

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM

FÁBIO DOS SANTOS SCHLOTTFELDT

**EFEITO PROTETOR DA DIOSMINA E HESPERIDINA NA
NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ANFOTERICINA B**

SÃO PAULO

2014

FÁBIO DOS SANTOS SCHLOTTFELDT

**EFEITO PROTETOR DA DIOSMINA E HESPERIDINA NA
NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ANFOTERICINA B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Enfermagem na Saúde do Adulto

Linha de pesquisa:

Tecnologia na Saúde do Adulto

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Maria de Fatima Fernandes Vattimo

São Paulo

2014

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

Assinatura: _____ Data: __/__/____

Catálogo na Publicação (CIP)

Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”

Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Schlottfeldt, Fábio dos Santos

Efeito protetor da diosmina e hesperidina na nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B / Fábio dos Santos Schlottfeldt. -- São Paulo, 2014.

60 p.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fatima Fernandes Vattimo
Área de concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

1. Estresse oxidativo 2. Rim - lesões I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fábio dos Santos Schlottfeldt

Título: **Efeito protetor da diosmina e hesperidina na nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Denise e Samuel pelo apoio e por compreenderem minha ausência.

Meus pais, Délcio e Loraine por incentivarem desde as primeiras letras.

Ao meu irmão César por se fazer presente, mesmo distante.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Profª Drª Maria de Fátima Fernandes Vattimo que compartilhou seu conhecimento, possibilitando a conclusão deste trabalho.

Às pesquisadoras Drª Mirian Watanabe e Drª Cassiane Dezoti. da Fonseca pelo apoio em todas as etapas do trabalho em especial na etapa final.

Meus amigos do Grupo de Estudo em Lesão Renal Aguda (GERA), pelo apoio e convívio diário no Laboratório.

Sra Neusa Silva pela companhia nas manhãs na Escola de Enfermagem.

Muito Obrigado!

Schlottfeldt FS. Efeito protetor da diosmina e hesperidina na nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B. [dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2014.

RESUMO

A lesão renal aguda LRA induzida pela anfotericina B (Anf-B), um antibiótico poliênico isolado do actinomiceto *Streptomyces nodus*, ocorre após alguns dias do início da terapia medicamentosa. Os sinais clínicos característicos são acidose, hipocalcemia, depleção de magnésio, sódio e poliúria, resultantes da vasoconstrição renal com redução do fluxo sanguíneo renal (FSR), da taxa de filtração glomerular (TFG) e toxicidade direta nas células epiteliais tubulares com geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A diosmina e hesperidina (DH) são flavonoides com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Esse estudo investigou a ação renoprotetora do pré-condicionamento com diosmina e hesperidina em ratos submetidos à toxicidade renal pela Anf-B. Foram utilizados ratos Wistar, adultos e machos distribuídos nos grupos: Salina (controle, 3ml/kg de solução fisiológica 0,9%, salina, intraperitoneal-i.p., uma vez ao dia, cinco dias); DH (50mg/kg de DH na água de bebedouro, dez dias); Anf-B (15mg/kg, i.p. uma vez ao dia, cinco dias); Anf-B+DH (pré-medicação com a solução de DH em água de bebedouro dez dias e a partir do sexto dia do protocolo, Anf-B, 1 vez dia, i.p., 5 dias.). Foram avaliadas a função renal função renal (*clearance* de creatinina-Clcr, método de Jaffé), as frações de excreção de sódio, potássio e magnésio-FENa, K por meio do método de eletrodo íon seletivos e Mg por Mg por método colorimétrico a lesão oxidativa (peróxidos-PU, FOX-2 e substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico-TBARS urinários). O tratamento com Anf-B resultou em quadro de lesão renal aguda com redução do Clcr, elevação do fluxo urinário, da FENa, da FEK e da FEMg, com elevação de PU e TBARs urinários. O pré-condicionamento com DH demonstrou efeito renoprotetor por meio da elevação do Clcr e redução das FENa, FEMg e FEK, além de demonstrar proteção antioxidante confirmada pela redução de metabólitos oxidativos.

Palavras Chave: Anfotericina B, Lesão Renal Aguda, Estresse Oxidativo, nefrotoxicidade, diosmina, hesperidina.

Schlottfeldt FS. Protective effect of diosmin and hesperidin in nephrototoxicity by amphotericin B. [dissertation]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2014.

ABSTRACT

The acute kidney injury (AKI) induced by amphotericin B (Amp-B), an antibiotic polyenic group isolated of the actinomycete *Streptomyces nodus*, occurs after some days of the beginning of drug therapy. Clinical manifestations include acidosis, hypokalemia, magnesium and sodium wasting and polyuria, resulting from renal vasoconstriction with decrease in blood flow, glomerular filtration rate (GFR) and direct toxicity in tubular cells with liberating reactive oxygen species (ROS). Diosmin and hesperidin (DH) are flavonoids with antioxidant and antiinflammatory properties. This study investigated the renoprotective effect of DH in rats submitted to the toxicity by Amp-B. Adult male wistar rats were used and divided in the following groups: Saline (control, 3ml/kg of NaCl 0,9% intraperitoneal (i.p.), once a day, for 5 days); DH (50mg/kg in drinking water, 10 days); Amp-B (15mg/kg, i.p., once a day, 5 days); Amp-B+DH (DH in drinking water, 10 days, from the sixth day, 15mg/kg of Amp-B, i.p., 5 days). Renal function (creatinine clearance-crCl, Jaffé method), sodium, potassium and magnesium excretion fraction, (FENa, FEK,) through selective ion method and FEMg by colorimetric method, oxidative injury (urinary peroxides-FOX-2, thiobarbituric acid reactive substances-TBARS) were evaluated. Amp-B induced AKI with reduction in crCl and increment in FENa, FEK, FEMg, UP and TBARS. The pre-treatment with DH confirmed a renoprotective effect through by increasing GFR and decreasing FENa, FEK, FEMg. In addition, the antioxidant protection was confirmed by reduction of oxidative metabolites by DH.

Keywords: Amphotericin B , Acute Kidney Injury, Oxidative Stress, nephrotoxicity, diosmina, hesperidin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo de água dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina.....	33
Tabela 2 – Função renal global dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina.....	34
Tabela 3 - Fração de excreção de sódio dos grupos dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina.....	36
Tabela 4 - Fração de excreção de potássio dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina.....	37
Tabela 5 - Fração de excreção de Magnésio dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina.....	38
Tabela 6 - Peróxidos urinários dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina.....	39
Tabela 7 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico urinário dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Anf-B	anfotericina B
Anf-B+DH	Anfotericina B + Diosmina Hesperidina
BHT	2 [6]-di-ter-bu-til-p-cresol
Clcr	<i>clearance</i> de creatinina
CrS	creatinina sérica
CrU	creatinina urinária
DH	Diosmina Hesperidina
ET-1	endotelina-1
EROs	espécies reativas de oxigênio
FEK	fração de excreção de potássio
FEMg	fração de excreção de magnésio
FENa	fração de excreção de sódio
FOX-2	xilenol laranja versão-2
FSR	fluxo sanguíneo renal
FU	fluxo urinário
HAD	hormônio antidiurético
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ICAM-1	moléculas de adesão intercelular
IFIs	infecções fúngicas invasivas
IL	interleucinas
ip	intraperitoneal
KIM-1	<i>kidney molecule-1</i>
LRA	lesão renal aguda
NAC	N-acetilcisteína
NO	óxido nítrico
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OH ⁻	radical hidroxila
PGE ₂	prostaglandina E ₂

PKA	proteína quinase A
SOD	superóxido dismutase
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TFG	taxa de filtração glomerular
TNF- α	fator de necrose tumoral
UTI	unidade de terapia intensiva
VCAM	moléculas de adesão vascular

LISTA DE SIGLAS

COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EEUSP	Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
ICB-USP	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo
FSP-USP	Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo
LEMA	Laboratório Experimental de Modelos Animais

LISTA DE SIGLAS

cm	Centímetro
dl	Decilitro
g	Gramas
kg	Quilograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
M	Molar
n	número de animais estudados
nmol	Nanomolar
p	nível de significância
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAIS.....	24
3.1.1 Comitê de ética em uso de animais.....	24
3.1.2 Animais.....	24
3.2 PROCEDIMENTOS.....	25
3.2.1 Modelo de LRA nefrotóxica.....	25
3.2.2 Administração de diosmina/hesperidina.....	25
3.2.3 Grupos experimentais.....	26
3.2.4 Gaiolas metabólicas.....	26
3.2.5 Coleta de sangue total.....	27
3.3 MÉTODOS.....	28
3.3.1 Função renal.....	28
3.3.1.1 <i>Clearance</i> de creatinina.....	28
3.3.1.2 Fração de excreção de sódio.....	28
3.3.1.3 Fração de excreção de potássio.....	29
3.3.1.4 Fração de excreção de magnésio.....	29
3.3.2 Metabólitos oxidativos.....	29
3.3.2.1 Peróxidos urinários.....	29
3.4.2.3 Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico urinário..	30
3.5 LOCAL.....	31
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4 RESULTADOS	33
4.1 CONSUMO DE ÁGUA.....	33
4.2 FUNÇÃO RENAL.....	34
4.2.1 <i>Clearance</i> de creatinina.....	34
4.2.2 Fração de excreção de sódio.....	36
4.2.3 Fração de excreção de potássio.....	37
4.2.4 Fração de excreção de magnésio.....	38
4.3 METABÓLITOS OXIDATIVOS.....	39
4.3.1 Peróxidos urinários.....	39
4.3.2 Dosagem de TBARS urinário.....	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Múltiplos agentes farmacológicos são utilizados para assistência, tratamento e diagnóstico de pacientes hospitalizados. A administração desses fármacos de forma isolada ou em associação apresenta grande potencial para indução ou manutenção da lesão renal. Estudo epidemiológico multicêntrico demonstrou que os agentes nefrotóxicos foram responsáveis por 19 a 25% dos casos de lesão renal aguda (LRA) em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI)⁽¹⁾.

Entre os fármacos com potencial nefrotóxico destacam-se os agentes antimicrobianos, os quimioterápicos, os analgésicos e os imunossupressores. Somam-se a essa lista os agentes diagnósticos como os radiocontrastes iodados e o gadolínio quando administrados em alta dosagem^(2,3).

Neste cenário destaca-se a anfotericina B (Anf-B), um antibiótico poliênico, antifúngico, isolado do actinomiceto *Streptomyces nodus* coletado pela primeira vez em solo da região do rio Orinoco, na Venezuela no ano de 1955. A estrutura química da Anf-B é composta por duas porções, uma hidrofílica representada por uma cadeia polihidroxílica isolada e outra lipofílica caracterizada pela cadeia de carbonos poliênicos que são responsáveis pelo seu mecanismo de ação⁽⁴⁾. A ação terapêutica da Anf-B resulta da formação de poros na membrana fúngica pela interação da porção hidrofóbica da ANB com os complexos de ergosterol (esterol presente nos fungos). Os poros formados aumentam a permeabilidade celular a prótons e cátions monovalentes, despolarizando a membrana, com consequente perda de conteúdo citoplasmático, lise e morte celular⁽⁵⁾.

A Anf-B é o medicamento de escolha para pacientes críticos com função renal normal que apresentam fungemia, especialmente a candidemia, pela ação de amplo espectro e baixo custo⁽⁶⁾. Por outro lado, a terapia deve ser cuidadosamente monitorada devido à incidência de efeitos adversos como a nefrotoxicidade, considerando que a Anf-B é principalmente excretada pelos rins^(2,3).

Os rins apresentam alta vulnerabilidade à ação de drogas, uma vez que 25% do débito cardíaco se destina ao suprimento do FSR. Esse fluxo favorece a alta

concentração de toxinas no interstício renal e é um dos determinantes da vulnerabilidade renal à toxinas⁽²⁾. O uso indiscriminado da Anf-B resulta em efeito adverso dose-dependente que acomete cerca de 80% dos pacientes internados com infecções fúngicas sistêmicas e pode levar 15% dos pacientes a terapia de substituição renal (diálise), aumentando o tempo de internação hospitalar e os índices de mortalidade⁽⁷⁾.

A LRA secundária ao uso de Anf-B frequentemente ocorre após alguns dias do início da terapia medicamentosa em pacientes hospitalizados⁽³⁾. Os sinais clínicos característicos da LRA pela Anf-B são acidose, hipocalcemia, depleção de magnésio e sódio e poliúria resultantes da toxicidade direta nas células tubulares epiteliais, vasoconstrição renal com redução do fluxo sanguíneo renal (FSR) e da taxa de filtração glomerular (TFG) que se manifestam como declínio da função renal evidenciado pela elevação dos níveis de uréia e creatinina séricas⁽⁷⁾.

A LRA é caracterizada na clínica pela redução abrupta da função renal com a elevação do valor absoluto da creatinina sérica igual ou superior a 0,3mg/dl ou elevação de 1,5 a 2 vezes em relação a creatinina sérica basal do paciente. A avaliação da função renal pode também ser realizada por meio da mensuração do fluxo urinário. Os pacientes que apresentam o volume urinário inferior a 0,5 ml/kg/h por mais de seis horas são diagnosticados, por essa definição, como portadores de LRA⁽⁸⁾.

A LRA induzida por Anf-B consiste inicialmente em mecanismo de toxicidade direta no túbulo distal por meio de sua interação com o colesterol da membrana plasmática e a formação de um poro aquoso. Esse canal iônico transmembrana permite o influxo de prótons para o interior da célula que resulta em acidificação e disfunção das células do epitélio tubular, caracterizado pela perda da capacidade de concentração urinária e maior excreção de cátions como o potássio e o magnésio^(5,9). O ducto coletor reduz a reabsorção da água e conseqüentemente ocorre aumento do fluxo de urinário, que determina a poliúria resistente à ação do hormônio antidiurético (HAD)⁽¹⁰⁾.

A grande perda de cátions monovalentes e água ativam o mecanismo de autorregulação renal, o *feedback* túbulo glomerular, que induz a vasoconstrição da

arteríola aferente e redução do FSR, que pode resultar em hipóxia e isquemia renal^(5,11). Nessas condições, com baixas concentrações de oxigênio, a disfunção da célula endotelial da microvasculatura renal apresenta alta reatividade para mediadores vasoconstritores como a endotelina-1 (ET-1), os leucotrienos e o tromboxano, que contribuem para intensificar o mecanismo de vasoconstrição glomerular⁽¹²⁾.

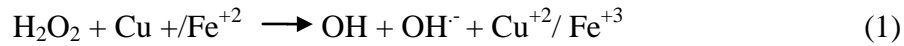
Adicionalmente, a hipóxia favorece a ativação da cascata inflamatória via produção de leucócitos na microvasculatura renal. A expressão de inúmeras interleucinas (IL-1, IL-2, IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- α) resulta na formação das moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), moléculas de adesão vascular (VCAM) e as selectinas P e E que promovem a interação leucócito-endotelial, adesão plaquetária e obstrução mecânica da microvasculatura renal^(11,12). A disfunção endotelial induz a geração de outros mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células do túbulo renal^(12,13).

As EROs são representadas pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). Fisiologicamente, a EROs são formadas continuamente como subproduto do metabolismo celular e são sequestradas do nosso organismo pela ação de enzimas antioxidantes endógenas com a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase⁽¹⁴⁾. Apesar da conotação tóxica, os baixos níveis de EROs são necessários para a manutenção de funções celulares que incluem a modulação de várias quinases e ativação de fatores de transcrição envolvidos com a regulação gênica de algumas proteínas⁽¹⁵⁾.

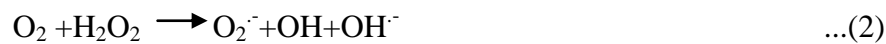
O desequilíbrio entre esses agentes oxidantes e enzimas antioxidantes endógenas, em favor dos primeiros, é que representa o mecanismo redox^(14,15). A geração excessiva de EROs promove o desequilíbrio redox. A predominância de radicais livres promove a peroxidação lipídica da membrana celular, desnaturação proteica, caracterizando o processo lesão oxidativa com apoptose e necrose celular^(13,14,15).

Os produtos oxidantes mais nocivos para o parênquima renal são o radical $O_2^{\cdot-}$, o não radical H_2O_2 e o radical OH^{\cdot} ⁽¹³⁾. Em situações de estresse, ocorre a redução de equivalentes, enzimas catalisadoras, metais de transição e carreadores de

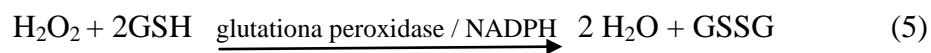
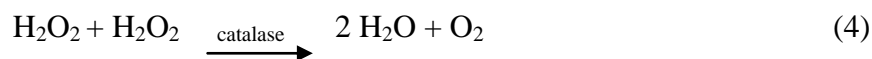
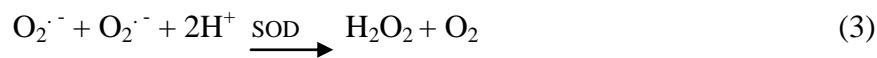
elétrons. Dentre esses metais de transição estão o Fe^{+3} e o Cu^{+2} , que reagem com o H_2O_2 , desligando-se de suas proteínas, catalisando e formando o OH^- (reação de Fenton) (equação 1)^(14,15).



A outra forma de geração do radical hidroxila acontece pela reação de Haber-Weiss, onde o O_2 reage com o intermediário H_2O_2 (equação 2)^(14,15).



O H_2O_2 tem alta habilidade de penetrar nas membranas biológicas, sendo um sinalizador intracelular de moléculas. Uma vez produzido em excesso, o H_2O_2 ativa o sistema enzimático antioxidante que é representado pelas enzimas antioxidantes endógenas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD) para a eliminação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ (equação 3), a catalase e a glutaciona peroxidase que são relacionadas com a eliminação do H_2O_2 e peróxidos orgânicos (equações 4 e 5)^(14,15).



Inúmeros são os agentes antioxidantes exógenos utilizados na clínica e na bancada com o objetivo de interferir nos mecanismos de insulto determinados por agentes nefrotóxicos como a Anf-B⁽¹⁶⁾. Dentre eles, com grande destaque, está a N-acetilcisteína (NAC), um fármaco com propriedades antioxidantes que pode contribuir para a regeneração do endotélio via liberação da glutaciona melhorando a microcirculação renal e o status redox⁽¹⁷⁾. Estudo *in vivo* demonstrou apoptose celular em rins de ratos pré-condicionados durante cinco dias com 10mg/kg de Anf-B. A administração simultânea do NAC com Anf-B demonstrou regressão da lesão celular, com menor número de células em apoptose⁽¹⁸⁾.

Fármacos com propriedades renoprotetoras têm sido utilizados para restaurar a hemodinâmica renal e reduzir o processo inflamatório e o estresse oxidativo. Destacam-se entre eles os flavonoides ou bioflavonoides, metabólitos secundários da

classe dos polifenóis, componentes de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies vegetais. Os flavonoides correspondem uma classe de compostos fenólicos que diferenciam entre si pela estrutura química e características particulares. Os exemplos clássicos de fonte desses compostos são as frutas, os vegetais, os grãos, as flores, o chá e o vinho. Os flavonoides são antioxidantes efetivos devido à propriedade sequestradora de EROs e a quelação de íons metálicos⁽¹⁹⁾.

Os flavonoides, diosmina e hesperidina, utilizados desde a década de 30 como tratamento para promover melhora do sistema vascular venoso, normaliza a permeabilidade capilar e reforça a resistência da microvasculatura⁽²⁰⁾. Estas substâncias também apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias^(20,21,22).

A atividade anti-inflamatória da diosmina e hesperidina é atribuída à inibição da síntese das prostaglandina E₂ (PGE₂) e a inibição na produção de moléculas de adesão endotelial (ICAM-1, VCAM) e adesão leucocitária. Estes compostos fenólicos também atuam como sequestradores de EROs e quelantes da molécula de ferro livre que confirma a sua ação antioxidante⁽²¹⁾.

Dessa forma, a ação antioxidante da diosmina e hesperidina pode estar associada a sua capacidade de sequestrar os radicais O₂^{·-} e OH⁻ ou induzir a formação de enzimas antioxidantes^(22,23). Estudo em ratos diabéticos demonstrou um alto consumo da reserva antioxidante endógena, como a catalase e SOD no tecido renal e hepático e a elevação de aldeídos resultantes da peroxidação lipídica. A administração oral da diosmina durante 45 dias reduziu a lesão oxidativa e promoveu maiores níveis de enzimas antioxidantes endógena nos rins e no fígado⁽²⁴⁾.

O pré-tratamento com diosmina 40mg/kg por 20 dias em modelo animal com ratos Wistar submetidos à toxicidade renal pelo tricloroetileno resultou em aumento das enzimas antioxidantes (glutathione, glutathione S-transferase, glutathione reductase, glutathione peroxidase e catalase) e melhorou os marcadores séricos de função renal como a ureia, creatinina e *kidney molecule-1* (KIM-1) e também, reduziu o níveis de metabólitos oxidativos no tecido renal⁽²⁵⁾.

A incorporação dos flavonoides, como a diosmina e hesperidina, tem sido explorada pela comunidade científica, visando se tornar uma alternativa terapêutica

ou preventiva da LRA com o objetivo de contribuir com a epidemiologia da LRA secundária ao uso de Anf-B. A hipótese desse estudo é que a DH possa desempenhar papel renoprotetor antioxidante nessa lesão renal de origem nefrotóxica.

As altas doses e longos períodos de utilização da ANB na clínica resultam em altos índices de nefrotoxicidade. A busca por uma alternativa de intervenção terapêutica que obtenha resultados promissores no desenvolvimento e agravamento da LRA abre oportunidades para novos estudos que disponibilizem dados com impacto para melhoria de protocolos assistenciais destinados a pacientes críticos em uso de medicamentos nefrotóxicos. Esse estudo visa elucidar os mecanismos de toxicidade da Anf-B e demonstrar a ação renoprotetora dos flavonoides, diosmina e hesperidina nesses modelos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do pré-condicionamento da diosmina e hesperidina em animais com LRA induzida pela Anf-B.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a função renal dos animais submetidos ao modelo de LRA induzida pela ANB.
- Avaliar o perfil oxidativo dos animais submetidos ao modelo de LRA induzida pela ANB.
- Avaliar o efeito do pré-condicionamento com diosmina e hesperidina sobre a função renal e o perfil oxidativo dos animais submetidos ao modelo de LRA induzida pela ANB.

3 MATERIAIS

e

MÉTODOS



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Comitê de ética em uso de animais

Os procedimentos necessários para a realização deste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)⁽²⁶⁾. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), protocolo registrado nº 061 (**Anexo A**).

3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar, machos, pesando entre 250 e 350 g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com livre acesso a água e ração em condições térmicas com ciclos alternados de dia e noite.

Os animais foram pré-medicados com 1 a 5 mg/kg da solução de xilazina (Anasedan®, Vetbrands), intraperitoneal (ip) com o objetivo de leve sedação e analgesia para o procedimento de administração de medicação por via ip. Ao término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados por meio da coleta de sangue terminal pela punção da aorta abdominal sob efeito anestésico profundo induzido com a administração de 70-100 mg/kg da solução de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália) por via ip⁽²⁷⁾. As carcaças de animais submetidos à eutanásia foram embaladas e acondicionadas em freezer e posterior encaminhamento para o descarte. O descarte foi realizado em saco branco, com o símbolo de “risco biológico”, lacrados e depositados em containers para descarte de resíduos biológicos, localizados na área externa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP) para coleta em datas previamente estabelecidas pela instituição.

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Modelo de LRA nefrotóxica

Os animais foram induzidos com 15 mg/kg de Anf-B (Anfotericin[®], Anfotericina B 5 mg/ml desoxicolato, Cristália), via ip, uma vez ao dia, durante cinco dias⁽²⁸⁾.

3.2.2 Administração de diosmina/hesperidina

Os animais receberam a diosmina/hesperidina (Daflon[®], Servier) na água do bebedouro durante 10 dias.

Para prepararmos a solução de diosmina/hesperidina foi necessário estabelecer o consumo médio de água Salina e Anf-B. Os valor médio consumido pelo grupo Salina foi de 30ml e o grupo Anf-B foi de 27ml, contudo este valor não foi utilizado pois dois animais não ingeriram água o que afetou o valor da média. O valor utilizado para o grupo Anf-B foi de 50 ml. O consumo de água do grupo salina foi extrapolado para o grupo D/H e a ingesta do grupo Anf-B para o grupo Anf-B+D/H.

A diosmina/hesperidina na forma comercial de comprimidos é constituída de 450 mg de diosmina e 50 mg de hesperidina bem como dos demais excipientes (Daflon[®], Servier).

Após pesquisas em bases de dados, trabalhos de bancada e a dose de 50 mg/kg de diosmina foi estabelecida²¹.

Determinamos o peso médio de 10 comprimidos como 664mg, este valor médio foi aceito como peso dos comprimidos.

Calculamos a dose de diosmina em relação ao peso do animal por meio de regra de três.

$$50\text{mg}_{(\text{diosmina})} \text{-----} 1\text{kg}$$

$$X\text{mg}_{(\text{diosmina})} \text{-----} \text{Peso do rato em kg}$$

Estabelecemos nova relação por regra de três para encontrarmos tanto a quantidade a ser pesada de comprimido, bem como a dose da hesperidina administrada aos animais.

$$664\text{mg}_{(\text{peso médio cp})} \text{-----} 450\text{mg}_{(\text{diosmina})} \text{-----} 50\text{mg}_{(\text{hesperidina})}$$

$$Z\text{mg}_{(\text{quantidade de cp a ser pesada})} \text{--} X\text{mg}_{(\text{diosmina})} \text{-----} K\text{mg}_{(\text{hesperidina})}$$

O valor Zmg foi dissolvido em 30 ml para o grupo D/H em 50 ml para o grupo Anf-B+D/H. A solução foi preparada em quantidade equivalente ao dobro de animais da gaiola coletiva para garantir o suprimento hídricos aos ratos.

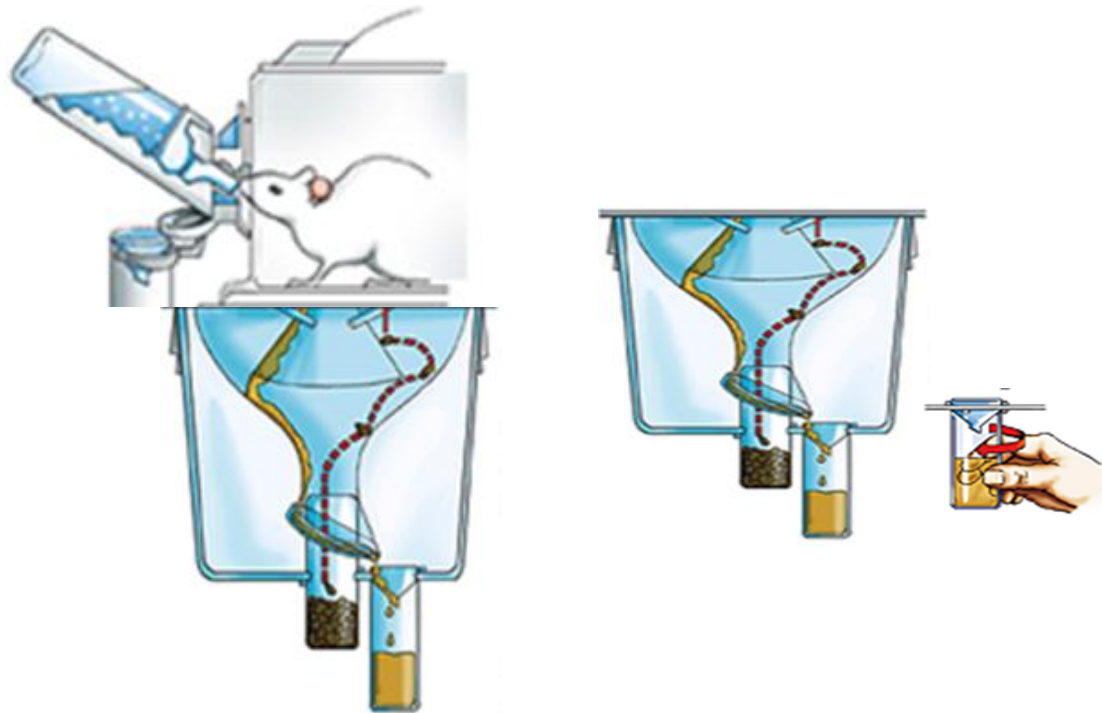
3.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- Salina - 3ml/kg de solução fisiológica a 0,9%, via ip, durante cinco dias;
- Diosmina/Hesperidina (DH) –solução de diosmina/hisperidina em água do bebedouro durante 10 dias;
- Anfotericina (Anf-B) – Os Anf-B, ip, uma vez ao dia, durante cinco dias;
- Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina (Anf-B+DH) –solução de diosmina/hesperidina em água de bebedouro durante 10 dias. A partir do sexto dia do protocolo, os animais começaram a receber Anf-B, ip, uma vez ao dia, cinco dias.

3.2.4 Gaiolas metabólicas

No 10º dia do protocolo experimental, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas visando a mensuração da função renal e de metabólitos oxidativos (Figura 1).

Figura 1- Ilustrações da gaiola metabólica.

Fonte: Ilustração da gaiola metabólica. São Paulo: Tecnoplast: 2009.

3.2.5 Coleta de sangue total

Ao término do período de 24 horas na gaiola metabólica, os animais foram anestesiados e submetidos à laparotomia para a coleta de sangue terminal. Essa coleta foi realizada por meio da punção da aorta abdominal e posterior avaliação da função renal. Ao término, os animais foram eutanasiados segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório, já descritas anteriormente.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Função renal

3.3.1.1 Clearance de creatinina

A filtração glomerular foi avaliada por meio do *clearance* de creatinina⁽²⁹⁾. Os valores de creatinina sérica e urinária foram determinados pelo método colorimétrico de *Jaffé*, no qual a creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino resultando em um complexo estável que pode ser quantificado em comprimento de onda de 520nm. O *clearance* de creatinina foi obtido pela aplicação da fórmula (1):

$$\text{Clearance de creatinina} = \frac{\text{Creatinina urinária} \times \text{Fluxo urinário}}{\text{Creatinina sérica}} \quad (1)$$

3.3.1.2 Fração de excreção de sódio

Os valores de sódio urinário e sérico foram determinados por meio do método de eletrodo íon seletivos com o uso do analisador Biochimico Architect[®] CI8200 (Abbot). Os controles das amostras foram realizados com a solução Lyphocheck[®] Quantitative Urine Control e Trulab[®] Quantitative Control. A fração de excreção de sódio (FENa) foi calculada pela fórmula (2)⁽³⁰⁾:

$$\text{FENa} = \frac{\text{Sódio urinário} \times \text{Creatinina sérica}}{\text{Sódio sérico} \times \text{Creatinina urinária}} \times 100 \quad (2)$$

3.3.1.3 Fração de excreção de potássio

Os valores de potássio urinário e sérico foram determinados por meio do método de eletrodo íon seletivos com o uso do analisador Biochimico Architect[®] CI8200 (Abbot). Os controles das amostras foram realizados com a solução Lyphocheck[®] Quantitative Urine Control e Trulab[®] Quantitative Control. A fração de excreção de potássio (FEK) foi calculada pela fórmula (3)⁽³⁰⁾:

$$FEK = \frac{\text{Potássio urinário} \times \text{Creatinina sérica}}{\text{Potássio sérico} \times \text{Creatinina urinária}} \times 100 \quad (3)$$

3.3.1.4 Fração de excreção de magnésio

Os valores de magnésio urinário e sérico foram determinados por meio do método colorimétrico com o uso do analisador Biochimico Architect[®] CI8200 (Abbot). Os controles das amostras foram realizados com a solução Lyphocheck[®] Quantitative Urine Control e Trulab[®] Quantitative Control. A fração de excreção de magnésio (FEMg) foi calculada pela fórmula (4)⁽³⁰⁾:

$$FEK = \frac{\text{Magnésio urinário} \times \text{Creatinina sérica}}{\text{Magnésio sérico} \times \text{Creatinina urinária}} \times 100 \quad (4)$$

3.3.2 Metabólitos oxidativos

3.3.2.1 Peróxidos urinários

O método xilenol laranja versão 2 (FOX-2) foi utilizado para a determinação de peróxidos urinários. Os peróxidos urinários promovem a oxidação do íon Fe^{+2} para Fe^{+3} em meio ácido. O xilenol de laranja [ácido (cresolsulfonaftalina 3', 3''- bis (metilamino) ácido diacético] reage de forma seletiva com os íon Fe^{+3} originando um complexo de cor azula-arroxeadado, segundo a equação (6) descrita abaixo⁽³¹⁾:



Inicialmente foi realizado o preparo da solução FOX-2, em uma solução formada com 90 ml de metanol e 10 ml de água bidestilada foram acrescentados 100 μM de xilenol laranja, 4 de mM BHT (2[6]-di-tert-butil-p-cresol), 25mM da solução de ácido sulfúrico e 250 μM de sulfato ferroso de amônio.

Na seguinte etapa, 900 μl desta solução e 100 μl da amostra urinária foram homogeneizadas e a solução permaneceu em repouso em temperatura ambiente por 30 min. A solução foi centrifugada para retirada de resíduos. Em seguida a leitura foi realizada por espectrofotometria em absorvância de 560 nm ($E = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽³¹⁾.

Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária expressos por nmol de peróxidos por grama de creatinina urinária⁽³²⁾.

3.4.2.3 Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico urinário

O malondelaldeído e outros aldeídos são formados pela clivagem da cadeia beta dos ácidos graxos oxidados que reage na presença do ácido tiobarbitúrico em fluídos orgânicos⁽³³⁾.

A dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) consiste na diluição de 0,2 ml de urina em 0,8 ml de água. A essa solução foram adicionados 01 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 17,5% e um ml de ácido tiobarbitúrico a 0,6%, pH 2. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em banho maria (água fervente) durante 20 minutos⁽³⁶⁾. Ao término do tempo, a solução foi resfriada em gelo e adição de um ml de TCA a 70%. As amostras foram homogeneizadas, tampadas e incubadas por 20 minutos. Ao fim desta etapa, as soluções foram centrifugadas por 15 min a 3000 rpm e a leitura foi realizada em espectrofotometria em absorvância de 534 nm ($E = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽³³⁾.

Os valores serão expressos em nmol de TBARS por ml de urina de 24 horas⁽³³⁾.

3.5 LOCAL

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo (EE-USP), coordenado pela Prof^a Dr^a Maria de Fatima Fernandes Vattimo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo método não paramétrico por meio do teste de *Kruskal-Wallis* para análise de variância, seguido do teste de *Steel-Dwass-Critchlow-Fligner* para comparações em pares. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Consumo de água

Tabela 1- Consumo de água dos grupos: Salina, Diosmin/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina. São Paulo -2013

Grupos	n	Consumo de água em ml
Salina	8	30±5
DH	9	27±4
Anf-B	5	27±26
Anf-B+DH	12	53±17 ^{abc}

Sendo: Consumo de água em ml.

^ap<0,05 vs Salina

^bp<0,001 vs DH

^cp<0,001 vs Anf-B

Os dados apresentam média ± desvio padrão.

A tabela 1 apresenta os valores referentes ao consumo de água comparado entre os grupos do estudo. O grupo Anf-B+DH, Salina e DH apresentam diferenças significativas (Salina 30±5 vs Anf-B + DH 53±17 vs DH 27±4 p<0,001). Já os grupos Anf-B e Anf-B+DH são significativamente diferentes (Anf-B + DH 53±17 vs Anf-B 27±264 p<0,05). Importante ressaltar que os grupos Anf-B e Anf-B+DH apresentaram valores extremos que influenciaram nas médias e respectivos desvios padrão.

4.2 FUNÇÃO RENAL

4.2.1 Clearance de creatinina

Tabela 2 – Função renal global dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina. São Paulo – 2013.

Grupos (n)	Peso (gramas)	FU (ml/min)	CrS (mg/dl)	CrU (mg/dl)	ClCr/100g (ml/min)
Salina (8)	330±24	0,010±0,002	0,25±0,08	70,65±18,87	1,02±0,27
DH (9)	334±19	0,010±0,005	0,29±0,05	92,82±26,22 ^d	0,95±0,19
Anf-B (5)	300±22 ^{bd}	0,030±0,007 ^{ab}	0,60±0,18 ^{ab}	24,72±10,78 ^{ab}	0,38±0,06 ^{ab}
Anf-B+DH (12)	290±24 ^{bd}	0,030±0,007 ^{ab}	0,42±0,11 ^{abf}	26,93±7,38 ^{ab}	0,62±0,14 ^{abc}

Sendo: FU - Fluxo urinário, CrS – creatinina sérica, CrU – creatinina urinária, ClCr/100g – clearance de creatinina/100g.

^ap<0,001 vs Salina

^bp<0,001 vs DH

^cp<0,001 vs Anf-B

^dp<0,05 vs Salina

^ep<0,001 vs DH

^fp<0,05 vs Anf-B

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes à função renal global dos diversos grupos. Os animais dos grupos Anf-B e Anf-B+DH apresentaram menores valores de peso corporal em relação aos grupos Salina e DH (Anf-B: 300±22, Anf-B+DH: 290±24 vs Salina: 330±24 e DH: 334±19, p<0,001).

Em relação ao parâmetro fluxo urinário, os animais que receberam a Anf-B apresentaram aumento significativo quando comparamos os grupos Salina e DH (Anf-B e Anf-B+DH: 0,030±0,007 vs Salina: 0,010±0,002 e DH: 0,010±0,005, p<0,001).

Os animais do grupo Anf-B apresentaram elevação significativa da creatinina sérica quando comparados com os grupos Salina e DH (Anf-B: $0,60 \pm 0,18$ vs Salina: $0,25 \pm 0,08$ e DH: $0,29 \pm 0,05$, $p < 0,001$). O pré-condicionamento com a solução de diosmina/hesperidina em animais que receberam a Anf-B determinou redução significativa dos níveis de creatinina sérica em relação ao grupo Anf-B (Anf-B+DH: $0,42 \pm 0,11$ vs Anf-B: $0,60 \pm 0,18$, $p < 0,05$).

O grupo DH apresentou elevação da creatinina urinária em relação ao grupo Salina (DH: $92,82 \pm 26,22$ vs Salina: $70,65 \pm 18,87$, $p < 0,05$). Os grupos que receberam Anf-B evoluíram com redução da creatinina urinária quando comparados aos grupos salina e DH (Anf-B: $24,72 \pm 10,78$, Anf-B+DH: $26,93 \pm 7,38$ vs Salina: $70,65 \pm 18,87$ e DH: $92,82 \pm 26,22$, $p < 0,001$).

Em relação ao parâmetro *clearance* de creatinina, o grupo Salina e DH (Salina: $1,02 \pm 0,27$ e DH: $0,95 \pm 0,19$) apresentaram resultados de função renal que foram considerados referência de normalidade^(29,34,35). Sendo assim, os demais grupos que apresentaram redução estatisticamente significante no *clearance* de creatinina em relação aos grupos controle foram considerados como portadores de LRA ($p < 0,05$).

A administração de Anf-B reduziu o *clearance* de creatinina quando os animais foram comparados aos grupos controle (Anf-B: $0,38 \pm 0,06$ vs Salina: $1,02 \pm 0,27$ e DH: $0,95 \pm 0,19$, $p < 0,001$). Esse achado associado aos resultados de FU caracterizaram o modelo como LRA não oligúrica. O pré-tratamento com diosmina e hesperidina demonstrou a elevação dos valores do *clearance* de creatinina em relação ao grupo Anf-B (Anf-B+DH: $0,62 \pm 0,14$ vs Anf-B: $0,38 \pm 0,06$, $p < 0,001$).

4.2.2 Fração de excreção de sódio

Tabela 3 - Fração de excreção de sódio dos grupos dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina. São Paulo – 2013.

Grupos	n	FENa (%)
Salina	8	0,32±0,05
DH	9	0,30±0,07
Anf-B	5	0,64±0,35 ^{ab}
Anf-B+DH	12	0,34±0,19 ^c

Sendo: FENa – fração de excreção de sódio.

^ap<0,05 vs Salina

^bp<0,05 vs DH

^cp<0,05 vs Anf-B

Os dados apresentam média ± desvio padrão.

Observa-se os resultados da FENa na Tabela 2. O grupo Anf-B apresentou aumento da FENa em relação aos grupos Salina e DH (Anf-B: 0,64±0,35 vs Salina: 0,32±0,05, DH: 0,30±0,07). O pré tratamento com DH resultou em redução da FENa induzida pela administração de Anf-B (Anf-B+DH: 0,34±0,19 vs Anf-B: 0,64±0,35, p<0,05).

4.2.3 Fração de excreção de potássio

Tabela 4 - Fração de excreção de potássio dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina. São Paulo – 2013.

Grupos	n	FEK (%)
Salina	8	21,13±7,61
DH	9	21,32±7,44
Anf-B	5	38,16±11,48 ^{ab}
Anf-B+DH	12	22,09±18,26 ^c

Sendo: FEK – fração de excreção de potássio.

^ap<0,002 vs Salina

^bp<0,001 vs DH

^cp<0,05 vs ANB

...Os dados apresentam média ± desvio padrão

A Tabela 3 apresenta os valores da FEK dos diversos grupos, na qual, observa-se que o grupo de animais que foi tratado com Anf-B apresentou aumento estatisticamente significativo da FEK quando comparado com os grupos Salina e DH (Anf-B: 38,16±11,48 vs Salina: 21,13±7,61 e DH: 21,32±7,44, p<0,002 e p<0,001, respectivamente). Novamente, os resultados confirmam a ação da DH sobre a toxicidade tubular da Anf-B, uma vez que o grupo Anf-B+DH apresentou redução significativa da FEK em relação ao grupo Anf-B (Anf-B+DH: 22,09±18,26 vs Anf-B: 38,16±11,48, p<0,05).

4.2.4 Fração de excreção de magnésio

Tabela 5 - Fração de excreção de Magnésio dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina. São Paulo – 2013.

Grupos	n	FEMg (%)
Salina	8	2,04±1,80
DH	9	3,02±2,62
Anf-B	5	11,14±3,45 ^{ab}
Anf-B+DH	12	7,03±3,92 ^{abc}

Sendo: FEMg – Fração de excreção de Magnésio.

^ap<0,003 vs Salina

^bp<0,007 vs DH

^cp<0,05 vs ANB

...Os dados apresentam média ± desvio padrão

A Tabela 4 exibe os valores da FEMg. Nela observa-se que os grupos Salina e DH apresentaram valores semelhantes entre si. Por outro lado, constata-se que os grupos tratados com Anf-B demonstraram aumento significativo da FEMg em relação aos grupos controle (Anf-B: 11,14±3,45, Anf-B+DH: 7,03±3,92 vs Salina: 2,04±1,80, p<0,003 e Anf-B: 11,14±3,45, Anf-B+DH: 7,03±3,92 vs DH: 3,02±2,62, p<0,005). Destaque-se que o tratamento com DH induziu redução significativa da FEMg, considerando que o grupo Anf-B+DH mostrou resultados bem inferiores aos do grupo que recebeu apenas a Anf-B (Anf-B+DH: 7,03±3,92 vs Anf-B: 11,14±3,45, p<0,05).

4.3 METABÓLITOS OXIDATIVOS

4.3.1 Peróxidos urinários

Tabela 6 – Peróxidos urinários dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina. São Paulo – 2013.

Grupos	n	Peróxidos urinários
		(nmol/g creatinina urinária)
Salina	8	7,1±3,6
DH	9	5,7±1,9
Anf-B	5	10,8±4,5 ^a
Anf-B+DH	12	7,4±2,5 ^b

^ap<0,006 vs DH

^bp<0,05 vs ANB

...Os dados apresentam média ± desvio padrão

Os valores de peróxidos urinários foram demonstrados na Tabela 5 e confirmam os grupos Salina e DH como controles para os demais, uma vez não diferiram entre si e de outros animais sem tratamento. Os animais que receberam Anf-B apresentaram elevação significativa na excreção de PU em relação ao grupo DH (Anf-B: 10,8±4,5 vs DH: 5,7±1,9, p<0,006). O pré-tratamento com diosmina e hesperidina conferiu redução dos PU quando comparado ao grupo Anf-B, assemelhando-o com o grupos controle (Anf-B+DH: 7,4±2,5 vs Anf-B: 10,8±4,5, p<0,05).

4.3.2 Dosagem de TBARS urinário

Tabela 7 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico urinário dos grupos: Salina, Diosmina/Hesperidina, Anfotericina B, Anfotericina B + Diosmina/Hesperidina. São Paulo – 2013.

Grupos	N	TBARS urinário
		(nmol/g de creatinina urinária)
Salina	8	0,009±0,003
DH	9	0,008±0,002
Anf-B	5	0,044±0,034 ^{ab}
Anf-B+DH	12	0,018±0,007 ^{abc}

Sendo: TBARS - ácido tiobarbitúrico urinário.

^ap<0,002 vs Salina

^bp<0,001 vs DH

^cp<0,01 vs ANB

...Os dados apresentam média ± desvio padrão

A Tabela 6 demonstra os resultados da dosagem de TBARS urinário dos diversos grupos. Os grupos Salina e DH foram utilizados como referência de normalidade e não diferiram entre si (Salina: 0,009±0,003 e DH 0,008±0,002).

A administração de Anf-B induziu o aumento significativo da excreção de TBARS urinário quando esse grupo foi comparado com os grupo Salina e DH (Anf-B: 044±0,034 vs Salina 0,009±0,003 e DH: 0,008±0,002, p<0,002). O pré tratamento com DH conferiu efeito antioxidante, uma vez que o grupo Anf-B+DH demonstrou resultados de TBARS significativamente inferiores ao Anf-B, porém ainda superiores aos grupos controle (Anf-B+DH: 0,018±0,007 vs Anf-B: 0,008±0,002, p<0,002).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A Anf-B é um “antigo” agente antifúngico, considerado como padrão ouro, ainda muito utilizado para o tratamento de várias infecções fúngicas invasivas (IFIs). Sua abrangência na rotina clínica se deve principalmente por seu baixo custo e eficácia. Por outro lado, seus eventos adversos, como a nefrotoxicidade, exigem da equipe multidisciplinar conhecimento e cuidado singulares com a sua indicação e infusão endovenosa⁽³⁵⁾.

As IFIs são caracterizadas pela alta mortalidade, visto que frequentemente comprometem pacientes com distúrbios hematológicos malignos, transplantados, internados em UTIs ou em pacientes portadores de HIV, ou seja, indivíduos que demonstram alguma vulnerabilidade a toxicidade por medicamentos e ou outros agentes terapêuticos e diagnósticos. Por outro lado, a introdução de novas terapêuticas antifúngicas não demonstrou redução na taxa de mortalidade. Além disso demonstraram custos mais elevados, limitando seu emprego em regiões com recursos financeiros mais restritos⁽³⁵⁾. Esse cenário continua a reiterar a utilização da Anf-B como medicamento de primeira escolha para o tratamento de IFIs em nosso país.

Várias estratégias preventivas são recomendadas com o objetivo de reduzir os efeitos adversos associados à Anf-B. Elas incluem a utilização de diferentes formulações lipídicas, assim como, protocolos de hidratação ou infusões em longos períodos⁽³⁾. Estratégias definidas por meio da pesquisa translacional sugerem que a introdução de uma nova formulação farmacológica deve se orientar por três fases, ou, os “3 Bs” – *Bench, Bedside and Back again*, que se caracteriza por um processo dinâmico e de retroalimentação⁽³⁶⁾, como segue.

A bancada ou *bench* é formada pelo pilar da pesquisa básica *in vivo* ou *in vitro* que forma a base para o exercício da prática e a fundamentação de novas diretrizes clínicas⁽³⁶⁾. Esse pressuposto pressupõe que o conhecimento farmacológico da Anf-B e da fisiopatologia da LRA tóxica deve nortear os protocolos de pesquisa na área da pesquisa básica experimental. Em consequência, os

resultados oriundos da pesquisa voltam para a prática assistencial, como propostas de novas estratégias, porém ainda sem confirmação clínica^(2,3). O segundo pilar que consiste no “ao lado do leito” ou *bedside* inclui estudos que avaliam a efetividade, aceitabilidade e custo/benefício das intervenções das ciências clínicas⁽³⁶⁾, seria então o “teste clínico” dos dados vindas da pesquisa básica. Exemplificando essa segunda etapa, estudo publicado por Falagas ME et al. (2013) demonstrou, por meio de uma meta-análise, que a administração contínua da Anf-B lipossomal resultou em menor nefrotoxicidade do que a Anf-B convencional em pacientes⁽³⁵⁾. No último pilar, *back again*, todas as informações originadas nas etapas anteriores e a vivência clínica que consistiram em evidências fortes são convertidas em tratamentos e estratégias de prevenção que norteiam as políticas de saúde⁽³⁶⁾.

Os estudos *in vivo* do LEMA com modelos de LRA tóxica demonstraram a eficácia da terapêutica com antioxidantes como o NAC, o hemin (indutor da enzima heme oxigenase -1), os flavonoides *Vitis Vinífera*, isoflavona e diosmina-hesperidina. Esses agentes foram eficazes na elevação da TFG enquanto que reduziram metabólitos oxidativos^(29,37,38,39)

Neste estudo a administração dos flavonoides diosmina e hesperidina em animais com LRA induzidos pela Anf-B demonstrou a elevação da TFG que foi evidenciado pelo *clearance* de creatinina e a disfunção tubular atenuada pela redução da fração de excreção de sódio, potássio e magnésio. A ação protetora antioxidante desses flavonoides foi confirmada pela redução dos valores de metabólitos oxidativos. Os mecanismos envolvidos na toxicidade da Anf-B e possivelmente na proteção antioxidante determinada pela DH evidenciadas nesse estudo serão melhores descritos a seguir.

A LRA induzida pela Anf-B se confirma como dose dependente como demonstrado por Varlan DE et al (2001). Nesse estudo, as células tubulares expostas a concentrações variadas de Anf-B demonstraram aumento no número de células em apoptose. Esse aumento foi proporcional à elevação da concentração do medicamento⁽²⁸⁾. Estudos relatam a identificação de células em apoptose a partir da exposição na concentração de 5mg/kg/dia^(18,28).

No estudo ora apresentado, observou-se que a administração de 15mg/kg de Anf-B em animais saudáveis induziu a LRA não oligúrica, confirmada pela redução do *clearance* de creatinina e aumento do fluxo urinário. Além disso, a elevação das frações de excreção de sódio, potássio e magnésio confirmam o quadro de disfunção endotelial tubular e contribuem para o agravamento do modelo de toxicidade tubular na LRA pela Anf-B.

As primeiras manifestações de toxicidade direta acontecem minutos após a infusão de Anf-B, em que se observa aumento local de mediadores vasoconstritores, como a ET-1, os leucotrienos e adenosina, que induzem a vasoconstrição com redução do FSR nas células endoteliais da microvasculatura renal⁽⁴⁰⁾. Em parte essa vasoconstrição é intensificada pela redução da ação de vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e também pela ativação de citocinas inflamatórias que promovem a adesão leucócito-endotélio. A interação entre leucócitos e endotélio ocorre juntamente com a ativação da cascata de coagulação, que comprometem a microcirculação e conseqüente contribuem para a hipóxia renal e isquemia^(41,42). França FD et al. (2013) demonstraram por meio de estudo *in vitro* que o mecanismo de ação da nefrotoxicidade da Anf-B está relacionado com a ativação da proteína quinase A (PKA) – sinalizador da viabilidade celular, liberação de citocinas pró-inflamatórias e a baixa expressão de NO sintase. A inibição da PKA atenua a disfunção renal induzida pela ANB via ação vasodilatadora de NO e redução de mediadores inflamatórios⁽⁴³⁾.

Inúmeras investigações descrevem que a vasoconstrição arteríola aferente renal está presente no modelo de LRA tóxica pela Anf-B, visto que o tratamento com bloqueadores de canais de entrada de cálcio como a nifedipina e a didropiridina, o verapamil e o diltiazem promoveram melhora da função renal evidenciada pela redução dos níveis séricos da creatinina e elevação do *clearance* de creatinina^(44,45,46). Os bloqueadores de canais de entrada de cálcio da membrana celular, particularmente as células cardíacas e da musculatura lisa, reduzem a capacidade de excitação e contração celular, aumentando o período de relaxamento vascular e promovendo incremento no fluxo sanguíneo^(44,45,46). O pré-condicionamento com antagonistas do receptor da adenosina, como a aminofilina e fenaldopan, também

consistiu em elevação da TFG em animais submetidos à toxicidade da Anf-B, pelo mesmo efeito primário descrito para os bloqueadores de canais de cálcio⁽⁴⁷⁾.

Além dos distúrbios hemodinâmicos da microvasculatura, a presença de Anf-B nos túbulos renais resulta na formação de poros aquosos na membrana plasmática que favorece o influxo de prótons para o interior da célula e, conseqüentemente, ocorre a acidificação tubular pela redução do pH⁽⁴⁸⁾. O mecanismo de vasoconstrição, somado à acidificação tubular, induz a lesão tubular principalmente das células tubulares localizadas na região da medula externa renal⁽⁴⁸⁾. Essas células do epitélio renal são conhecidas pela sua alta susceptibilidade à lesão em condições de hipóxia devido à própria característica anatômica da região. Esse segmento do néfron recebe cerca de 6% de todo o FSR e, portanto, necessitam de altas demandas de glicose e oxigênio para manutenção da atividade dos cotransportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ ⁽⁴⁸⁾.

A lesão tubular é caracterizada pela transmigração das proteínas localizadas na membrana da celular, em especial a Na/K atpase, que alteram o seu domínio da face basolateral para face apical. Este mecanismo de lesão promove a perda da polaridade da membrana que resulta em disfunção tubular e indução do fenômeno tubular distal. As células do túbulo distal perdem a capacidade de concentração da urina e da reabsorção de eletrólitos como cálcio e magnésio^(11,12). Portanto, a poliúria apresentada pelos animais que receberam Anf-B ocorre em resposta à inibição do sinalizador para reabsorção de água, AVP e V2R, no ducto coletor, via o canal de aquaporina-2^(49,50). A alta concentração de eletrólitos no ducto distal ativa o mecanismo *feedback* tubuloglomerular que intensifica o mecanismo de vasoconstrição e conseqüente, hipóxia e isquemia renal^(7,49,50).

Os agentes de proteção renal que visam à prevenção da espoliação de eletrólitos confirmam a sua eficácia na LRA decorrente do uso de Anf-B. Nesse estudo, o tratamento com os flavonoides diosmina e hesperidina elevou a TFG e favoreceu a redução das frações de excreção de sódio, potássio e magnésio dos animais submetidos à toxicidade pela Anf-B, demonstrando a ação adicional da diosmina e hesperidina na prevenção de desordens eletrolíticas.

A terapia com o diurético, amiloride, bloqueia os canais de sódio do túbulo distal que promove a excreção urinária de sódio e bicarbonato, reduz a excreção

urinária de potássio e conseqüentemente, previne a hipocalemia e hipomagnesemia⁽⁵¹⁾. Estudo clínico prospectivo, randomizado e controlado com a administração de espinolactona em 26 pacientes neutropenicos com várias desordens hematológicas, em tratamento com Anf-B, também demonstrou proteção renal por meio da prevenção da hipocalemia pela redução da espoliação do potássio⁽⁵²⁾.

A disfunção vascular e tubular neste modelo de LRA induzida pela Anf-B foi demonstrada pela elevação dos peróxidos e TBARS urinários, que confirmam a geração de EROs. A alta concentração de EROs causa peroxidação lipídica na membrana celular, oxidação de proteínas e lesão no DNA. Esses efeitos podem danificar a integridade das membranas plasmática e mitocondrial, comprometendo a função proteica e inibindo a proliferação e reparo celular. A manutenção da hipóxia favorece ainda o acúmulo de xantina, O_2^- e H_2O_2 , os quais, na presença de ferro livre, geram o radical hidroxila que perpetua a cascata de lesão oxidativa das células renais⁽¹³⁾.

Nesse estudo foi possível constatar a redução dos metabólitos oxidativos determinados pelo tratamento com Anf-B por meio do pré-condicionamento dos animais com a diosmina e hesperidina. A utilização da diosmina e hesperidina em modelos de LRA tóxica e isquêmica demonstraram resultados positivos, revelando a ação dos flavonoides como sequestradores de radicais livres⁽⁵³⁾.

O tratamento com os flavonoides, 80mg/kg de diosmina e hesperidina por 10 dias, revelou elevação nos níveis de glutathiona e redução significativa do malondealdeído e mieloperoxidase séricos, demonstrando a sua ação renoprotetora, com diminuição do estresse oxidativo sistêmico em animais submetidos ao mecanismo de isquemia-reperfusão⁽²²⁾. A administração da diosmina e heperidina em animais submetidos ao modelo de LRA associada à sepse reduziu os metabólitos oxidativos, peróxidos e TBARS urinários, com melhora da função renal e diminuição do processo inflamatório com a redução da expressão do fator de necrose tumoral TNF- α e IL-6 nos rins intestino e pulmão⁽³⁹⁾.

A administração isolada da diosmina ou hesperidina também comprovou o efeito protetor antioxidante em diversos mecanismos de lesão celular. Silambarasan T et al. (2012) demonstraram a ação antioxidante do flavonoide diosmin em ratos

hipertensos. O tratamento oral com o diosmin aumentou a concentração de glutathione e a atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase que reduziram a peroxidação lipídica no tecido renal⁽⁵⁴⁾. O pré-tratamento com hesperidina demonstrou efeito protetor antioxidante com a redução na geração de EROs em animais neonatos submetidos à hipóxia e isquemia do sistema nervoso central⁽⁵⁵⁾. A administração oral de hesperidina reduziu o estresse oxidativo e a produção de citocinas inflamatórias na hepatotoxicidade induzida pela ingestão de tetraclorobenzeno⁽⁵⁶⁾. Os resultados satisfatórios relativos à atenuação da disfunção renal induzida pela Anf-B quando se procedeu o pré tratamento com DH se somam aos dados aqui apresentados em favor de seu efeito renoprotetor antioxidante em modelo de nefrotoxicidade por fármaco.

Sumariamente, este estudo demonstrou a vulnerabilidade do sistema renal frente à administração de drogas nefrotóxicas como a Anf-B, em que se observou declínio da função renal com redução da TFG e aumento das frações de excreção de sódio, potássio e magnésio 48 horas após o tratamento com esse fármaco. A avaliação de metabólitos oxidativos evidenciou a interferência de EROs nesse mecanismo de lesão tóxica. O pré-condicionamento com a diosmina e hesperidina surpreendeu com elevação significativa da TFG, a redução das frações de excreção de sódio, potássio e magnésio com baixa excreção de metabólitos oxidativos. Dessa forma, o tratamento com a diosmina e hesperidina revelou importante participação desses flavonoides na recuperação da função renal e no reestabelecimento do equilíbrio redox na LRA induzida pela ANB em ratos.

Estudos descrevem várias ações terapêuticas com o objetivo de reforçar o tratamento e a prevenção da nefrotoxicidade induzida pela Anf-B. A busca pela segurança e qualidade de assistência recomendam estratégias preventivas para minimizar os efeitos da nefrotoxicidade associada à terapia antimicrobiana da Anf-B⁽³⁾. As medidas preventivas envolvem infusões de soluções salinas hipertônicas⁽⁵⁷⁾, infusões do fármaco em períodos prolongados⁽⁵⁸⁾ e o uso de formulações lipídicas⁽⁵¹⁾. Essas medidas são eficazes principalmente para pacientes que apresentam baixo risco para o desenvolvimento da nefrotoxicidade associada à Anf-B, porém não mudaram o perfil epidemiológico dessa síndrome iatrogênica^(3,11).

A utilização dos antioxidantes naturais, como a diosmina e hesperidina, encontrados em frutas cítricas, demonstrou eficácia terapêutica na LRA induzida pela ANB. A utilização dos flavonoides diosmina e hesperidina pode ser considerada como alternativa terapêutica e preventiva.

Inúmeros foram os mecanismos de ação da Anf-B evidenciados por esse estudo, como a redução da TFG, as desordens eletrolíticas e o desequilíbrio redox. Esses achados poderão se caracterizar como componentes fisiopatológicos para elucidar as articulações internas de patologias, cujos desconhecimentos ainda afligem os resultados terapêuticos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Os animais que receberam Anf-B apresentaram aumento do fluxo urinário e redução da função renal, caracterizando o quadro de LRA nefrotóxica não oligúrica.

- A LRA induzida pela Anf-B demonstra disfunção tubular evidenciada pela elevação das frações de excreção de sódio, potássio e magnésio.

- O mecanismo de lesão oxidativa por meio da elevação de peróxidos e TBARS urinários confirmou-se como componente fisiopatológico envolvido na indução da LRA pela Anf-B.

- O pré-condicionamento com a diosmina e hesperidina demonstrou efeito renoprotetor por meio da elevação da TFG e redução das frações de excreção de sódio, potássio e magnésio, além da proteção antioxidante confirmada pela redução de metabólitos oxidativos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, et al; Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005; 294(7):813-8.
2. Perazella MA. Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*; 2009; 4(7):1275-83.
3. Pannu N, Nadim MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. *Crit care Med*. 2008; 36(4-suppl):S216-223.
4. Vyas SP, Gupta S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomedicine*. 2006; 1(4):417-32.
5. Laniado-Laborin R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*. 2009; 26(4):223-27.
6. Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DRJ, et al. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis*. 2001; 32(5):686-93.
7. Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49(suppl-1):37-41.
8. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al; Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007; 11(2):R31.
9. Yano T, Itoh Y, Kawamura E, Maeda A, Egashira N, Nishida M, et al. Amphotericin B –induced renal tubular cell injury is mediated by Na⁺ influx through ion-permeable pores and subsequent activation of mitogen-activated protein kinases and elevation of intracellular Ca²⁺ concentration. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(4):1420-6.
10. Tonomura Y, Yamamoto E, Kondo C, Itoh A, Tsuchiya N, Uehara T, et al. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: characterization of blood and

- urinary biochemistry and renal morphology in mice. *Hum Exp Toxicol.* 2009; 28(5):293-300.
11. Palmer BF, Henrich WL. Toxic Nephropathy. In Brenner BM, editor. *Brenner & Rector's. The Kidney.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2004.p.1625-58.
 12. Brandy HR, Brenner BM, Clarkson MR, Liberthal W. Acute Renal Failure. In: Brenner BM, editor. *Brenner & Rector's. The kidney.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2004. p.1215-92.
 13. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med.* 2000; 109(8):665-78.
 14. McCord JM. The evolution of free radical and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 108(8):652-9.
 15. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(11):1287-312.
 16. Weseler AR, Bast A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatment. *Curr Hyperten Rep.* 2010; 12(3):154-61.
 17. Feldman L, Efrati S, Dishy U, Katccko L, Berman S, Averbukl Z, et al. N-acetylcysteine ameliorates amphotericin induced nephrotoxicity in rats. *Nephron Physiol.* 2005; 99(1):23-7.
 18. Odabasi Z, Karaalp A, Cermik H, Mohr J, Tigen ET, Koc M, et al. Reduction of amphotericin B-induced renal tubular apoptosis by N-acetylcysteine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(7):3100-2.
 19. Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Atenas LMG, Bianchi MLP. Flavonoides quercentina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim Nutr.* 2004; 15(3):285-92.
 20. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010; 2(12):1231-46
 21. Silambarasan T, Raja B. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2012; 679(1-3):81-9.

22. Ünlü A, Sucu N, Tamer L, Cosjun B, Yücebilgiç G, Ercam B, et al. Effects of Daflon on oxidative stress induced by hind limb ischemia/reperfusion. *Pharmacol Res.* 2003; 48(1):11-5.
23. Yildiz F, Terzi A, Coban S, Birtiren M, Celik H, Aksoy N, et al. Purified micronized flavonoid fraction ameliorates the injury of spleen and ileum secondary to hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Dig Dis Sci.* 2010; 55(8): 2237-43.
24. Sirivasan S, Pari L. Ameliorative effect of diosmine, a citrus flavonoid against streptozocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2012; 195(1):43-51.
25. Rehman MU, Tahir M, Khan Q, Khan R, Lateef A. Diosmin protects against trichloroethylene-induced renal injury in Wistar rats: plausible role p53, Bax and caspases. *Br J Nutr.* 2013; 110(4):699-710.
26. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Resolução normativa nº 12 de 20 setembro de 2013. Institui a diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos. *Diário Oficial da União, Brasília, 25 set 2013. Seção 1: 52-9.*
27. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Resolução normativa nº 13 de 20 setembro de 2013. Institui a diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. *Diário Oficial da União, Brasília, 26 set 2013. Seção 1:5-12.*
28. Varlam DE, Siddiq MM, Parton LA, Rüssmann H. Apoptosis contributes to amphotericin B-induced nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(3):679-685.
29. Dezoti CF, Watanabe M, Vattimo MFF. Heme oxygenase-1 role in the Polymyxin B induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(10):5082-7.
30. Favaro VF, Oshiro-Monreal FM, Bragança AC, Andrade L, Seguro AC, Helou CM. High cholesterol feeding may induce tubular dysfunction resulting in hypomagnesemia. *Kidney Blood Press Res.* 2012; 35(3):137-46.

31. Gay CA, Gebcki JM. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. *Anal Biochem.* 2003; 315(1):29-35.
32. 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.
33. Sihimizu MHM, Danilovic A, Andrade L, Volpi RA, Libório AB, Sanches TRC, et al. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23(10):3067-73.
34. Teshima CAS, Dezoti C, Watanabe M, Vattimo MFF. A estastina e a lesão renal aguda isquêmica em ratos. *Acta Paul Enferm.* 2012; 25(1):86-9.
35. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Tansarli GS. Continuous versus Conventional Infusion of Amphotericin B Deoxycholate: A Meta-Analysis. *Plos One.* 2013; 8(10):e77075.
36. Perzynski AT. Multidisciplinary approaches to biomedical research. *JAMA.* 2010; 304(20):2243-4.
37. Pinto CF, Watanabe M, Neiva LBM, Vattimo MFF. Hydration and N-acetylcysteine in acute renal failure caused by iodinated contrast: an experiment in rats. *J Nephrol.* 2008; 21(5):783-8.
38. Silva WT, Santos JG, Watanabe M, Vattimo MFF. Efeito protetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do imunossupressor Tacrolimus. *Acta Paul. Enferm;* 24(3):388-92.
39. Vattimo MF, Pinto CF, Watanabe M, Fonseca CD. The Purified micronized flavonoid fraction effect in the sepsis associated-acute kidney injury. In: *Kidney Week 2012 - Annual Meeting; oct 30-nov 4; San Diego, USA. American Society of Nephrology; 2012. J Am Soc Nephrol.* 2012; 23: 104A.
40. Andreson CM. Sodium chloride treatment of amphotericin B nephrotoxicity – standard of care? *West J Med.* 1995; 162(4):313-7.
41. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009; 78(6):539-52.
42. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011; 121(11):4210-21.

43. França FD, Ferreira AF, Lara RC, Rossoni JV Jr, Costa DC, Moraes KC, Tagliati CA, Chaves MM. Alteration in cellular viability, pro-inflammatory cytokines and nitric oxide production in nephrotoxicity generation by amphotericin B: involvement of PKA pathway signaling. *J Appl Toxicol* 2013; Epub 2013 Sep 18.
44. Soupart A, Decaux G. Nifedipine and amphotricin B nephrotoxicity in rat. *Nephron*. 1989; 52(3):278-80.
45. Zager RA, Bredl CR, Scimpf BA. Direct amphotericin B mediated tubular toxicity: assessments of selected cytoprotective agents. *Kidney Int*. 1992; 41(6):1588-94.
46. Tolins JP, Raij L. Chronic amphotericin B nephrotoxicity in the rat: protective effect of calcium channel blockade. *J Am Soc Nephrol*. 1991; 2(1):98-102.
47. Gerkens JF, Heidemann HT, Jackson EK, Branch RA. Effect of aminophylline on amphotericin B nephrotoxicity in the dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983; 224(3): 609-13.
48. Walev I, Bhakdi S. Possible reason for preferential damage to renal tubular epithelial cells evoked by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(5):116-20.
49. Yun J, Schoneberg T, Liu J, Schulz A, Ecelbarger CA, Promeneur D, et al. Generation and phenotype of mice harboring a nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene. *J Clin Invest*. 2000; 106(11):1361-71.
50. Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases the water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(4):1013-7.
51. Karimzadeh I, Khalili H, Farsaei S, Dashti-Khavidaki S, Sagheb MM. Role of diuretics and lipid formulations in the prevention of amphotericin B-induced nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013; 69(7): 1351-68.
52. Ural AU, Avcu F, Cetin T, Beyan C, Kaptan K, Nazaroglu NK, et al. Spironolactone: is it a novel drug for the prevention of amphotericin B-related hypokalemia in cancer patients? *Eur J Clin Pharmacol*. 2002; 57(11):771-3.

53. Kim J, Seok YM, Jung K, Park KM. Reactive oxygen species / oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297(2):F461-70.
54. Silambarasan T, Raja B. Diosmin, a biflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and status antioxidant in DOCA-salt induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2012; 679(1-3):81-9.
55. Rong Z, Pan R, Xu Y, Zhang C, Cao Y, Liu D. Hesperidin pretreatment protects hypoxia – ischemic brain injury in neonatal rat. *Neuroscience*. 2013; 255:292-9. Epub 2013 Sep 25.
56. Bentli R, Ciftci O, Cetin A, Unlu M, Basak N, Cay M. Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Eur Cytokine Netw*. 2013; 24(2):91-6.
57. Lianos A, Cieza J, Bernardo J, Echevarria J, Biaggioni I, Sabra R, et al. Effect of salt supplementation on amphotericin B nephrotoxicity. *Kidney Int*. 1991; 40(2):302-8.
58. Eriksson U, Seifert B, Schaffner A. Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomized controlled trial. *BMJ*. 2001; 322(7286):579-82.

ANEXOS

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **061** nas fls. **129** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria de Fátima Fernandes Vattimo**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito da Diosmina Hisperidina na lesão renal aguda induzida por anfotericina B*" do qual participam o(s) aluno(s) **Fábio dos Santos Schlottfeldt**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **26.06.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 27 de junho de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ANIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP