimus (Fk 506), 0,5 mg/Kg, por gavagem, durante 5 dias, uma vez ao dia
- Grupo *Vitis vinifera L* (Vitis): animais que receberam *Vitis vinifera L*, 3,0 MG/kg, por gavagem, cinco dias, uma vez ao dia

- Grupo Fk + Vitis: animais que receberam Tacrolimus (0,5 MG/Kg, por gavagem, 5 dias, uma vez ao dia) e *Vitis Vinifera L* (3,0mg/kg, por gavagem, 5 dias, uma vez ao dia)

Ao final dos protocolos, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para obtenção da urina 24h e posterior mensuração da creatinina urinária.

Após a obtenção da urina os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (40-50mg/kg, i.p.) e submetidos a laparotomia para coleta de sangue, por meio da punção em aorta abdominal, para posterior dosagem da creatinina sérica. O rim esquerdo foi seccionado, imerso em solução de metacarn por 24h e após este período conservado em etanol 70% para posterior preparação de lâminas de histologia.

Ao término do experimento, os animais foram sacrificados segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório.

A seguir serão descritos todos os métodos utilizados neste experimento.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação da função renal: Clearance de creatinina

A função renal foi avaliada através do Clcr, utilizando-se o método de Jaffé, descrito a seguir:

Dosagem da creatinina plasmática

A desproteinização do plasma consiste na primeira fase para a dosagem da creatinina plasmática. Para tal, 0,5ml de plasma diluído em 1,5ml de água destilada (1:5) recebeu 0,25 ml de tungstato de sódio 10% e 0,25 ml de ácido

sulfúrico 0,75 N. Após homogeneização, a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 5000 rpm e 1,5 ml do sobrenadante foi 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 foi realizada leitura em espectrofômetro de absorvância em 520 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

Dosagem da 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 da creatinina plasmática foram utilizados para mensuração da creatinina urinária.

O Clcr foi calculada através da seguinte fórmula:

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

Os valores do Clcr foram expressos em ml/mim.

3.2.2 Método de 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 de FOX-2, o qual consiste na utilização de ferro-xilenol laranja para determinação dos níveis de peróxidos.

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 ($\alpha = 4,3 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$)⁽²⁹⁾.

A solução FOX-2 foi preparada utilizando-se, 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)

25mM da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4)

250 μM de sulfato ferroso de amônio – (Vetec Química – RJ, Brasil)

Na etapa seguinte, acrescentou-se a 900 μl desta solução, 100 μl da amostra de 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 absorvância de 560 nm.

Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos / grama creatinina^(30,31).

3.2.3 Dosagem TBARS (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico) urinários

O Malondealdeído (MDA) é freqüentemente analisado para a determinação dos índices de peroxidação lipídica por ser um dos principais produtos desta cascata. Um dos métodos para detecção deste produto é através da utilização do ácido tiobarbitúrico ao qual ele reage⁽³²⁾.

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% pH 2. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em banho maria (água fervente), por 20 minutos para que ocorresse a reação.

Ao término do tempo a solução foi resfriada em gelo e acrescentou-se 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 a 3000rpm e a leitura foi realizada em espectrofotometria em absorvância de 534 nm ⁽³³⁾.

A quantidade de MDA foi calculada através da fórmula:

$$\frac{\text{Abs} \quad \times 20}{0,156} \\ \text{CU}$$

3.2.4 Análise histológica

Após a eutanásia do animal, o rim esquerdo foi imediatamente isolado e seccionado transversalmente em cortes de 2-3 mm de espessura e mantido por 24 horas em solução de Metacarn (60% metanol, 30% clororofórmio 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 então 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 salinas com radicais ionizáveis presentes no mesmo, facilitando assim a visualização de suas estruturas ⁽³⁴⁾. Em seguida foi realizada a análise do comprometimento túbulo-intersticial do córtex renal dos animais estudados. As alterações túbulo-intersticiais foram

definidas como o aparecimento de edema e infiltrado inflamatório do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação tubular, áreas focais de desnudamento da membrana basal e necrose tubular. Para avaliação do comprometimento túbulo-intersticial foi utilizado o escore de Shih ⁽³⁵⁾, 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 e da medula 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 renal externa.

3.3 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.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada através do método ANOVA. Quando o nível da significância foi $<0,05$, considerou-se que o efeito de pelo menos um dos grupos era diferente dos outros. Os testes múltiplos de comparação 2 a 2 de Tukey HSD foram utilizados para avaliar quais grupos diferiam ou não entre si.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 FUNÇÃO RENAL

4.1.1 Peso corporal e fluxo urinário

Tabela 2 - Parâmetros globais e de função renal dos grupos:

Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis, São Paulo - 2010

Grupos(n)	PC (g)	U (ml/min)	CU (mg/dl)	CP (mg/dl)	Clcr/100g (ml/min)
Salina (7)	264±5	0,0097±0,0006	75,4±2,3	0,36±0,02	0,74±0,01
Vitis (7)	262±4	0,0112±0,0002	69,1±1,3	0,37±0,01	0,76±0,02
Fk (7)	271±5	0,0112±0,0004	41,6±1,1	1,24±0,04	0,13±0,01 ^a
Fk+Vitis (7)	277±4	0,0112±0,0004	54,0±3,0	0,75±0,03	0,28±0,01 ^b

Sendo: PC-peso corporal, U-fluxo urinário, CU-creatinina urinária, CP-creatinina plasmática e Clcr/100g-clearance de creatinina/100g.

^a p < 0,001 vs Salina e vs Vitis

^b p < 0,001 vs Fk

Os valores foram apresentados em média ± erro padrão

Conforme demonstrado na tabela 2, não se observou variações significantes em relação ao peso corporal dos animais nos diversos grupos, o que também se aplicou ao parâmetro fluxo urinário.

O grupo salina demonstrou valores de FR semelhantes aos considerados dentro da normalidade em outros estudos, o que possibilitou sua utilização como controle para os demais grupos deste estudo ⁽³⁶⁾. Sendo assim, quaisquer grupos comparados a este que resultaram em significância estatística para redução do Clcr foi considerado portador de disfunção renal (p<0,05).

Os grupos controles Salina e Vitis não demonstraram diferença significativa quanto a FR (0,74±0,01 vs 0,76±0,02).

A administração de Fk 506 resultou em redução significativa do clearance de creatinina quando comparado aos grupos controle (Fk $0,13 \pm 0,01$ vs Salina $0,74 \pm 0,01$ vs Vitis $0,76 \pm 0,02$). Esse achado confirmou a ocorrência de LRA nefrotóxica ($p < 0,001$) após o tratamento com Fk 506.

Em contrapartida, os animais que foram submetidos ao tratamento simultâneo com Fk 506 e *Vitis vinifera L* apresentaram função renal significativamente melhor que os animais que receberam apenas Fk 506 ($0,28 \pm 0,01$ vs $0,13 \pm 0,01$, $p < 0,001$).

4.2 PERFIL OXIDATIVO

4.2.1 Peróxidos urinários

Tabela 3 - Resultados referentes aos valores de peróxidos urinários dos grupos: Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis, São Paulo - 2010

Grupos	n	Peróxidos urinários (nmol/g de creatinina)
Salina	5	0,64±0,02
Vitis	5	0,63±0,01
Fk	5	4,25±0,26 ^a
Fk+Vitis	5	2,63±0,19 ^b

^a p < 0,001 vs Salina e vs Vitis

^b p < 0,001 vs Fk

Os valores foram apresentados em média ± erro padrão

Na tabela 3 estão apresentados os valores de peróxidos urinários. Os resultados apresentados pelo grupo Salina foram considerados como valores de referência para normalidade neste estudo para tal parâmetro. Os grupos controle Salina e Vitis não apresentaram diferença estatística entre si.

O grupo Fk apresentou elevação estatisticamente significativa nos valores de peróxidos urinários quando comparado ao controle (4,25±0,26 vs 0,64±0,02, p<0,001).

A estratégia de associação do Fk + Vitis demonstrou efeito de redução na excreção de PU, quando esse grupo foi comparado aos animais que receberam apenas Fk (2,63±0,19 vs 4,25±0,26, p<0,001).

4.2.2 TBARS urinários

Tabela 4 - Resultados referentes aos valores de TBARS urinários dos grupos: Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis, São Paulo - 2010

Grupos	n	TBARS urinários (nmol/g de creatinina)
Salina	5	0,071±0,004
Vitis	5	0,075±0,006
Fk	5	0,206±0,008 ^a
Fk+Vitis	5	0,097±0,007 ^b

^a p < 0,001 vs Salina e vs Fk

^b p < 0,001 vs Fk

Os valores foram apresentados em média ± erro padrão

A tabela 4 apresenta os resultados referentes aos valores de TBARS urinários. Os resultados apresentados pelo grupo Salina foram novamente considerados como valores de referência para normalidade. Os grupos controle Salina e Vitis não apresentaram diferença estatística entre si.

Novamente, o grupo Fk apresentou valores mais elevados de TBARS em relação ao grupo Salina (0,206±0,008 vs 0,071±0,004, p<0,001).

Em contrapartida, a associação do Fk + Vitis demonstrou efeito de redução dos valores de TBARS urinários quando esse grupo foi comparado aos animais que receberam apenas Fk (0,097±0,007 vs 0,206±0,008, p<0,001).

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Tabela 5 - Resultados referentes aos valores do escore de Shih realizado no tecido renal dos grupos: Salina, Vitis, Fk e Fk+Vitis, São Paulo – 2010

Grupos	N	Escore de Shih
Salina	4	-
Vitis	7	0,14± 0,09
Fk	7	0,85± 0,09 ^a
Fk+Vitis	7	0,35± 0,14 ^b

^a p < 0,001 vs Salina e vs Vitis

^b p < 0,05 vs Fk

Os valores foram apresentados em média ± erro padrão

A análise histológica revelou alterações renais discretas (escore 0,85), caracterizadas por áreas focais de necrose no córtex renal dos ratos tratados com Fk 506. O tratamento com *Vitis Vinifera L* reduziu o aparecimento dessas alterações renais, as quais foram menos evidentes no grupo Fk+Vitis (escore 0,35). Foi observada diferença estatística no grupo Fk quando comparado aos grupos Vitis e Salina (p<0,001), bem como no grupo Fk+Vitis (p<0,05).

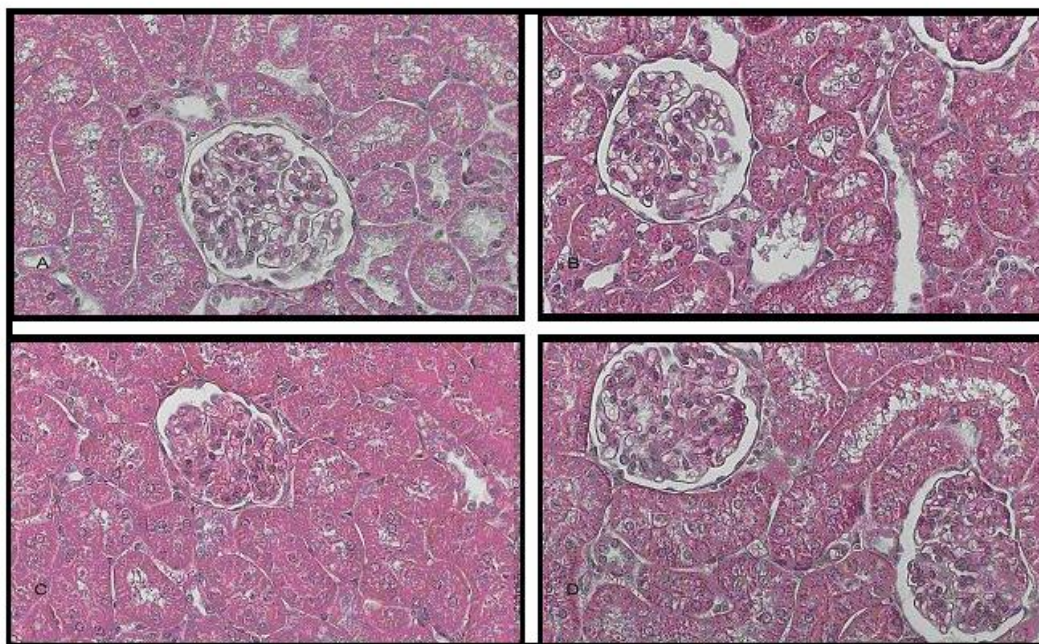


Figura 5: Cortes histológicas dos rins de ratos corados com hematoxilina-eosina. A – grupo Vitis, B – grupo Fk, C – grupo Salina e D – grupo Fk+Vitis

O estudo microscópico demonstrou características morfológicas de necrose tubular aguda no córtex renal dos ratos submetidos ao tratamento com Fk 506 evidenciada por áreas focais de desnudamento da membrana basal, achatamento das células dos túbulos proximais, perda da borda em escova, presença de edema intersticial difuso e infiltração intersticial de células inflamatórias. Tais alterações foram discretas e focais, classificadas entre 0,5 e 1,0 pelo escore de Shih. A morfologia glomerular permaneceu inalterada. O tratamento concomitante com *Vitis vinifera L* preservou a estrutura renal desses animais, mantendo-as equivalentes às dos tecidos dos grupos controles (Figura 5).

Discussão

5 DISCUSSÃO

O número de transplantes renais vem aumentando anualmente. De janeiro a março de 2010 foram realizados 1160 transplantes renais no Brasil. Comparando-se ao ano anterior, observou-se acréscimo de 8,4% nesse tipo de transplante ⁽³⁷⁾. Para a manutenção do enxerto, drogas imunossupressoras são necessárias, sendo o Tacrolimus uma delas.

Um dos efeitos indesejáveis do Tacrolimus é a nefrotoxicidade, a qual pode levar a perda do enxerto ⁽³⁸⁾. Pouco se sabe sobre os mecanismos dessa nefrotoxicidade, acredita-se que essa lesão renal esteja associada à produção de espécies reativas de oxigênio ⁽³⁹⁾.

Todos os organismos aeróbios formam e degradam EROs fisiologicamente. As EROs são mediadoras da sinalização intracelular e estão relacionadas à perda da função celular e aos processos de apoptose e necrose e defesa do organismo, através da ativação de fagócitos ⁽⁴⁰⁾. O excesso de EROs, caracterizado como stress oxidativo, tem implicado no dano glomerular, na falha renal aguda e nas doenças tubulares ⁽⁴¹⁾.

Além disso, as EROs induzem vasoconstrição ocasionando diminuição do coeficiente de ultrafiltração e redução da taxa de filtração glomerular, através da formação de mediadores vasoativos. Esse evento intensifica-se pelo sequestro de NO que agrega vasoconstrição à microcirculação renal, piorando a lesão. Na LRA tóxica há um desequilíbrio entre a produção de enzimas antioxidantes e a geração de radicais livres, como o radical hidroxila, um dos principais mediadores dessa lesão ⁽⁴²⁾.

Neste estudo, a administração de Fk506 aumentou significativamente a produção de peróxidos e malondealdeído urinários, o que sugere, indiretamente, um aumento da produção de EROs. Acompanhado a esse parâmetro, observou-se o declínio do clearance de creatinina, evidenciando a lesão nefrotóxica, induzida pelo Tacrolimus.

A LRA ocasionada pelo Fk 506 em ratos adultos saudáveis não alterou o fluxo renal, ou seja, foi caracterizada como não oligúrica. Esse efeito se comparou a outros exemplos farmacológicos de nefrotoxicidade como gentamicina, radiocontraste entre outros^(25, 43, 44).

O tratamento crônico com Ciclosporina em ratos aumentou a produção de EROs e elevou a peroxidação lipídica via TBARS e redução de níveis de glutathiona⁽⁴⁵⁾.

Estudos realizados com Fk 506 e Ciclosporina demonstraram que ambos causam lesão renal através da produção de EROs, especialmente na células tubulares^(9, 46).

Muitos estudos realizados com diferentes drogas nefrotóxicas, como a gentamicina, a polimixima e os radiocontrastes, demonstraram que o mecanismo oxidativo está presente nessas LRAs^(25, 43, 44).

Quanto à histopatologia estudos evidenciam que o Fk 506 e a Ciclosporina produzem lesões idênticas. A toxicidade aguda é histologicamente caracterizada por necrose, defeitos isolados da função tubular, infiltração leucocitária intersticial e vasoconstrição glomerular^(14,47). Neste estudo, foi observada presença de necrose tubular aguda no córtex renal dos ratos submetidos ao tratamento com Fk 506.

As enzimas antioxidantes contribuem para manutenção da homeostase celular em condições normais, ou seja, evitando o stress oxidativo e seus danos⁽⁴²⁾.

Neste contexto, a realização de estudos com agentes antioxidantes pode ser promissora. Para tal, deve-se atentar para que não haja interação medicamentosa, o que poderia causar sinergismo potencializando os efeitos tóxicos ao invés de minimizá-los. Sendo assim, os fitomedicamentos, podem ser opções de primeira escolha, já que a grande maioria deles não está relacionada a efeitos adversos.

Tendo em vista que a utilização dos inibidores de calcineurina é, até o momento, indispensável na terapia imunossupressora; neste estudo, a

investigação sobre o efeito da *Vitis Vinifera L* objetivando a prevenção ou redução dos danos causados pelo Fk 506 foi a ênfase.

Os flavonóides do vinho vêm se destacando por sua ação antioxidante por meio do sequestro de radicais livres por modularem atividades enzimáticas em prol da inibição da peroxidação lipídica ^(48, 49).

Alguns trabalhos já demonstraram a proteção desses flavonóides na LRA isquêmica, nefrotóxica e por rabdomiólise, confirmando seu efeito antioxidante. ^(25, 26,46).

Os inibidores de calcineurina, Fk 506 e CsA, aumentam a produção de radicais livres no rim, principalmente nas células tubulares e a utilização do extrato de *Camellia sinensis* (planta rica em polifenóis) minimizou a nefrotoxicidade através do sequestro desses radicais ⁽⁴⁶⁾.

Outros antioxidantes como a isoflavona, que possui a capacidade de ligar-se a íons metálicos, como o ferro e o cobre transformando-os em formas pouco reativas no mecanismo redox; o alopurinol que tem como mecanismo de ação a inibição da enzima xantina oxidase e a captura do radical hidroxila e a n-aceilcisteína que age como doadora do grupo sulfidríla ocasionando à intensificação dos efeitos biológicos do óxido nítrico ou agindo indiretamente por meio da enzima glutathione peroxidase, facilitando a biossíntese da glutathione, enzima antioxidante endógena; também demonstraram efeitos renoprotetores na LRA ^(48, 49).

Nesse estudo, a utilização de Fk 506 aumentou a produção de peróxidos e malondealdeído urinários, o que sugere, indiretamente, um aumento da produção de EROs. Acompanhado a esse parâmetro, observou-se o declínio do clearance de creatinina. A administração concomitante de Fk 506 e *Vitis Vinifera L* promoveu redução significativa dos níveis de peróxidos e malondealdeído urinários e melhorou a função renal, observada pelo aumento do clearance de creatinina. Outro estudo demonstrou a ação pró-oxidante dos inibidores de calcineurina através da peroxidação lipídica, sendo que a

utilização das vitaminas E e C, antioxidantes, também demonstrou eficácia minimizando o efeito oxidativo do Fk 506⁽⁵²⁾.

O estudo ora apresentado também evidenciou, na análise histológica, a presença de NTA, ocasionada pela administração do Fk 506. Em modelos de LRA tóxica foram observadas vasoconstrição intrarenal e disfunção tubular com estabelecimento da NTA⁽⁵³⁾. O uso concomitante da *Vitis vinifera L* demonstrou proteção celular, preservando suas estruturas.

O efeito renoprotetor proporcionado pela *Vitis vinifera L* pode estar relacionado ao seqüestro de radicais livres, a inibição da peroxidação lipídica, ou ainda, a atuação nessas duas vias. É fato que o efeito antioxidante do vinho tem sido ressaltado devido à suas implicações benéficas no controle da inflamação endotelial e melhoria das condições de perfusão miocárdica. Isso posto, o resultado satisfatório na homeostase miocárdica estimulou a investigação dos seus efeitos em outros órgãos, em situações de lesão semelhante àquelas citadas para a isquemia miocárdica: a inflamação e o desequilíbrio redox. A LRA compõe esse cenário e mostrou ser reativa ao tratamento com esse fitomedicamento.

Em síntese, os resultados apresentados nesse estudo realçaram o efeito protetor da *Vitis vinifera L* na função renal de ratos submetidos ao tratamento com Tacrolimus. A redução de peróxidos e malondealdeído urinários confirmou o efeito antioxidante deste medicamento.

Contudo, outros estudos que detalhem o perfil oxidativo e os mecanismos intracelulares da LRA nefrotóxica ocasionados pelo Tacrolimus e seu tratamento com *Vitis vinifera L* trarão mais clareza aos dados aqui apresentados.

Sendo o transplante renal o tratamento para doença renal crônica que proporciona melhor qualidade de vida ao paciente e dentre todos é aquele que demonstra melhor custo benefício; estudos que comparem a eficácia dos medicamentos potencialmente renoprotetores e o custo benefício dos mesmos

poderão subsidiar a inclusão de uma nova droga na terapia medicamentosa do transplante renal e proporcionar uma maior sobrevida ao enxerto, além de reduzir os gastos relacionados à volta do paciente às terapias dialíticas e a necessidade de um retransplante.

Atualmente, a utilização de técnicas complementares ao tratamento médico tradicional vem se difundindo por todo o mundo e o uso dos fitomedicamentos já recebe indiscutível reconhecimento científico; o que torna o seu uso promissor.

As atividades de pesquisa que visem à melhoria da saúde e que respeitem os princípios éticos em homens e animais são direito de todos os pesquisadores da saúde e devem estar presentes também no cotidiano do enfermeiro.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Os dados confirmaram a lesão nefrotóxica induzida pelo Tacrolimus, com a redução da função renal, evidenciada pelo clearance de creatinina.
- O extrato de *Vitis vinifera L* demonstrou efeito renoprotetor significativo com resultados de clearance superiores ao do Tacrolimus.
- A administração de Fk 506 elevou a excreção de peróxidos e malondealdeído urinários, enquanto que a administração simultânea com *Vitis vinifera L* reduziu tais parâmetros, o que demonstrou o efeito antioxidante do *Vitis vinifera L* e sugeriu o mecanismo oxidativo como sendo um dos ramos da lesão renal aguda nefrotóxica induzida pelo Tacrolimus.
- O Fk 506 determinou alterações significantes na histologia renal. Essas alterações foram reduzidas com o uso simultâneo da *Vitis vinifera L*.

Referências

REFERÊNCIAS

1. First MR. Tacrolimus based immunosuppression. *J Nephrol.* 2004 nov-dec; 17 Suppl 8:S25-31.
2. Arredondo A, Rangel R, Icaza E. Costo-efectividad de intervenciones para insuficiencia renal crônica terminal. *Rev. Saúde Pública.* 1998; 32(6):556-65.
3. Salonen T, Reina T, Okasa H, Sintonen H, Pasternack A. Cost analysis of renal replacement therapies in Finland. *Am J of kidney dis.* 2003; 42(6):1128- 38.
4. Moudgil A. Renal transplantation. *Indian J Pediatr.* 2003; 70(3):257-64.
5. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria da Saúde. Lista de espera para transplante, com doador cadavérico, no Estado de São Paulo. Secretaria da saúde do Estado de São Paulo, 2010. [citado 2010 jul. 26]. Disponível em:
http://www.saude.sp.gov.br/content/gestor_informacoes_saude_transplantes_lista_espera.mmp.
6. Ardenghi J, Cerasér KMM. Tacrolimus na imunossupressão em transplantes hepáticos. *Rev Bras Med.* 2000 Jun; 57(6):566-70.
7. Neto ALC, Costa MC, Burdmann EA, Yu L. Atualização em insuficiência renal aguda: nefrotoxicidade aguda de drogas imunossupressoras. *J Bras Nefrol.* 2000; 22(2):114-20.
8. Brady HR, Brenner BM, Clarkson MR, Lieberthal W. Acute Renal Failure. In: Brenner BM. *The Kidney.* 6th ed. Philadelphia: Saunders 2000. v.1, cap.28, p.1201-62.

9. Han SY, Mun KC, Choi HJ, Kawak CS, Bae JH, Suh SI et al. Effects of cyclosporine and tacrolimus on the oxidative stress in cultured mesangial cells. *Transplant Proc.* 2006 Sep; 38(7):2240-1.
10. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J of Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44-84.
11. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian Thioredoxin system. *Free Radic Biol and Med.* 2001;31(11): 1287-312.
12. McCord JM. The evolution of free radical and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 108(8):652-9
13. McCord JM. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose response.* 2008; 6:223-38.
14. Ninova D, Covarrubias M, Rea DJ, Park WD, Grande JP, Stegall MD. Acute nephrotoxicity of tacrolimus and sirolimus in renal isografts: differential intragraft expression of transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin. *Transplantation.* 2004 Aug; 15;78(3):338-44.
15. Metha RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007; 11(2): 2-8.
16. S Nattachai, Hoste EEA, Kellum JA. Modern classification of acute kidney injury. *Blood Purif.* 2010; 29:300-307.
17. Monte JCM, Boim MA, Santos OFP. Insuficiência renal aguda pré-renal. In: Schor N, Boim MA, Santos OFP. *Insuficiência Renal Aguda: fisiopatologia, clínica e tratamento.* São Paulo: Sarvier 1997. cap.12, p. 87-91.

18. Pena CJM, Schor N. Insuficiência renal aguda pós-renal. In: Schor N, Boim MA, Santos OFP. Insuficiência Renal Aguda: fisiopatologia, clínica e tratamento. São Paulo: Sarvier 1997. cap13, p.93-102.
19. Cuvello Neto LA, Costa MC, Burdmann E, Yu L. Atualização em insuficiência renal aguda: Nefrotoxicidade aguda de drogas imunossupressoras. J Bras Nefrol. 2000; 22(2):114-20.
20. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública n 84, 22 de outubro de 2002. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária,2002 [citado 2010 set. 27]. Disponível em:
<http://www4.anvisa.gov.Br/tese/visadoc/CP/CP%5B2920-1-0%5D.PDF>
21. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 971, de13 de maio de 2006. Institui a Política Nacional de práticas integrativas e complementares no Sistema Único de Saúde – PNPIC. Ministério da Saúde, 2006 [citado 2010 set. 27]. Disponível em:
<http://portalsaude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>
22. Rates S.M.K. Plants as source of drugs. Toxicon. 2001; 39:603-13.
23. Maffei F, Carinin M, Aldini G, et al. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*. A mechanism for their capillary protective action. Arzneimittel for Schung. 1994;44:592-601.
24. Bombardelli E, Morazzoni P. *Vitis vinifera* L. Fitoterapia. 1995;LXVI(4):291-317.
25. Martim, ECO, Pinto CF, Watanabe, M, Vattimo MFF. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L. Rev Bras Ter Intensiva. 2007, 19: 3-10.
26. Silva JB, Teixeira W, Vattimo MFF. Efeito protetor da *vitis vinifera* na lesão renal aguda isquêmica em ratos. J Bra Nefrol. 2008; 30: 99-104.

27. Espín JC, Conesa, MTG, Barberán FAT. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phychemistry*. 2007; 68:2986-3008.
28. Erguder IB, Çetin R, Devrin E, Kiliçoğlu AA, Durak I. Effects of Cyclosporine on oxidant/antioxidant status in rat ovary tissues: protective role of black grape extract. *International Immunopharmacology*. 2005; 5:1311-15.
29. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Meth Enzymol*. 1994; 233:182-9.
30. Banerjee 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.
31. 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.
32. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*. 2001; 37(3):293-303.
33. Walker PD, Shah SV. Reactive oxygen metabolites in endotoxin induced acute renal failure in rats. *Kidney Int*. 1990; 38:1125-32.
34. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1990 Métodos de estudo; cap.1:p3-4.
35. Shih W, Hines WH, Neilson EG. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int*. 1988; 33:1113-18.
36. Dezoti C, Watanabe M, Pinto CF, Neiva LB de M, Vattimo M de FF. Proteção funcional da enzima heme-oxigenase-1 na lesão renal aguda isquêmica e tóxica. *Acta paul enferm*. 2009; 22(1):490-93.

37. Associação Brasileira de transplante de órgãos. Registro Brasileiro de Transplante [Internet]. 2010, 16(1): 3 [citado 2010 Jun 30]. Disponível em:
http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXVI_n1/index.aspx?idCategoria=2.
38. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney*. 2000; 35(2):333-46.
39. SY Han, KC Mun, HJ Choi, CS Kwak, JH Bae, SI Suh, et al. Effects of cyclosporine an tacrolimus on the oxidative stress in cultured mesangial cells. *Transplant Proc*. 2006 Sep;38(7):2240-1.
40. Nordberg J, Årner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Med*. 2001; 131(11):1287-1312.
41. Antnes LMG, Bianchi M de LP. Antioxidante da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. *Rev Nutr*. 2004; 17(1):89-96.
42. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*. 2000; 109(8): 665-78.
43. Pinto CF, Vattimo MFF, Watanabe M. Hydration and n-acetylcysteine in acute renal failure caused by iodated contrast: an experiment in rats. *J Nephrol*. 2008; 21(5):783-8
44. Hosaka EM, Santos OFP, Seguro AC, Vattimo MFF. Effect of cyclooxygenase inhibitors on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Braz J of Med Biol Res*. 2004; 37:979-985.
45. Capasso G, Gennaro DID, Ragione FD, et al. In vivo effect of the natural antioxidant hydroxytyrosol on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1186-1195.

46. Zhong Z et al. Reduction of ciclosporin and tacrolimus nephrotoxicity by plant polyphenols. *J Pharm Pharmacol*. 2006; 58(11):1533-43.
47. Liptak P, Ivanyi B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2(7):398-404.
48. Solomon S. Developmental changes in nephron number, proximal tubular length and superficial nephron glomerular filtration rate of rats. *J Physiol*. 1997; 272:573-89.
49. Puiggrós F, Llópiz N, Ardévol A, Bladé C, Arola L, Salvado MJ. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *J Agric Food Chem*. 2005;53(15):6080-86.
50. Watanabe M, Neiva LMB, Santos CCX, Laurindo FM, Vattimo MFF. Isoflavone and the heme oxygenase system in Ischemic acute kidney injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(12):2366-71.
51. Andrade SC de, Dezoti C, Shibuya CA, Watanabe Mirian, Vattimo M de FF. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do alopurinol e n-acetilcisteína como antioxidantes. *J Bras Nephrol*. 2004, 26(2):69-75.
52. Varghese Z, Fernando RL, Turakhia G, Psimenou E, Fernando ON, Sweny P, et al. Calcineurin inhibitors enhance low-density lipoprotein oxidation in transplant patients. *Kidney Int Suppl*. 1999 Jul; 71:s137-40.
53. Fujigaki Y, Sakakima M, Sun Y, Goto T, Ohashi N, et al. Immunohistochemical study on caveolin-1 α in regenerating process of tubular cells in gentamicin-induced acute tubular injury in rats. *Virchows Arch*. 2007; 450:671-681.