

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Enfermagem**

**Lesão renal aguda por glicerol: Efeito antioxidante da**  
***Vitis vinifera L.***

Elisabete Cristina de Oliveira Martim

**São Paulo**  
**2007**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Enfermagem**

**Lesão renal aguda por glicerol: Efeito antioxidante da**  
***Vitis vinifera L***

Elisabete Cristina de Oliveira Martim

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Fernandes Vattimo

**São Paulo**  
**2007**

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

Martim, Elisabete Cristina de Oliveira.

Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera L.* / Elisabete Cristina de Oliveira Martim. – São Paulo, 2007.

64 p.

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria de Fátima Fernandes Vattimo

1. Músculo esquelético 2. Necrose 3. Insuficiência renal aguda.  
4. Antioxidantes (aplicações terapêuticas). 5. Flavonóides  
(aplicações terapêuticas). I. Título.

Trabalho realizado no Laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo com apoio financeiro da Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Capes).

# Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido Cláudio Martim por todo seu amor, carinho, dedicação e compreensão durante todas as etapas deste estudo e por todos os momentos de nossas vidas juntos.

À minha mãe Maria Rilza que me ensinou que é preciso acreditar para vencer e lutar sempre. Uma grande saudade.

# Agradecimentos

À Profª Drª Maria de Fátima Fernandes Vattimo, por acreditar em meu trabalho, pelo apoio constante, paciência e dedicação. Expresso minha admiração não só como profissional, mas também como pessoa.

Ao Profº Dr. Antônio Carlos Seguro pela oportunidade de aprendizado e contribuição para meu desenvolvimento científico.

À Drª Heloísa Massola Shimizu por toda paciência, atenção e carinho durante este trabalho.

À amiga Mirian Watanabe por toda sua amizade e companheirismo durante todas as etapas deste trabalho. Muito obrigada.

À amiga Cláudia Akemi Shibuya pela imensa contribuição no laboratório e apoio nos momentos difíceis.

À Fabíola Maiumi Oshiro pela atenção e disponibilidade durante a coleta de dados.

Ao biomédico Drº Rildo A. Volpini por toda contribuição no estudo histopatológico e pelo estímulo diário.

À funcionária do LEMA Neusa da Silva Oliveira pelo apoio e ajuda prestada neste trabalho.

Às amigas do LEMA: Carolina, Cassiane, Juliana, Márcia e Luciana, por toda contribuição e amizade.

À estatística Eutália A. C. Araújo pelos valiosos préstimos na análise dos resultados deste trabalho.

À química Drª Clara Versolato pela disponibilidade e atenção.

Às enfermeiras da UTI do Hospital alemão Oswaldo Cruz: Acácia, Cíntia, Luciana C, Luciana S, Luciana G, Priscila, Rosely, Tatiana, Walquíria por toda colaboração.

À gerente Sarah e encarregadas Célia e Janete da UTI do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.

Ao meu pai Milton A. de Oliveira e meus irmãos Jussara, Eliane e Milton Jr. por todo carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Material.....	25
3.1.1 Animais e padronização do modelo experimental.....	25
3.1.2 Apresentação dos grupos experimentais.....	26
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Dosagem de creatina-quinase.....	27
3.2.2 Função renal: clearance de creatinina.....	28
3.2.3 Avaliação da função tubular: fração de excreção de sódio e de potássio .....	29
3.2.4 Método FOX para peróxidos urinários .....	30
3.2.5 Dosagem de TBARS (substância reativas com ácido tiobarbitúrico) na urina.....	32
3.2.6 Análise histológica e morfométrica .....	33
3.3 Local .....	34
3.4 Análise estatística.....	35
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Creatina-quinase .....	37
4.2 Função renal .....	38
4.3 Função tubular: FENa e FEK.....	40
4.4 Peróxidos urinários.....	42
4.5 MDA (TBARS) urinário .....	43
4.6 Histologia e morfometria renal .....	44
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resultados referentes aos valores da creatina-quinase dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007. ....37
- Tabela 2:** Resultados referentes à função renal global dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis Vinifera*. São Paulo. 2007.....38
- Tabela 3:** Resultados referentes à função tubular [fração de excreção de sódio (FENa) e fração de excreção de potássio (FEK)] dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007.....40
- Tabela 4:** Resultados referentes aos valores de peróxidos urinários dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007. ....42
- Tabela 5:** Resultados referentes aos valores de malondaldeído urinário dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007. ....43
- Tabela 6:** Resultados referentes aos valores de morfometria realizada no tecido renal dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis Vinifera*. São Paulo. 2007. ....44



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	absorbância
ATP	adenosina trifosfato
CLcr	clearance de creatinina
CK	creatina-quinase
DNA	ácido desoxirribonucléico
Eros	espécies reativas de oxigênio
Fé	ferro
FE	fração de excreção
FENa	fração de excreção de sódio
FEK	fração de excreção de potássio
FOX	método xilenol laranja
FOX-2	metodo xilenol laranja versão 2
FR	função renal
GSH	glutathiona
HE	hematoxilina-eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HPLC	cromatografia de alta pressão
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
LRA	lesão renal aguda
MDA	malondealdeído
NO	óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superóxido
OH	radical hidroxila
TBARS	substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
v.o.	via oral

Martim ECO. **Lesão Renal Aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L.** [dissertação] São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2007.

## RESUMO

A Lesão Renal Aguda (LRA) é a complicação mais grave da rabdomiólise. Nessa síndrome, a liberação do pigmento heme desencadeia uma lesão que se caracteriza por vasoconstrição glomerular e toxicidade celular direta com componente oxidativo. A lesão oxidativa desencadeada é uma das linhas fisiopatológicas mais intrigantes. A renoproteção com antioxidantes tem demonstrado efeito satisfatório. As proantocianidinas são antioxidantes naturais encontrados no extrato da semente da uva. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antioxidante da *Vitis vinifera* (extrato da semente de uva) sobre a função renal de ratos submetidos à lesão por rabdomiólise. Foram utilizados ratos Wistar, adultos machos, pesando entre 250-300 gramas. A LRA foi induzida pela administração de glicerol 50% i.m (intramuscular). Os animais foram distribuídos em 4 grupos: grupo Salina (6ml/Kg de NaCl 0,9% via intraperitoneal (i.p) 1 vez ao dia), grupo Glicerol (6ml/Kg de glicerol i.m, cada região femoral recebeu 3ml/Kg de glicerol, 1 vez ao dia), grupo *Vitis vinifera* (3mg/Kg v.o por 5 dias) e grupo Glicerol+*Vitis vinifera* que recebeu *Vitis vinifera* por 5 dias antes do glicerol. Foram avaliados o marcador de lesão muscular (CK), a função renal (FR), a função tubular (FENa e FEK), o perfil oxidativo (peróxidos urinários-FOX-2 e MDA-TBARS) , a histologia e morfometria renal. O grupo Glicerol tratado com *Vitis vinifera* apresentou melhora da FR e tubular, redução dos níveis da peroxidação lipídica e melhora da histologia renal. Os resultados deste estudo confirmaram a proteção antioxidante, com repercussão histológica, da *Vitis vinifera* na LRA induzida por glicerol.

**Palavras-chaves:** Lesão Renal Aguda. Rabdomiólise. Antioxidante. Proantocianidinas. Flavonóides.

Martim ECO. **Acute Kidney Injury by glycerol: antioxidant effect of *Vitis vinifera* L.** [dissertação] São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2007.

### ABSTRACT

The Acute Kidney Injury (AKI) is the worst complication of rhabdomyolysis. In this syndrome, the delivery of heme pigment induces an injury that distinguishes itself by glomerular vasoconstriction and direct cellular toxicity with oxidative component. The oxidative injury is an intriguing one of the pathophysiological mechanism. The renoprotection with antioxidants has demonstrated satisfactory effect. The proanthocyanidins are natural antioxidants found in grape seed extract. The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of *Vitis vinifera* (grape seed extract) on the renal function of rats submitted to the injury by rhabdomyolysis. Wistar rats, male, adults, weight ranging from 250-300 g were used. The AKI was induced intramuscular (i.m.) administration of glycerol 50%. The animals were distributed in 4 groups: Saline group (6ml/Kg of NaCl 0,9% intraperitoneal (i.p) once a day), Glycerol group (6ml/Kg of glycerol i.m, each femoral region received 3ml/Kg of glycerol, once a day), *Vitis vinifera* group (3mg/Kg v.o by 5 days) and Glycerol+*Vitis vinifera* group that has received *Vitis vinifera* by 5 days before glycerol. Marker of muscular injury (CK), renal function (RF), the tubular function (FENa and FEK), the oxidative profile (urinary peroxides -FOX-2 and MDA-TBARS), the histological and kidney morphometric were evaluated. The Glycerol group treated with *Vitis vinifera* has shown improvements in RF and tubular, reduction of levels of lipid peroxidation and amelioration of kidney histology. The results of this study have confirmed the antioxidant protection, with histological repercussion of *Vitis vinifera* in AKI induced by glycerol.

**Key words:** Acute Kidney Injury. Rhabdomyolysis. Antioxidant. Proanthocyanidins. Flavonoids.



## 1. INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome relacionada a diversas comorbidades e complicações que incorrem em altos índices de morbimortalidade. Avanços na área de tratamento caracterizados predominantemente por métodos dialíticos não têm logrado em obter resultados otimistas no controle dessa síndrome. Há que se ressaltar que fatores predisponentes como desidratação, doença renal prévia e idade avançada têm sido exaustivamente apontados, porém, dados conclusivos quanto aos resultados de estratégias de resgate nessas populações ainda não estão disponíveis.

Esse cenário desfavorável da história da LRA é suficiente para referendar a necessidade de se identificar medidas de prevenção como provavelmente as únicas alternativas capazes de estabelecer condições de maior conforto epidemiológico. Estudos experimentais têm demonstrado que diversas estratégias farmacológicas, se adotadas em tempo, podem trazer esse benefício. Nesse contexto, os agentes antioxidantes, com ênfase aos fitoterápicos, têm se firmado nessa busca.

A LRA é caracterizada pela queda rápida das funções tubular e glomerular, tendo como causas freqüentes a isquemia e a nefrotoxicidade. Vários compostos químicos podem estar relacionados com a redução da filtração glomerular por vasoconstrição direta renal ou uma lesão direta celular semelhante ao evento isquêmico. Estes componentes químicos são medicamentos (aminoglicosídeos), contrastes iodados, peçonha (veneno de

origem animal) e pigmentos (hemoglobina e mioglobina) (Brenner et al, 1998; Morais et al., 2003).

A associação entre rabdomiólise e LRA foi descrita pela primeira vez por Bywaters e Beall, durante a segunda Guerra Mundial. Após os bombardeios, soldados resgatados que sobreviveram aos traumas graves apresentavam redução do volume urinário e hematúria, caracterizando o quadro clínico de LRA identificada, naquela feita, como *Crush Syndrom* (síndrome do esmagamento). A *Crush Syndrom* é atualmente conhecida como rabdomiólise (Zager, 1996).

A musculatura esquelética é constituída por numerosas fibras musculares, compreendendo 40% da massa corporal total. Possui propriedades funcionais como: manutenção de gradientes iônicos e processos metabólicos do mioplasma e mitocôndria que são importantes para a estabilidade da membrana celular (sarcolema) e responsáveis pela regulação de transportes iônicos. No relaxamento muscular ocorre o transporte de cálcio de volta ao retículo sarcoplasmático, já a contração muscular depende de um impulso neuronal e do gradiente elétrico transcelular por meio da bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ . Ambos, contração e relaxamento muscular se constituem em processos ativos que consomem ATP, destacando-se que uma vez ocorrida sua depleção, tornam-se comprometidos. Além disso, no músculo, o cálcio é responsável pela regulação da entrada e saída de sódio e potássio no interior da célula, necessário para a propagação do potencial de ação (Guyton, 1991).

A creatina-quinase (CK) é o marcador laboratorial mais sensível de lesão muscular e seu nível aumentado parece ter relação direta com o grau de lesão muscular. Esse marcador, associado a dados da história e sinais, representam a composição necessária para a formulação diagnóstica da rabdomiólise (Vanholder et al., 2000).

A rabdomiólise decorre primeiramente da necrose muscular de origem traumática ou não traumática. As causas traumáticas se caracterizam por trauma e compressão muscular, oclusão dos vasos musculares, exercício físico excessivo e choque elétrico. A necrose muscular de origem não traumática pode estar relacionada à atividade muscular excessiva, isquemia da musculatura por oclusão vascular, distúrbios metabólicos (hipocalcemia, hipernatremia, cetoacidose diabética), toxinas (monóxido de carbono, álcool, tétano, envenenamento crotálico), doenças imunológicas (polimiosite), infecções (viral, bacteriana), drogas ilícitas (cocaína, anfetaminas, antiinflamatórios não hormonais) e doenças hereditárias (deficiência de enzimas glicogenolíticas (Síndrome McArdle) e do metabolismo de lipídios ou ainda deficiência de carnitina.

Ressalte-se que as causas não traumáticas foram identificadas apenas décadas após as causas traumáticas, especificamente em 1970 (Singh, 2005; Zager, 1996).

Dados epidemiológicos estimam que a rabdomiólise não traumática compreenda de 5% a 7% de todos os casos de LRA e represente 25% de

todos os casos de NTA, porém, a prevalência de LRA em pacientes com rabdomiólise varia entre 17% e 33% (Beetham, 2000).

Entre os mecanismos propostos para explicar a associação entre a rabdomiólise e a LRA destacam-se a obstrução tubular pela presença de cilindros formados pelo pigmento heme, a vasoconstricção renal e a toxicidade direta da proteína heme sobre a célula tubular, mecanismos inter-relacionados e já mencionados. Maior descrição deste detalhamento fisiopatológico será feito a seguir (Paller, 1988).

A obstrução tubular pode ocorrer por meio da formação de cilindros de mioglobina. Os cilindros de heme têm efeito tóxico sobre a célula tubular. Sabe-se que a mioglobina é filtrada facilmente através da membrana basal. A proteína heme forma cilindros em resposta a sua alta concentração em nefrôns distais, que aumentam com a extensão da lesão muscular. A excreção de ácido úrico também contribui para a obstrução tubular, favorecendo a formação de cilindros. Esse mecanismo obstrutivo pode ser intensificado em situações de depleção de volume, juntamente com a vasoconstricção renal. Há ainda o fator relacionado à acidez urinária desencadeada pela acidose ânion gap, que por sua vez, diminui a solubilidade da mioglobina resultando em precipitação de 98% sob pH urinário de 5.0 (Knochel, 1992; Zager, 1989).

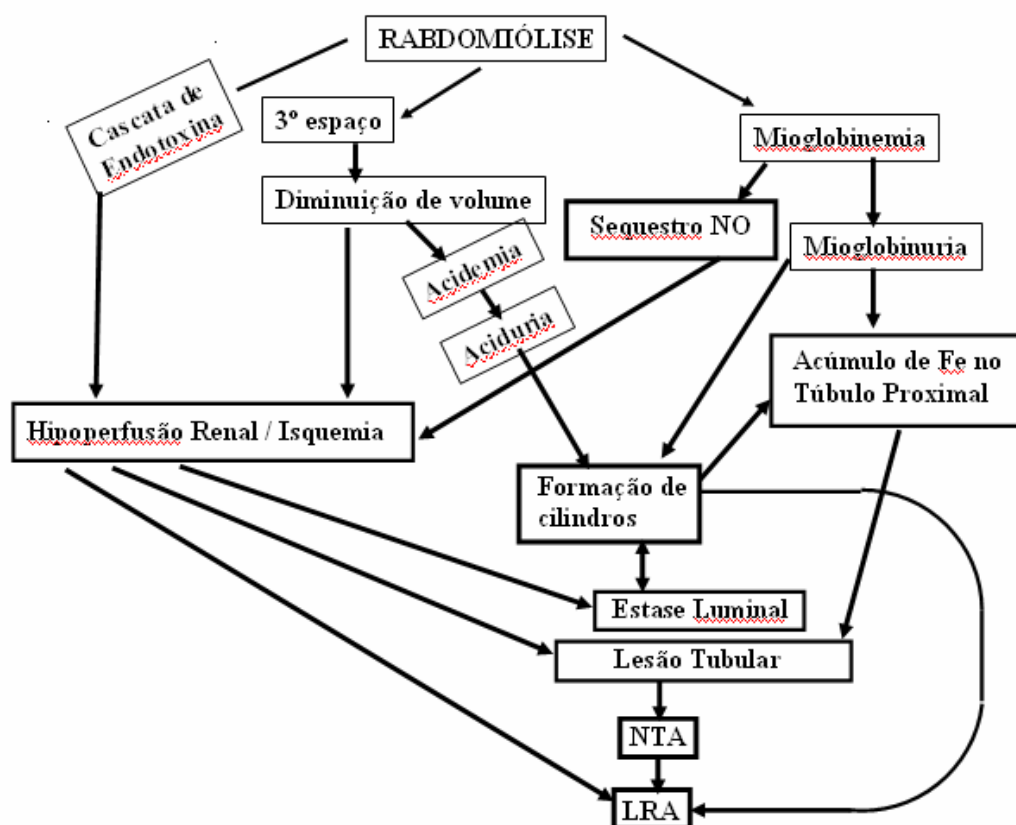
A vasoconstricção e a hipoperfusão renal também são citadas como componentes fisiopatológicos. Na lesão descrita elas são desencadeadas pela perda de fluido para o terceiro espaço mediada pela necrose muscular



e pela ativação da cascata de endotoxina juntamente com o seqüestro de óxido nítrico (NO) pela heme proteína na microcirculação renal (Breziz, 1991; Sharma et al., 1987).

A hemecitotoxicidade nas células tubulares está relacionada com a liberação de ferro da mioglobina, promovendo a formação de radicais livres (Paller,1988). As proteínas heme, tal como a hemoglobina e a mioglobina, quando liberadas no espaço extracelular, precipitam a lesão tecidual renal por meio da degradação da enzima heme-oxigenase, sendo que o acúmulo de heme livre induz ao estresse oxidativo (Nath, 1992).

A fisiopatologia da mioglobinúria induzida pela administração de glicerol 50% intramuscular constitui-se em um modelo clássico de LRA experimental para o estudo do papel do estresse oxidativo, devido a liberação de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) como as radicais superóxido, o radical hidroxil e outros metabólitos como peróxido de hidrogênio em células tubulares. A solução de glicerol 50% intramuscular causa a destruição de músculos, levando a miólise e ao acúmulo de heme livre no sangue, que são posteriormente transportados até o rim, iniciando o ciclo da lesão oxidativa renal já descrito (Ferraz et al., 2002; Funez et al., 2003; Singh, Chander, Chopra, 2003) (Fig 1).



**Figura 1:** Fisiopatologia da lesão renal aguda por rabdomiólise (Zager, 1996)

A necrose muscular uma vez estabelecida pode exacerbar o distúrbio oxidativo pela alteração na homeostase do cálcio e a depleção de ATP, gerando alterações de íons intracelulares, principalmente o aumento do cálcio citosólico, através da troca pelo íon de sódio. Com os níveis de cálcio elevados há o desencadeamento de contração muscular persistente resultando no esgotamento de reservas de ATP, conseqüentemente morte celular. Nesse contexto, diferentes sistemas enzimáticos como proteases (calpaína) e fosfolipases (fosfolipase A2) irão contribuir para a formação e liberação de EROs e substâncias vasoconstritoras, resultando em lesão de miofibrilas e da membrana celular, em influxo de sódio e morte celular (Guyton, 1991; Zager, 1996).

A lesão oxidativa na rabdomiólise caracteriza-se por mecanismo de retroalimentação dinâmica, onde o aumento de cálcio citosólico eleva a produção de radical superóxido, gerando desequilíbrio entre a geração de intermediários pró-oxidantes e agentes antioxidantes endógenos, intensificando a lesão celular (Zager, 1996).

Como já é de consenso, o estresse oxidativo pode contribuir para formação de mediadores vasoativos que comprometem a função renal por vasoconstrição, diminuindo o coeficiente de ultrafiltração e reduzindo a taxa de filtração glomerular. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbios. São conhecidas como mediadoras de sinalização intracelular, relacionadas à perda da função celular e estão associadas aos processos de apoptose e necrose. Possuem também funções de defesa contra infecções por meio da ativação de fagócitos que produzem EROs em quantidade suficiente contra infecções (Nordberg, Arnér, 2001).

A lesão oxidativa altera a estrutura e função glomerular devido ao efeito das EROs em células mesangiais e endoteliais, além de desencadear uma lesão inflamatória causada pela liberação de mediadores como citocinas e a ativação leucocitária (Rovin, et al., 1998; Tak, et al., 2001). A disfunção endotelial parece estar relacionada ao aumento da produção de superóxido que reduz a biodisponibilidade de NO implicando em relaxamento vascular (Berry, et al., 2000).

Na presença do oxigênio, a ação das EROs sobre os ácidos graxos polinsaturados caracteriza-se pela formação de hidroperóxidos e endoperóxidos. Estes compostos podem ainda decompor-se produzindo radicais adicionais. A medida destes produtos reativos, especialmente malondealdeído (MDA), o F-2-isoprostanos e os peróxidos urinários podem ser utilizados como marcadores de peroxidação lipídica em sistemas biológicos (Lima, Abdalla, 2001).

Neste contexto, sublinhado o papel do desequilíbrio redox na LRA, o uso de antioxidantes com objetivos preventivos ou curativos tem merecido destaque na clínica e em ensaios experimentais. A administração promissora da vitamina E, N-acetilcisteína, isoflavona e outros atenuando a lesão renal fez suscitar o interesse em avaliar o desempenho de outros agentes freqüentemente citados não só em literatura científica, como também na mídia (Shimizu et al., 2004; Watanabe et al., 2007). Destaque-se o efeito antioxidante dos flavonóides derivados da uva encontrados em alguns vinhos.

É fato que os antioxidantes naturais podem auxiliar na resposta antioxidante endógena contribuindo para a depuração das EROs, atenuando seu efeito oxidativo no rim. Esses agentes podem estar presentes nas vitaminas C, E,  $\beta$  caroteno, nas proantocianidinas, no zinco, no selênio e em enzimas antioxidantes como a glutathiona, a superóxido dismutase e a catalase e a superóxido reductase. Serão destacados os papéis da glutathiona, o mais ativo antioxidante endógeno e das proantocianidinas.

A glutathiona (GSH), há décadas reconhecida como o principal antioxidante endógeno, é um tripeptídeo que se apresenta em altas concentrações em todas células de mamíferos exercendo proteção celular contra o estresse oxidativo, caracterizando-se como marcador de toxicidade. Sua atuação destaca-se sobremaneira na proteção celular contra as mudanças no quadro oxidativo, atuando principalmente na peroxidação lipídica e na redução de síntese protéica e do DNA (Halliwell, 1992).

As proantocianidinas são extraídas das sementes de uva *Vitis vinifera* L. Os seus componentes ativos consistem em flavonóides ou proantocianidinas que são digômeros polifenólicos derivados de flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis. Outros componentes ativos presentes no extrato de uva incluem os ácidos graxos essenciais e tocofenóis (Blumenthal et al., 2000).

De todos os componentes presentes na *Vitis vinifera*, os compostos fenólicos, especialmente as proantocianidinas, têm despertado muitos interesses do ponto de vista farmacêutico e clínico.

As proantocianidinas são antioxidantes naturais que, possuem ações como seqüestradores de radical livre, promotoras de vasodilatação, além de possuírem também propriedades anticarcinogênica, antialérgica, antiinflamatória, antimicrobiana cardioprotetora, estimulação imunológica, atividade estrogênica e por fim inibição das enzimas fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclooxigenase e lipooxigenase. Dentre essas ações o principal foco neste estudo foi a proteção contra as EROs ( Salah, 1995; Rice-Evanz, 1996).

O seu efeito antioxidante relaciona-se também ao aumento da capacidade antioxidante no plasma em humano. Outra ação biológica significativa das proantocianidinas é a redução de LDL para a oxidação ambos *in vivo* e *in vitro*, por justamente possuir a capacidade de seqüestrar radicais livres implicados na formação da reação de Fenton (Rodrigo, Rivera, 2002).

O emprego dos derivados das uvas viníferas tem sido reforçado principalmente em condições clínicas como a hipertensão arterial e a dislipidemia. A interface endotelial dessas patologias é óbvia.

O efeito protetor da *Vitis vinifera* com melhora da resposta inflamatória endotelial por ação sobre o desequilíbrio redox dessas síndromes parece justificar a sua recomendação. No rim, estudos demonstraram que as proantocianidinas do extrato de semente de uva em modelos de LRA por glicerol reduziram os níveis de peroxidação lipídica com melhora da função renal (Rodrigo et al., 2004; Stefanovic et al., 2000).

A busca por alternativas terapêuticas para a prevenção da lesão renal tem se firmado na última década com o uso de estratégias antioxidantes. Dentre essas medidas, o uso da N-acetilcisteína e mais recentemente o bicarbonato de sódio vêm se tornando prática preventiva. Não é possível, contudo, afirmar os reais benefícios clínicos dessas condutas e nem tampouco discriminar com segurança os eventuais efeitos indesejáveis dessa terapêutica.

Desse modo, contrapondo-se ao cerimonial hegemônico da corrente alopática, o uso de fitoterápicos começa a fazer sombra a essas tradições farmacoterápicas. O uso e recomendação da ingestão diária de dose limitada de vinho adquiriram respaldo médico e têm sido indicados de forma sistemática. As principais vantagens da ingestão de vinho em dose reservada estão pautadas no efeito antioxidante proporcionado pela bebida. Sabe-se, contudo, que o maior teor de proantocianidinas da uva está contido na semente da fruta, representando pequena fração da bebida.

Isso posto, é consenso que o uso de antioxidantes na prevenção da LRA recebe hoje merecido reconhecimento. A administração de diferentes fármacos, contudo, pode trazer efeitos indesejáveis, ainda pouco descritos. O uso de fitoterápicos como a *Vitis vinifera*, por seu papel antioxidante, poderá resultar em efeito renoprotetor ainda mais promissor.





## 2. OBJETIVOS

- Avaliar a função renal de ratos adultos tratados com glicerol.
- Verificar o efeito do pré-condicionamento com *Vitis vinifera* sobre a função renal e tubular de ratos submetidos ao tratamento com glicerol.
- Avaliar o perfil oxidativo da lesão renal pelo glicerol em ratos com e sem o pré-condicionamento com *Vitis vinifera*.
- Verificar o efeito da *Vitis vinifera* sobre a histologia renal de ratos submetidos ao tratamento com glicerol.



### **3. MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Animais e padronização do modelo experimental**

Foram utilizados ratos da raça Wistar adultos machos, pesando entre 250-300 gramas. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Todos os animais tiveram acesso livre à água e alimento e permaneceram em condições térmicas com ciclos alternados de dia e noite durante todo o experimento.

Durante a padronização do modelo observou-se que a administração do glicerol 50%, com o objetivo de induzir a lesão renal, desencadeava quadro de dor aguda nos animais. Com o intuito de reduzir o sofrimento, os animais do grupo glicerol foram anestesiados com solução de hidrato de cloral 10% (0,1ml/kg) i.p, antes da administração intramuscular de glicerol 50%. Em seguida, foram colocados em gaiola metabólica para a mensuração do volume urinário e posterior mensuração do clearance de creatinina.

Após 24 horas em gaiola metabólica, os animais foram anestesiados novamente e submetidos a laparotomia para coleta sanguínea por meio da punção da aorta abdominal. A seguir, o rim esquerdo foi retirado, seccionado, e permaneceu em solução de Metacarn por 24 horas. No dia seguinte, os fragmentos foram imersos em solução de etanol 70% e foram preparados para posterior estudo histológico.

Ao final do experimento os animais foram sacrificados de acordo com as recomendações para utilização de animais em estudos científicos, em que se instituiu a inalação de éter dietílico até a parada respiratória total.

### **3.1.2 Apresentação dos grupos experimentais**

#### **Grupo 1. salina ( controle de nefrotoxicidade)**

Animais que receberam somente solução de cloreto de sódio (6ml/Kg de NaCl 0,9%), no mesmo volume do glicerol i.p, 1 vez ao dia.

#### **Grupo 2: glicerol**

Animais que receberam glicerol 50%, 6ml/Kg via i.m 1 vez ao dia (Vitaly - farmácia de manipulação de homeopatia). Cada região femoral recebeu 3ml/Kg de glicerol.

#### **Grupo 3: *Vitis vinifera***

Animais que receberam *Vitis vinifera* (Vittis® - Herbarium Laboratório Botânico LTDA), na dose 3mg/Kg/dia via oral (v.o.) durante 5 dias.

#### **Grupo 4 : glicerol + *Vitis vinifera***

Animais que receberam o pré-condicionamento (5 dias) com *Vitis vinifera* (Vittis® - Herbarium laboratório Botânico LTDA), na dose de 3m/Kg /dia v.o. antes da administração de glicerol 50% (6m/Kg via i.m.).

Os animais dos diversos grupos foram submetidos à dosagem CK (creatina-quinase), análise da função renal por meio do clearance de

creatinina, função tubular por meio da mensuração da fração de excreção de sódio e potássio, mensuração de peróxidos urinários pelo método Xilenol laranja (FOX-2), avaliação da taxa de peroxidação lipídica na urina pelo TBARS e análise histológica e morfométrica dos rins. Esses métodos serão descritos a seguir.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Dosagem de creatina-quinase**

A creatina-quinase (CK) é um marcador enzimático mais sensível para lesão muscular.

O sistema para determinação quantitativa da atividade da CK é pelo modo cinético mensurado no plasma.

A atividade enzimática da CK neste estudo foi determinada de acordo com a seguinte seqüência de reações:

A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato, na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NAD e NADH. A velocidade de incremento na absorbância em 340nm é proporcional à atividade da CK na amostra.

Neste estudo um volume de 20 µl de plasma foi adicionado em 100µL do reagente de trabalho (tampão 100 mmol/L, acetato de magnésio 10

mmol/L, glicose 20 mmol/L, N-acetilcisteína 20mmol/L, ADP 2 mmol/L, AMP 5 mmol/L, NAD 2 mmol/L, diadenosina pentafofato 10 $\mu$ mol/L, HK  $\geq$ 2800U/L, G-6PDF  $\geq$ 2000U/L, creatina fosfato 30 mmol/L e azida sódica 0,095%) , foi então homogeneizado e a seguir aspirado pelo aparelho BIO 2000®. Após 2 minutos foi realizada a leitura e os valores obtidos foram expressos em U/L (IFCC, 2002).

O reagente utilizado neste estudo foi CK-NAC Liquiform da LABTEST®.

### **3.2.2 Função renal: clearance de creatinina**

A mensuração da creatinina plasmática e urinária foi realizada por meio do método de Jaffé, conforme descrito a seguir:

#### **■ Dosagem de creatinina plasmática**

A primeira etapa para mensuração da creatinina plasmática consistiu na desproteinização do plasma. Neste processo 0,5ml de plasma centrifugado foi diluído em 1,5 ml de água destilada (diluição 1:5), adicionando-se 0,25 ml de tungstato de sódio 10% e 0,25 ml de ácido sulfúrico 0,75N. A solução foi homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos a 5.000 rpm e foi retirado 1,5 ml do sobrenadante para a próxima etapa.

Nesta etapa foram adicionados ao sobrenadante 0,3 ml de hidróxido de sódio 0,75N e 0,3 ml de ácido pícrico 0,0036M. Foi realizada a

homogeneização e após 20 minutos em temperatura ambiente realizou-se a leitura em espectrofotômetro de absorvância em 520nm.

Os resultados foram expressos em mg/dl.

#### ■ Dosagem de creatinina urinária

Para a dosagem de creatinina urinária foram utilizados 0,05 ml da amostra de urina diluída em 5 ml de água destilada (diluição 1:100), acrescentando-se 1 ml de hidróxido de sódio a 0,75 N e 1 ml de ácido pícrico a 0,0036 M a solução. Após esta etapa, foram realizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a mensuração da creatinina plasmática.

O Clearance de creatinina foi calculado por meio da seguinte fórmula:

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

Os valores do Clcr foram expressos em ml/min

#### **3.2.3 Avaliação da função tubular: fração de excreção de sódio e de potássio**

A fração excretada de sódio (FENa) e a fração excretada de potássio (FEK) consistem na porcentagem de sódio e potássio filtrado excretadas na urina. Correspondem à quantidade desses íons que o rim está ativamente reabsorvendo sódio e potássio e determinam quantitativamente os íons de sódio e potássio presentes no soro e na urina.

Na LRA pré-renal o rim está hipoperfundido, portanto, ocorre reabsorção ativa de sódio e a FENa é freqüentemente menor que 1%, enquanto que concentração de sódio na urina, geralmente é menor que 20 mEq/l. Ao contrário, quando há lesão do parênquima ou LRA pós renal, a FENa está usualmente maior que 3% e a concentração de sódio na urina maior que 40 mEq/l (Costa, Neto-Vieira, Neto, 1996)

A FENA e a FEK foram avaliadas por meio de fotometria de chama (CELM -FC 280), utilizando-se a solução padrão 140Mmol/L de Na e 5,0 Mmol/L de K e 3,0 Mmol/L lítio (CELM®).

A fórmula para cálculos foi:

$$FE = \frac{\text{Clearance da substância}}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

### 3.2.4 Método FOX para peróxidos urinários

O método de FOX consiste na determinação dos níveis de peróxido por meio do método ferro-xilenol orange (XO). Os peróxidos orgânicos são um dos primeiros produtos semi-estáveis da interação entre radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio no sistema biológico. Os peróxidos são considerados como potenciais indicadores na formação e ou resultantes das moléculas reativas (Gay et al., 1999).

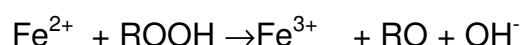
O método FOX é feito para leitura por espectrofotometria, onde xilenol laranja [ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3'' – bis (metilamino) ácido diacético]



apresenta alta seletividade com íon  $\text{Fe}^{3+}$  produzindo uma coloração azul-arroxeadado ( $\alpha=4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Wolff, 1994).

O FOX-2 é usado para determinação de níveis de peróxidos presentes na fase lipídica como as lipoproteínas, membranas e lipídes. Na versão FOX foi utilizado o Butylated Hydroxitolune (BHT) e o metanol para análise dos hidroperóxidos (Wolff, 1994).

Os peróxidos oxidam os íons  $\text{Fe}^{2+}$  para íons  $\text{Fe}^{3+}$  quando diluídos em solução ácida como descrita na reação abaixo:



A solução FOX-2 foi preparada em diluição de 90 ml de metanol e 10 ml de água biodestilada e acrescentada à solução: 100 $\mu\text{M}$  XO (Xilylenol orange- Sigma; St Louis, USA), 4 mM BHT (BHT – Butylated Hydroxytolune – Sigma, St Louis, USA), 25 $\mu\text{M}$  da solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e 250  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso de amônio (Sulfato Ferroso de Amônio ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) – Vetec Química – RJ, Brasil).

Na etapa seguinte, em 900 $\mu\text{l}$  da solução FOX -2 foram acrescentados 100 $\mu\text{l}$  da amostra de urina fresca. A solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente. A solução foi centrifugada por 10 minutos para a retirada de resíduos e após foi mantida em gelo por aproximadamente 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em absorvância de 560 nm, após a retirada de

resíduos de proteínas ou outros materiais através da centrifugação (Wolf, 1994; Long et al., 1999).

Os valores foram calculados pelo coeficiente para peróxido de hidrogênio de  $4,3 \times 10$  Mcm (Wolf, 1994) e estabilizados para grama de creatinina urinária (Halliwell et al., 2004).

### **3.2.5 Dosagem de TBARS (substância reativas com ácido tiobarbitúrico) na urina**

O MDA é um dos aldeídos freqüentemente analisados em métodos analíticos quantitativos e qualitativos para determinação dos índices de peroxidação lipídica. O MDA é um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica e pode ser detectado por vários métodos dentre eles por meio da luz ultravioleta em sistema de cromoterapia de alta pressão (HPLC) e também com o do uso do ácido tiobarbitúrico ao qual reage com várias substâncias dentre elas o MDA (TBARS) (Lima, Abdalla, 2001).

A dosagem de TBARS na urina consiste na adição de 0,4 ml da amostra de urina com 0,6 ml de H<sub>2</sub>O. Foram acrescentados nessa diluição 1,0 ml de TCA 17,5% e 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2), sendo que todos os tubos de ensaio com a solução foram mantidos no gelo durante essa primeira etapa do processo. A solução foi homogeneizada e depois colocada em água fervente (banho Maria) durante 20 minutos para reação com ácido tiobarbitúrico.

Na etapa seguinte a solução foi retirada do banho-maria, resfriada em gelo e adicionado 1,0 ml de TCA 70%. A solução foi homogenizada e incubada durante 20 minutos com o tubo de ensaio tampado. Ao final, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 r.p.m e a leitura foi realizada em espectrofotometria em absorvância de 534 nm (Walker, Shah, 1990).

$$\frac{\text{Abs} \times 10 \times \text{ml de urina/24h}}{0,156} = n \text{ moles de TBARS/24h}$$

A quantidade de MDA apresentado em nanomoles foi calculada usando coeficiente de extinção molar  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.6 Análise histológica e morfométrica

A técnica utilizada para análise histológica dos rins foi a hematoxilina-eosina (HE). Esse procedimento consistiu em corar o tecido para que se formassem ligações salinas com radicais ionizáveis presentes nos tecidos e facilitasse, desta forma, a visualização das estruturas presentes no mesmo (Junqueira, 1990).

O rim foi isolado imediatamente após sacrifício do animal, 4 Mm de espessura foram seccionados, colocados em solução Metacarn (120 ml de metanol 60%, 60 ml de clorofórmio 30%, ácido acético glacial 10%) por 24 horas e depois mantidos em álcool 70%.

Os cortes de 4 Mm de espessura do tecido renal obtidos dos animais controles e experimentais foram corados HE para a análise do

comprometimento túbulo-intersticial, avaliando-se também a área relativa do córtex desses animais.

Foram realizados estudos de morfometria para avaliação da expansão da área intersticial. As imagens obtidas pela microscopia óptica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (Leica-Qwin, Alemanha). Foram analisados 20 campos de cada animal medindo  $37.000\text{Mm}^2$  e foi avaliada a fração percentual do córtex ocupada pelo interstício. Em seguida foi determinada a porcentagem da área intersticial em relação a cada campo, excluindo-se os glomérulos (Baroni et al., 2000).

### **3.3 Local**

Os estudos de função renal foram realizados no laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Investigação Médica (LIM 12) da Faculdade de Medicina da USP.

Os estudos de histologia e morfometria foram realizados no Laboratório de Emergência Clínica (LIM 51) da Faculdade de Medicina da USP.

A mensuração da CK foi realizada no Laboratório da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP.

### 3.4 Análise estatística

Utilizou-se o método GLM (Anova univariada) que representa um procedimento estatístico que incorpora variáveis dependentes normalmente distribuídas e variáveis independentes categóricas ou contínuas. Para se verificar quais grupos diferiam entre si ou não, foram empregados os testes múltiplos de comparação 2 a 2 de Bonferroni ajustado.

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão (SEM). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Creatina-quinase

**Tabela 1:** Resultados referentes aos valores da creatina-quinase dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007.

Grupos	n	Creatina-quinase (U/L)
Salina	5	466±105
Glicerol	7	1127±89 <sup>▲</sup>
<i>Vitis vinifera</i>	5	460±105
Glicerol + <i>Vitis vinifera</i>	5	932±105 <sup>□•</sup>

<sup>▲</sup> p < 0,001 vs Salina

<sup>□</sup> p < 0,03 vs Salina

<sup>•</sup> p < 0,03 vs *Vitis vinifera*

Os dados representam médias ± erro padrão (SEM).

Na tabela 1 estão representados os valores de CK que consiste no método de confirmação da lesão muscular pelo glicerol.

O grupo Glicerol apresentou resultados que foram considerados referência de lesão muscular neste estudo para este parâmetro (1127±89), enquanto que o grupo Salina apresentou resultados tomados como normalidade (466±105).

O grupo Glicerol + *Vitis vinifera* quando comparado ao grupo Glicerol mostrou discreta redução desse parâmetro, sugerindo que a lesão muscular, mesmo que atenuada pela *Vitis vinifera*, foi mantida.

## 4.2 Função renal

**Tabela 2:** Resultados referentes à função renal global dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis Vinifera*. São Paulo. 2007.

Grupos	n	Peso (gramas)	Fluxo urinário (ml/min)	Clcr / 100 g (ml/min)
Salina	6	270±6	0,007±0,003	0,65±0,03
Glicerol	8	275±6	0,020±0,002 <sup>□▪</sup>	0,20±0,02 <sup>▲</sup>
<i>Vitis vinifera</i>	5	284±7	0,007±0,003	0,57±0,03
Glicerol+ <i>Vitis vinifera</i>	8	307±6 <sup>▲♦</sup>	0,015±0,002	0,51±0,02 <sup>□◇</sup>

<sup>▲</sup> p < 0,001 vs Salina

<sup>□</sup> p < 0,005 vs Salina

<sup>◇</sup> p < 0,001 vs Glicerol

<sup>♦</sup> p < 0,003 vs Glicerol

<sup>▪</sup> p < 0,01 vs *Vitis vinifera*

Os dados representam médias ± erro padrão (SEM).

A tabela 2 mostra diferença significativa de peso nos animais do grupo Glicerol + *Vitis vinifera* quando comparado aos demais. Ressalte-se que esses animais já apresentaram diferença do peso desde o início do protocolo, não podendo a diferença corporal ser atribuída aos tratamentos instituídos.

Quanto ao fluxo urinário, observou-se elevação significativa desse parâmetro no grupo Glicerol quando comparado ao grupo Salina. A elevação no fluxo também ocorreu no grupo Glicerol + *Vitis vinifera*, porém, quando esse foi comparado com seu controle não se constatou diferença significativa. Esse achado pode estar relacionado ao aumento voluntário da ingestão hídrica dos animais Glicerol (Glicerol 56±20,05 vs Salina 36±11 ml/24hs de água por rato).



O grupo Salina apresentou valores do Clcr que possibilitaram sua utilização como parâmetros de normalidade. O grupo *Vitis vinifera*, utilizado como grupo controle de tratamento não mostrou variabilidade significativa quanto à FR e foi adotado como controle para o grupo Glicerol + *Vitis vinifera*.

A administração de glicerol 50% i.m reproduziu o modelo de LRA por rabdomiólise, resultando na redução significativa do Clcr quando comparado ao grupo Salina (Glicerol  $0,20 \pm 0,002$  vs Salina  $0,65 \pm 0,003$ ). A LRA não oligúrica esteve então presente.

O tratamento prévio com *Vitis vinifera* determinou proteção funcional renal significativa nos animais que receberam glicerol ( $0,51 \pm 0,02$  vs  $0,20 \pm 0,02$ ), tendo restituído valores de Clcr similares ao grupo *Vitis vinifera* e muito próximas do grupo salina.

### 4.3 Função tubular: FENa e FEK

**Tabela 3:** Resultados referentes à função tubular [fração de excreção de sódio (FENa) e fração de excreção de potássio (FEK)] dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007.

Grupos	n	FENa (%)	n	FEK (%)
Salina	5	0,61±0,41	5	27±22
Glicerol	7	4,50±0,35 <sup>▲</sup>	5	258±20 <sup>▲</sup>
<i>Vitis vinifera</i>	5	0,89±0,41	5	60±22
Glicerol + <i>Vitis vinifera</i>	6	3,20±0,38 <sup>▲•</sup>	8	112±17 <sup>◊◻</sup>

<sup>▲</sup> p < 0,001 vs Salina

<sup>•</sup> p < 0,003 vs *Vitis vinifera*

<sup>◊</sup> p < 0,001 vs Glicerol

<sup>◻</sup> p < 0,03 vs Salina

Os dados representam médias ± erro padrão (SEM).

A tabela 3 mostra que o grupo Glicerol teve elevação significativa da FENa quando comparado ao grupo Salina. Essa alteração pode representar lesão tubular por rabdomiólise (4,05±0,35 vs 0,61±0,41).

O grupo Glicerol+ *Vitis vinifera* demonstrou valores de FENa semelhantes aqueles apresentados pelo grupo Glicerol. Ambos grupos tratados com Glicerol tiveram FENa significativamente mais elevada do que seus grupos controles. A *Vitis vinifera* reduziu a alteração na excreção tubular de sódio induzida pelo glicerol, porém essa diferença não foi estatisticamente significante.

Com relação a FEK, observou-se elevação significativa desse parâmetro no grupo Glicerol quando comparado ao grupo Salina (p<0,001).

O grupo Glicerol + *Vitis vinifera* demonstrou redução significativa da FEK quando comparado ao grupo Glicerol, porém, à semelhança do que foi

observado para o parâmetro FENa, o tratamento com *Vitis vinifera* não corrigiu integralmente a FEK do grupo com LRA induzida.

#### 4.4 Peróxidos urinários

**Tabela 4:** Resultados referentes aos valores de peróxidos urinários dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007.

Grupos	n	Peróxidos urinários (nmol/g de creatinina)
Salina	5	4,2±0,4
Glicerol	8	20,0±0,8 <sup>▲</sup>
<i>Vitis vinifera</i>	5	7,1±0,4
Glicerol + <i>Vitis vinifera</i>	5	14,9±1,0 <sup>▲Δ°</sup>

<sup>▲</sup> p < 0,001 vs Salina

<sup>Δ</sup> p < 0,001 vs *Vitis vinifera*

<sup>°</sup> p < 0,004 vs Glicerol

Os valores representam médias ± erro padrão (SEM).

Conforme apresentado na tabela 4, o grupo Salina apresentou resultados de excreção de peróxidos urinários considerados como valores de referência de normalidade neste estudo para este parâmetro (4,2±0,4).

O grupo Glicerol quando comparado ao grupo Salina apresentou elevação estatisticamente significativa na excreção de peróxidos urinários (20,0±0,8 vs 4,2±0,4).

O grupo Glicerol+ *Vitis vinifera* quando comparado ao grupo Glicerol apresentou redução significativa dos peróxidos urinários (14,9±1,0 vs 20,0±0,8), porém, apesar da visível melhora, os resultados não se igualaram aqueles expressos para o grupo *Vitis vinifera* (14,9±1,0 vs 7,1±0,4).

#### 4.5 MDA (TBARS) urinário

**Tabela 5:** Resultados referentes aos valores de malondaldeído urinário dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis vinifera*. São Paulo. 2007.

Grupos	n	MDA
		(nmol de TBARS urinários / 24 h)
Salina	7	149,6±24,0
Glicerol	8	380,9±22,4 <sup>▲</sup>
<i>Vitis vinifera</i>	5	126,4±28,3
Glicerol + <i>Vitis vinifera</i>	7	233,0±24,0 <sup>◇</sup>

<sup>▲</sup> p < 0,001 vs Salina

<sup>◇</sup> p < 0,001 vs Glicerol

Os valores representam médias ± erro padrão (SEM).

A tabela 5 mostra que o grupo Glicerol apresentou maiores níveis de MDA quando comparados aos do grupo Salina (380,9±22,4 vs 149,6; p<0,001).

O grupo Glicerol + *Vitis vinifera* apresentou redução dos níveis de MDA quando comparado ao grupo Glicerol (233±24,0 vs 380±22,4). Foi identificado também que não houve significância estatística entre esse e os demais grupos controle, sublinhando a ação antioxidante do fitoterápico testado.

#### 4.6 Histologia e morfometria renal

**Tabela 6:** Resultados referentes aos valores de morfometria realizada no tecido renal dos grupos: Salina, Glicerol, *Vitis vinifera* e Glicerol + *Vitis Vinifera*. São Paulo. 2007.

Grupos	n	Morfometria (área intersticial relativa %)
Salina	5	6,65±1,40
Glicerol	7	14,80±1,19 <sup>▲</sup>
<i>Vitis vinifera</i>	5	8,24±1,40
Glicerol + <i>Vitis vinifera</i>	7	8,90±1,19 <sup>◊</sup>

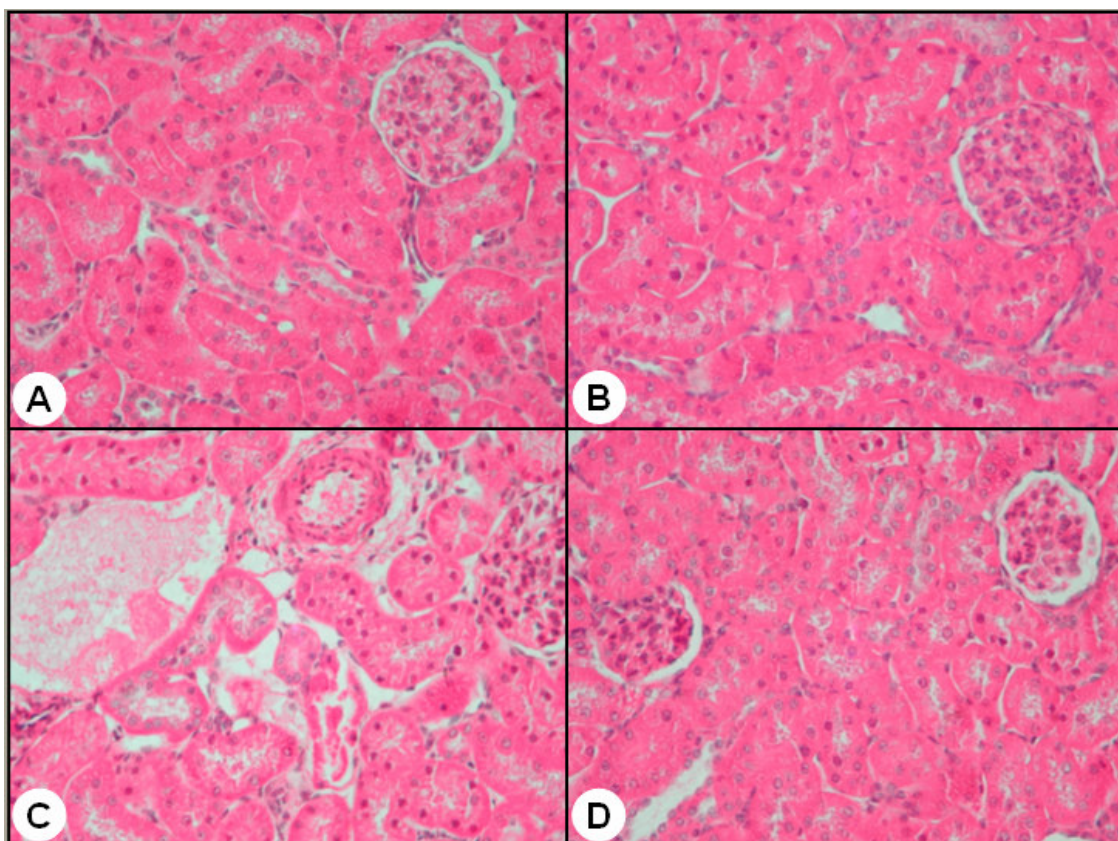
<sup>▲</sup> p < 0,002 vs Salina

<sup>◊</sup> p < 0,01 vs Glicerol

Os dados representam médias ± erro padrão (SEM).

O grupo Glicerol apresentou elevação significativa dos valores de morfometria quando comparado ao grupo Salina, que representa expansão da área intersticial renal do grupo Glicerol (14,8±1,19 vs 6,65±1,40; p<0,001).

O grupo glicerol + *vitis vinifera* apresentou melhora nos parâmetros morfométricos quando comparado ao grupo glicerol. Esses valores assemelharam-se aos grupos Salina e *Vitis vinifera* (Figura 2).



**Figura 2:** Cortes histológicos dos rins de ratos corados com Hematoxilina e eosina. (A) grupo Salina, (B) grupo *Vitis vinifera*, (C) grupo Glicerol e (D) grupo Glicerol + *Vitis vinifera*. Aumento de x 280.

A figura 2 ilustra os resultados quantitativos demonstrados na tabela 6 onde é possível observar as alterações da área intersticial renal de acordo com os tratamentos instituídos.





## 5. DISCUSSÃO

A LRA é a complicação mais importante que pode ocorrer no curso da rabdomiólise, consistindo em problema clínico de importância epidemiológica, pois a rabdomiólise não traumática compreende de 5 a 7% de todos os casos de LRA e 25% de todos os casos de NTA, porém a prevalência de LRA em pacientes com rabdomiólise varia entre 17% e 33% (Vanholder et al., 2000).

A fisiopatologia da mioglobínúria induzida pela administração intramuscular de glicerol 50% constitui-se em modelo clássico de LRA experimental. A destruição muscular causada com administração do glicerol leva a miólise que está relacionada à deterioração da função e estrutura renal. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta síndrome são: obstrução tubular, vasoconstrição renal e estresse oxidativo (Ferraz et al, 2002; Funez et al., 2003; Singh, Chander, Chopra, 2003; Zager, 1996).

Dentre as várias ações deletérias da mioglobina envolvidas no processo da lesão renal por rabdomiólise, sabe-se que a liberação de ferro dos estoques celulares estimula a conversão de  $H_2O_2$  em  $OH\cdot$  gerando maior quantidade do radical hidroxila e conseqüentemente intensificando a peroxidação lipídica (Paller, 1988; Nath, 1992).

Atualmente, as causas de LRA por rabdomiólise são variadas, destacando-se o aumento do número de desastres por terremotos que freqüentemente desencadeiam lesão do tipo dialítica. Mais recentemente, outras categorias de rabdomiólise têm sido citadas, dentre elas a síndrome

compartimental glútea após cirurgia bariátrica, o exercício físico abusivo em maratonas, o uso de altas doses de estatina e a prolongada sedação com propofol (Benevides et al., 2006; Clarkson et al., 2007; Sabsovich et al., 2007; Schech et al., 2007).

É importante ressaltar que a enzima CK está presente na musculatura estriada, portanto na lesão muscular, ela é liberada para a circulação. O diagnóstico da rabdomiólise é realizado por avaliação clínica e é confirmado bioquimicamente por meio da determinação dos níveis séricos de CK, sendo esse considerado o marcador enzimático mais sensível de lesão muscular (Vanholder et al., 2000). Os níveis de CK altamente elevados após 24 horas da administração de glicerol 50% i.m neste estudo confirmaram a lesão muscular e o diagnóstico de rabdomiólise.

Os resultados deste estudo reiteraram a exatidão do modelo glicerol em induzir LRA mioglobinúrica uma vez que mostraram que a administração de glicerol 50% em ratos desencadeou redução da função renal representada pela diminuição dos níveis do Clcr, manutenção do fluxo urinário e alterações da função tubular representadas pelo aumento dos níveis da FENa, FEK, conforme resultados exibidos.

Esse padrão de lesão já era esperado e foi descrito por estudos anteriores. Sabe-se que a rabdomiólise induz a liberação de heme que contribui para a lesão renal com efeito sobre a hemodinâmica glomerular e também sobre a fisiologia tubular.

Quanto ao primeiro evento fisiopatológico, tem sido demonstrado o efeito vasoconstritor da heme provavelmente mediado pela liberação de ferro da mioglobina promovendo a formação de EROs. As EROs contribuem para a formação de mediadores vasoativos que induzem vasoconstricção com diminuição do coeficiente de ultrafiltração e redução da taxa de filtração. Esse evento é também intensificado pelo seqüestro de NO que agrega vasoconstricção à microcirculação renal, piorando a lesão renal (Breziz, 1991; Paller, 1998; Sharma et al., 1987).

A disfunção tubular determinada pela heme está pautada na toxicidade direta daquele pigmento sobre a célula epitelial. Durante a mioglobinúria, a lesão tubular proximal é decorrente de dois fatores que apresentam papel crítico: lesão isquêmica mediada pela habilidade do pigmento heme em intensificar a vasoconstricção renal e o estresse oxidativo mediado pelas EROs.

O túbulo proximal é o segmento mais suscetível a efeitos tóxicos devido a maior reabsorção associada à intensa atividade metabólica com gasto energético e vulnerabilidade do sistema enzimático. Em condições normais, no túbulo proximal cerca de 65% da carga filtrada de sódio e potássio são reabsorvidos, porém, os locais mais importantes para a regulação da excreção de potássio são os túbulos distais e túbulos coletores. Nesses segmentos o potássio ou é reabsorvido ou é secretado, dependendo das necessidades do organismo (Brenner et al., 1998).

Na LRA instalada essa estabilidade funcional renal é comprometida resultando em alterações na resposta estrutural da célula tubular, como pode ser constatado neste estudo, considerando os resultados de redução da FR e comprometimento da função tubular expressada pelo aumento das FENa e FEK.

Os resultados referentes a homeostase dos íons sódio e potássio neste estudo foram avaliados pela fração de excreção. É importante destacar que a excreção de sódio pode ser regulada por alterações na filtração glomerular ou reabsorção tubular. Na vigência da LRA uma das conseqüências fisiológicas da lesão tubular consiste no desequilíbrio proteico da membrana basolateral em resposta à redução de ATP. Essa desorganização caracteriza-se pela translocação da bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  e contribui para a degeneração da função de reabsorção de sódio no túbulo proximal, resultando em aumento da FENa (Devarajan, 2006).

Já a excreção do potássio ocorre na porção final dos túbulos distais e túbulos coletores corticais e é diretamente estimulada pela concentração de potássio no líquido extracelular. A alta concentração de potássio no líquido extracelular leva ao aumento de sua excreção e é um dos mais importantes mecanismos de secreção e regulação de potássio extracelular, portanto, as alterações tubulares que ocorrem com a diminuição da filtração glomerular induzem ao aumento da FEK (Devarajan, 2006; Guyton, 1998).

Os resultados obtidos neste estudo com os altos níveis de FENa e FEK caracterizaram a LRA induzida por glicerol e confirmaram o comprometimento tubular em reabsorver estes íons.

Mediante a importância clínica da rabdomiólise, considerações terapêuticas têm sido estudadas exaustivamente com o intuito de reduzir suas complicações. Medidas renoprotetoras foram o tema do estudo em questão.

Estudos têm referendado o uso de fitoterápicos no tratamento e prevenção de doenças crônicas e estresse oxidativo (Watanabe et al., 2007). Neste contexto, o uso de agentes antioxidantes naturais contidos na dieta e em bebidas como o vinho tem merecido destaque pelas suas propriedades antioxidantes que além de seqüestrar radicais livres, quelam metais e modulam atividades enzimáticas em prol da inibição da peroxidação lipídica, presente em vários processos patológicos, como em questão a doença renal (Morillas-Ruiz, 2005; Puiggrós et al., 2005; Simonetti et al., 2002).

Muito se tem dito em favor da ingestão regular e controlada de vinho. Talvez o primeiro estudo científico demonstrando o efeito de modulação da função endotelial do vinho e dos produtos da uva vinífera seja o de Fitzpatrick et al., 1993. Esse estudo apresentou de forma pioneira que esses produtos demonstram efeito vasodilatador, provavelmente resultado de interferência benéfica sobre o endotélio vascular.

Há estudos que avançaram na tentativa de elucidação do efeito vasodilatador do vinho e observaram que a administração de agentes

viníferos está relacionada à produção aumentada de NO em indivíduos normais (Del'Agli, Busciala, Bosisio, 2004).

O efeito anti-hipertensivo de produtos obtidos de uvas viníferas já foi divulgado em estudo nacional, em que se demonstrou que também pode estar relacionado ao seu papel sobre a disfunção endotelial (Soares et al., 2002).

Citamos até o momento o papel vasodilatador e antiinflamatório dos agentes viníferos, ações essas com provável interface com sua ação antioxidante. O efeito antioxidante do vinho ainda pode estar associado à sua capacidade antiaterogênica.

Neste cenário, os flavonóides do vinho representam um grupo de plantas fenólicas que exercem ação antioxidante relevante. De todos os componentes presentes na *Vitis vinifera*, os compostos fenólicos, especialmente as proantocianidinas, têm despertado muito interesse em estudos clínicos e experimentais. As proantocianidinas são antioxidantes naturais encontradas no extrato da semente da uva.

Neste estudo, considerando a hipótese da *Vitis vinifera* apresentar propriedades antioxidantes com efeito renoprotetor, foi realizado um pré-tratamento com esse fitoterápico por 5 dias com dose diária de 3m/Kg /dia em ratos submetidos à lesão renal por glicerol. O tratamento sub-crônico com *Vitis Vinifera* antes do glicerol resultou em melhora significativa da FR. Esse achado foi acompanhado pela redução nas FENa e FEK, sendo que a primeira não estatisticamente significativa, apesar da tendência para

recuperação observada. Esse fato, a melhora das funções glomerular e tubular, pode estar relacionado ao efeito antioxidante constatado nos animais *Vitis vinifera* e discutido a seguir. A avaliação de sua ação antioxidante foi feita por meio das dosagens de peróxidos urinários, que são produtos primários da peroxidação lipídica e de MDA que realiza medida de produtos finais da peroxidação lipídica. Os resultados de ambos os métodos confirmaram a redução dos níveis da peroxidação lipídica, fortalecendo a hipótese relativa ao efeito antioxidante da *Vitis vinifera*. Esse achado complementou a experiência de melhora do Clcr após o mesmo tratamento.

Stefanovic et al., 2000 realizou estudo sobre o uso de proantocianidinas, em que ratos receberam glicerol 8ml/Kg via i.m e após 3 dias consecutivos receberam a suplementação de proantocianidinas 20mg/Kg e foram avaliados quanto à função renal (uréia e creatinina sérica), peroxidação lipídica (MDA) e à atividade enzimática da peptidase renal (aminopeptidase A, aminopeptidase N e dipeptidilpeptidase I). Os resultados demonstraram melhora da função renal, confirmada histologicamente, provavelmente associada à redução dos níveis de MDA e ao aumento da expressão da dipeptidilpeptidase IV com efetiva degradação do TNF $\alpha$ . Este estudo reiterou os achados descritos com dados relativos a outros produtos oxidativos.

Sabe-se que na vigência da LRA ocorrem várias alterações funcionais, que incluem distúrbios hidroeletrólíticos por alterações na reabsorção de sódio, secreção de potássio, reabsorção de água e

concentração urinária. Na presença da necrose muscular, a liberação de ácidos das células musculares envolvidas, leva ao aumento da acidose ânion gap. Adicionalmente, a hipóxia muscular libera ácido láctico para a circulação, intensificando a acidose e conseqüentemente desencadeando efeitos deletérios metabólicos como, por exemplo, a hipercalemia. Em pacientes com lesão muscular maciça, a quantidade de potássio liberada pode resultar em arritmias, necessitando de tratamento imediato (Chander, Chopra, 2000).

Rodrigo et al., 2004 em estudo experimental com ratos avaliou ação antioxidante da exposição crônica a flavonóides presentes na uva por meio da ingestão de vinho tinto (vinho tinto sem álcool, solução de etanol e água) por dez dias consecutivos. A rbdomiólise foi induzida por glicerol 50% (10ml/Kg via i.m). Os dados daquele estudo sugeriram que vinho exerceu efeito protetor da função, bioquímica e danos morfológicos causados pela rbdomiólise. Ressaltou também o sinergismo entre etanol e componentes não alcoólicos do vinho. É fato que o efeito vasodilatador transitório obtido pela administração do etanol pode ter contribuído para o resultado final do tratamento. A utilização do principio ativo sem aditivos alcoólicos neste estudo exclui essa variável e atribui os resultados exclusivamente às proantocianidinas das sementes da uva.

As alterações morfológicas envolvidas na LRA induzida por glicerol são achados importantes nessa lesão. As alterações mais comuns são o apagamento da borda em escova, dilatação tubular, infiltrado inflamatório,



presença de cilindros e áreas de regeneração celular. Ressalte-se que a necrose celular é incomum e quando presente é restrita região da medula externa. A apoptose pode ser encontrada em túbulos proximais e distais em ambas formas de lesão isquêmica ou nefrotóxica (Devarajan, 2006).

O estudo histopatológico dos rins dos ratos neste estudo foi realizado por meio da morfometria, cujo objetivo foi mensurar a expansão da área intersticial relativa. Os resultados mostraram alterações características da rabdomiólise no grupo que recebeu glicerol. Surpreendentemente, a análise das lâminas dos rins de animais que receberam o pré-tratamento com *Vitis vinifera* revelou melhora histológica significativa, que se confirmou pelos dados estatísticos relativos a morfometria. O tratamento com *Vitis vinifera* nos animais do grupo Glicerol praticamente restabeleceu o aspecto histológico dos rins controle.

Os dados aqui apresentados sumarizaram de forma privilegiada o padrão **lesão versus proteção** determinado por glicerol e *Vitis vinifera*.

A melhora da taxa de filtração glomerular e a atenuação da tubulopatia protagonizada pelo tratamento sub-crônico com a *Vitis vinifera* reiteraram seu efeito funcional também na lesão renal. A busca por dados mais precisos sobre esse mecanismo renoprotetor reverenciou o efeito antioxidante da *Vitis vinifera*, confirmando a redução da excreção de peróxidos urinários e MDA.

O efeito protetor da *Vitis vinifera* superou a otimização da FR e redução do desequilíbrio redox e confirmou-se de forma concreta também na melhora histológica, com função reparadora.

Assim, em linhas gerais, a *Vitis vinifera* referendou o efeito renoprotetor relacionado à antioxidação, com resposta histológica sublime. Estudos que avancem nessa investigação utilizando outros modelos de lesão em diferentes sujeitos, com provável aplicação clínica imediata, serão de grande valor para a melhor compreensão dos ramos de lesão e alternativas terapêuticas na rbdomiólise.



## 6. CONCLUSÕES

- A administração de glicerol 50% induziu LRA não oligúrica em ratos.
- O pré-condicionamento com *Vitis vinifera* mostrou melhora da função renal e função tubular dos animais tratados com glicerol.
- A administração de glicerol 50% elevou a excreção de peróxidos e malondealdeído urinários, enquanto que o pré-condicionamento com *Vitis vinifera* reduziu esses parâmetros, confirmando sua ação antioxidante.
- O glicerol determinou alteração na histologia renal, essas alterações estruturais significantes puderam ser prevenidas quando esses animais receberam o pré-tratamento com *Vitis vinifera*.



## REFERÊNCIAS

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski AA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000;148: 187-97.

Baliga R, Ueda N, Walker PD; Shah SV. Oxidant mechanism in toxic acute renal failure. *Am J Kid Dis* 1997; 29(3):465-77.

Baroni EA, Costa RS, Da Silva CGA & Coimbra TM. Heparin treatment reduces glomerular injury in rats with adriamycin-induced nephropathy but does not modify tubulointerstitial damage or the renal production of transforming growth factor-beta. *Nephron* 2000; 84:248-57.

Beethman R. Biochemical investigation of suspect rbdomyolysis. *Ann Clin Biochem* 2000; 37:581-87.

Benevides MI, Nochi RJJ. Rbdomiólise por síndrome compartimental glútea pós-cirurgia bariátrica. Relato de caso. *Rev. Bras Anesthesiol* 2006; 56(4): 408-12.

Berryc, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Diminiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 2000; 101:2206-12.

Blumenthal M, Goldeberg A, Brinchman J, Foste S. *Herbal Medicine, 2000. Integrative Medicine communications.*

Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993; 43(5)1160-78.

Brenner MA, Brady HR, Lieberthal W. Acute Renal Failure: Pathogenesis of renal Disease. In: *The Kidney* 1998; 28:1200-38.

Breziz M, Heynam VS, Dinour P, Epstein HF, Rosen S. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidney. *J Clin Invest* 1991; 88:390-5.

Clarkson P.M. Exertional rhabdomyolysis and acute renal failure in marathon runners. *Sports Med* 2007; 37(4-5):361-3.

Choudhury D, Raj DSC, Palmer BF, Levi M. Effect of aging on renal function and disease. In: BRENNER & RECTOR'S. *The Kidney* 2000; 52:2187-2252

Costa JAC, Neto-Vieira OM, Neto MM. Insuficiência renal aguda. *J Bras Nefrol* 1996; 18:56-8.

Del'Agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res* 2004; 63(4):593-602.

Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(6):1503-20.

Ferraz FF, Kos GA, Janino P, Homsí E. Effects of melatonin administration to rats with glycerol-induced acute renal failure. *Renal Failure* 2002; 24(6):735-46.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 1993; 265(2):H774-8.

Fúnez FA, Polo JF, Broseta L, Atienza PM, Mora A, Gascón GF. Evolution of total antioxidant status in a model of acute renal insufficiency in rats. *Renal Failure* 2003; 25(4):535-43.

Gay G, Collins J, Gebicki JM. Hydrogen peroxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem* 1999; 273(2):149-55.

Guyton AC. Contraction of skeletal muscle. In: Guyton AC, ed. *Textbooks of Medical Physiology*. 8ª ed. 1991; p. 67-79.

Guyton AC, Hall JE. Fisiologia humana e mecanismos das doenças. Guanabara Koogan; 1998; cap 5: 204-25.

Halliwell B, Long LH, 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.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 199:598-620.

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory medicine (IFCC) Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(6):635-42.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara; 1990 Métodos de estudo; cap.1:P.3-4.

Knochel J. Rhabdomyolysis and myoglobinuria. *Ann Rev Med* 1992; 33:435-43.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of pharmaceutical sciences* 2001; 37 (3):293-303.

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):605-9.

Morais AL, Costa SR, Gomes AU, Andrade VHC, Paiva PS. Alterações renais no envenenamento crotálico experimental (*crotalus durissus terrificus*): estudo funcional e anatomopatológico. *Rev Bras Med* 2003; 60(12):18-22.

Morillas-Ruiz JM, Garcia VJA, López FJ, Guevara-Vidal ML, Zafrilla P. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. *Clinical Nutrition* 2006; 25:444-53.



Nath AK, Balla G, Vercellotti MG, Balla J, Jacob SH, Levitt DM, Rosenberg EM. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 1992; 90:267-70.

Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical & medicine* 2001;131(11): 1287-1312.

Paller MS. Hemoglobin and myoglobin induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1988; 255: 539-44.

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.

Rice-Evans CA, Millern J, Paganda G. Structure-antioxidant activity relationships of flavanoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 933-56.

Rodrigo R, Gonzalo R. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical & Medicine* 2002; 33(3):409-22.

Rodrigo R, Cleofina B, Patricia H, Gonzalo R. Amelioration of myoglobinuric renal damage in rats by chronic exposure to flavanol-rich red wine. *Nephrol Dial Transp* 2004; 19:2237-44.

Rovin BH, Phan LT. Chemotatic factors and renal inflammation. *Am J Kidney Dis* 1998; 31:1065-84.

Sabsovich I, Rehman Z, Yunen J, Coritsidis G. Propofol infusion syndrome: a case of increasing morbidity with traumatic brain injury. *Am J Crit Care* 2007; 16(1):82-5.

Salah N, Miller NJ, Paganda G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Envans C. Polyphenolic flavonols as scavenger of aqueous phase radicals and chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1995; 322:339-46.

Schech S, Graham D, Staffa J, Andrade SE, LA Grenade L, Burgess M, Blough D, Stergachis A, Chan KA, Platt R, Shatin D. Risk factors for statin-associated rhabdomyolysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007; 16(3):352-8.

Sharma SV, Taylor TJ, Gardener R. Reaction of nitric oxide with heme protein and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 1987; 26:3837-43.

Shimizu MHM, Araújo M, Boges SMM, Tolosa EMC, Seguro AC. Influence of age and vitamin E on post-ischemic acute renal failure. *Experimental gerontology* 2004; 39:825-30.

Simonetti P, Ciampelano S, Gardana C, Bramati L, Pieta P. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress *J Agric Food Chem* 2002; 50(21):6217-21.

Singh D, Chander V, Chopra K. Carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidant properties, protects against glycerol-induced acute renal failure. *Am J Nephrology* 2003; 23:415-21.

Singh D, Chander V, Chopra K. Rhabdomyolysis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2005; 27(1):39-40.

Stefanovic V, Vojin S, Predrag V, Tatjana C, Najman S, Marina MZ. Reversal of experimental myoglobinuric acute renal failure with bioflavonoids from seeds of grape. *Renal Failure* 2000; 22(3):255-66.

Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a *vinifera* grape skin extract. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(11):1515-20.

Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107:7-11.

Vanholder R, Sever MS, Ereke E, Lamiere N. Rhabdomyolysis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1553-61.

Watanabe M, Neiva LBM, Santos CXC, Laurindo FRM, Vattimo MFF. Isoflavone and heme oxygenase system in ischemic acute kidney injury in rats. *Food Chem Toxicol* (2007), doi:10.1016/J.Ft.2007.06.013.

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

Wolf SP. Ferrous ions oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for mensurament of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1994; 233: 182-9.

Zager AR. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int* 1996; 49:314-26.

Zager AR, Glomelen LM. Pathogenic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failiure. *Am J Physiol* 1989; 256:446-55.