



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MARCUS FELIPE BEZERRA DA COSTA

**ESTUDO DO EFEITO NEFROPROTETOR DO EXTRATO ALCOÓLICO DE
Própolis vermelha EM UM MODELO DE LESÃO RENAL AGUDA POR
ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RATOS**

**FORTALEZA-CE
2013**

MARCUS FELIPE BEZERRA DA COSTA

ESTUDO DO EFEITO NEFROPROTETOR DO EXTRATO ALCOÓLICO DE
Própolis vermelha EM UM MODELO DE LESÃO RENAL AGUDA POR
ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RATOS

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia de toxinas, venenos e peptídeos biologicamente ativos.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

**FORTALEZA-CE
2013**

MARCUS FELIPE BEZERRA DA COSTA

**ESTUDO DO EFEITO NEFROPROTETOR DO EXTRATO ALCOÓLICO DE
Própolis vermelha EM UM MODELO DE LESÃO RENAL AGUDA POR
ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____/

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins- (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará - (UFC)

Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher
Universidade Federal do Ceará – (UFC)

Profa. Dra. Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima
Universidade Estadual do Ceará – (UECE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus**, pelo dom da vida, por estar sempre a frente de todos os meus passos.

À Prof. Dra. **Alice Maria Costa Martins**, minha orientadora, pela confiança no meu trabalho, pelo apoio constante, paciência e dedicação. Expresso minha imensa admiração pelo exemplo de profissional e pesquisadora. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. **Alexandre Braga Libório**, co-orientador desse trabalho, pela contribuição para o desenvolvimento desse estudo, pela dedicação, disponibilidade e aprendizagem compartilhadas. Registro aqui meu profundo agradecimento.

À Dra. **Helena Serra Azul Monteiro**, coordenadora do LAFAVET (Laboratório de Toxinas Venenos e Lectinas), pelo acolhimento e pelo espaço cedido em meus experimentos.

Ao Prof. **Pedro Marcos Gomes Soares**, do NEMPI (Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens), pela sua disponibilidade e pela colaboração nesse trabalho, obrigado.

Aos amigos do LCC, Gdayllon, Ticiania, Alba, Danya, Ramon, Clarissa, Izabel, Paloma, Louise, Jader, Lívia e Tiago, pela amizade e apoio durante o mestrado.

Ao meu amigo Adelvane, do LAFAVET, por me ajudar nos experimentos e pelo apoio durante todo o mestrado.

À minha namorada Tereza, por estar sempre do meu lado me apoiando nas minhas decisões.

À minha família, pelo apoio e incentivo fundamental e, pelo exemplo de vida que representam para mim.

RESUMO

As doenças renais apresentam um problema de saúde pública mundial, aonde há um aumento nos números de incidência de Lesão Renal Aguda (LRA) em pacientes hospitalizados. A LRA caracteriza-se por uma redução abrupta da função renal, resultando na incapacidade dos rins em exercer suas funções básicas. A lesão por isquemia/reperfusão (I/R) pode ser definida como as alterações resultantes da privação seguida do re-estabelecimento do fornecimento de oxigênio para tecidos e órgãos. É um processo complexo, que resulta na produção espécies reativas de oxigênio (EROs) e dano por estresse oxidativo. A Própolis Vermelha brasileira é uma mistura complexa coletada e produzida pelas abelhas *Apis mellifera*, e parece ser promissor nesse contexto, atenuando assim o efeito oxidativo e nefrotóxico no rim. Este estudo experimental tem como objetivo reproduzir e padronizar um quadro de LRA por Isquemia/Reperfusão (I/R) em ratos, e analisar os possíveis efeitos protetores renais do Extrato Alcoólico de Própolis Vermelha (EAPV) na dose de 150mg/kg, sobre os marcadores e variáveis desse quadro patológico. Foram utilizados ratos Wistar, adultos machos, divididos em 4 grupos, utilizado um esquema de indução e de tratamento. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos indicativos da função renal (creatinina, ureia, Clearance de creatinina) função tubular ($FENa^+$ e FEK^+), o perfil oxidativo através do MDA (Malonaldeído) e atividade da enzima antioxidante GSH, além da análise histológica e imunohistoquímica. O EAPV alterou significativamente quase todos os parâmetros investigados. Os resultados demonstraram efeito protetor do extrato na dose de utilizada diante dos parâmetros de nefrotoxicidade: diminuiu os níveis séricos creatinina ($1,8 \pm 0,5$ vs $2,7 \pm 0,9$) e uréia ($181,1 \pm 65,6$ vs $274,3 \pm 91,81$), reverteu o aumento da $FENa^+$ ($0,58 \pm 0,30$ vs $1,03 \pm 0,39$) e da FEK^+ ($64,74 \pm 52,44$ vs $134,4 \pm 54,94$), reverteu a diminuição do clearance de creatinina ($0,41 \pm 0,14$ vs $0,073 \pm 0,048$), diminuiu os níveis de MDA ($90,22 \pm 20,82$ vs $133,9 \pm 23,36$) e aumentou o de GSH ($1784 \pm 297,4$ vs $1267 \pm 229,5$), diminuiu o índice de necrose tubular aguda ($2,0 \pm 0,7$ vs $3,6 \pm 0,5$) a aumentou a expressão de eNOS ($2,2 \pm 0,4$ vs $0,6 \pm 0,5$) e Heme-oxigenase ($2,6 \pm 0,5$ vs $1,4 \pm 0,5$). Portanto, ocorreu proteção da função renal, do dano tubular e do estresse oxidativo. Estes resultados relatam pela primeira vez o efeito da Própolis Vermelha sobre um modelo de LRA induzido por I/R, demonstrando o efeito protetor do extrato na LRA.

Palavras-chave: Própolis Vermelha. Isquemia/Reperfusão. Lesão Renal Aguda.

ABSTRACT

Kidney disease remains a public health problem worldwide, where there is an increase in the number of incidence of Acute Kidney Injury (AKI) in hospitalized patients. The AKI is characterized by an abrupt decrease in renal function, resulting in the inability of the kidneys to perform its basic functions. The Ischemia/Reperfusion (I/R) injury can be defined as all changes resulting from the deprivation and the re-establishment of the oxygen supply to tissues and organs. It is a complex process that results in the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress damage. The Brazilian Red Propolis is a complex mixture collected and produced by *Apis mellifera* bees, and seems to be promising in this context, attenuating the oxidative and nephrotoxic effect in the kidney. This experimental study aims to replicate and standardize a framework of AKI by Ischemia/reperfusion (I/R) in rats, and analyze the possible protective renal effects of Red Propolis Alcohol Extract (RPAE) at a dose of 150mg/kg on markers and pathological variables. Wistar rats, adult males, were divided into 4 groups, using an induction and treatment regimen. We evaluated biochemical parameters indicative of renal function (creatinine, urea, creatinine clearance) tubular function (FENa^+ and FEK^+), oxidative profile through MDA (malondialdehyde) and activity of antioxidant enzyme GSH, in addition to histological analysis and immunohistochemistry. The RPAE significantly altered almost all parameters investigated. The results demonstrated the protective effect of the extract in the dose used against the nephrotoxicity: decreased serum levels of creatinine (1.8 ± 0.5 vs 2.7 ± 0.9) and urea (181.1 ± 65.6 vs 274.3 ± 91.81), reversed the increase in FENa^+ (0.58 ± 0.30 vs 1.03 ± 0.39) and FEK^+ (64.74 ± 52.44 vs 134.4 ± 54.94), reversed the decrease of creatinine clearance (0.41 ± 0.14 vs 0.073 ± 0.048), decreased MDA levels (90.22 ± 20.82 vs 133.9 ± 23.36) and increased GSH (1784 ± 297.4 vs 1267 ± 229.5), decreased the rate of acute tubular necrosis (2.0 ± 0.7 vs 3.6 ± 0.5), increased the expression of eNOS (2.2 ± 0.4 vs 0.6 ± 0.5) and Heme-oxygenase (2.6 ± 0.5 vs 1.4 ± 0.5). Therefore, occurred protection of renal function, protection of the tubular damage and oxidative stress. These results describe for the first time the effect of Red Propolis on a model of AKI induced by I/R, suggesting the protective effect of the extract against this type of injury.

Keywords: Red Propolis, Acute Kidney Injury, Ischemia/Reperfusion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Rins e Lesão renal Aguda	13
1.2 Lesão por Isquemia	17
1.3 Lesão por Reperfusão	22
1.4 Estresse Oxidativo	23
1.4.1 Radicais livres	24
1.4.2 Defesas antioxidantes	25
1.5 Própolis Vermelha	27
1.5.1 Histórico	28
1.5.3 Composição química	29
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Animais de experimentação	33
4.2 Modelo Isquemia/Reperfusão Renal	33
4.3 Substâncias utilizadas	34
4.4 Grupos Experimentais	34
4.5 Avaliação da função renal	36

4.6 Avaliação da função tubular	38
4.7 Dosagem de MDA urinário (TBARS)	39
4.8 Determinação da concentração de MDA no tecido renal	39
4.9 Determinação da concentração de Glutathione Reduzida (GSH) em tecido renal	40
4.10 Análise Histológica	41
4.11 Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e para Heme-oxigenase	41
4.12 Análise estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre os marcadores de função renal	44
5.1.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre os valores de creatinina e uréia plasmático após LRA induzida por I/R (Isquemia e Reperfusão).	45
5.1.2 Efeito da Própolis Vermelha no <i>Clearance</i> de creatinina após Lesão Renal Aguda induzida por I/R.	44
5.1.3 Efeito da Própolis Vermelha sobre a função tubular após LRA por I/R.	45
5.2 Efeito da Própolis Vermelha sobre o perfil do dano oxidativo	46
5.2.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre os níveis de MDA urinário após a Lesão Renal Aguda.	46
5.2.2 Efeito da Própolis Vermelha sobre os níveis de MDA no tecido renal após a LRA.	47
5.2.3 Efeito da Própolis Vermelha nos níveis de Glutathione reduzida (GSH) após a LRA por I/R.	48

5.3 Análise Histológica	49
5.4 Análise Imunohistoquímica	51
5.4.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre a expressão de eNOS	51
5.4.2 Efeito da Própolis Vermelha sobre a expressão de Heme-oxigenase	53
6 DISCUSSÃO	58
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
8 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mecanismos envolvidos no dano por isquemia.	20
FIGURA 2	Protocolo de indução da Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperusão.	34
FIGURA 3	Representação esquemática do protocolo experimental.	36
FIGURA 4	Efeito da Própolis Vermelha na função renal após LRA por I/R.	46
FIGURA 5	Efeito da Própolis Vermelha na taxa de filtração glomerular após LRA por I/R.	47
FIGURA 6	Efeito da Própolis Vermelha sobre a função tubular ($FENa^+$).	45
FIGURA 7	Efeito da Própolis Vermelha sobre a função tubular (FEK^+).	46
FIGURA 8	Efeito da Própolis Vermelha sobre os valores de malondealdeído urinário.	47
FIGURA 9	Efeito da Própolis Vermelha sobre os valores de malondealdeído no tecido renal.	48
FIGURA 10	Efeito da Própolis Vermelha nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) após LRA por I/R.	49
FIGURA 11	Fotomicrografia de rim de rato ao final do experimento de Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperusão.	50
FIGURA 12	Efeito da Própolis Vermelha sobre o escore de necrose tubular após lesão por I/R.	51
FIGURA 13	Fotos representativas das lâminas de imunohistoquímica para eNos	52
FIGURA 14	Efeito da Própolis Vermelha sobre a expressão de eNOS após	53

Lesão Renal Aguda causado por I/R.

FIGURA 15	Fotos representativas das lâminas de imunohistoquímica para heme-oxigenase.	53
FIGURA 16	Efeito da Própolis Vermelha sobre a expressão de heme-oxigenase após Lesão Renal Aguda por I/R.	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Classificação RIFLE (<i>Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage</i>)	15
TABELA 2	Classificação AKIN (<i>Acute Kidney Injury Network</i>)	15
TABELA 3	Fatores responsáveis pelas LRAs com causas em origens intrínsecas.	17

1 INTRODUÇÃO

1.1 Rins e Lesão Renal Aguda

Os rins são órgãos complexos, com função principalmente reguladora, essenciais para a homeostase do organismo. Dentre as principais funções renais estão a excreção e reabsorção de substâncias, regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, controle da pressão sanguínea, eritropoiese e vitamina D, homeostase do cálcio, manutenção do equilíbrio ácido básico, dentre outras (BERNE & LEVY, 2009). No entanto, certas complicações patológicas são responsáveis por danificarem a estrutura e diminuírem a atividade funcional dos rins, desencadeando uma condição clínica denominada antes de insuficiência renal aguda, sendo modernamente referida como Lesão Renal Aguda (LRA).

A LRA é uma síndrome clínica comum caracterizada pela rápida deterioração das funções tubular e glomerular, sendo relacionada com um rápido declínio na taxa de filtração glomerular (TGF), ocorrendo geralmente ao longo de horas ou dias, e que resulta na retenção de compostos nitrogenados resultantes dos processos metabólicos orgânicos, tais como a uréia e a creatinina, ou outras manifestações laboratoriais e clínicas que podem incluir alteração do volume de líquido extracelular e diminuição ou perda dos principais mecanismo reguladores eletrolítico (SINGH *et al*, 2012), possuindo como causas frequentes a isquemia e a nefrotoxicidade associada à alta morbidade e mortalidade (BELLOMO *et al*, 2004).

Atualmente, as doenças renais assumiram importância global em virtude do crescimento exponencial no número de casos registrados. Essas doenças acarretam, considerando maior morbi-mortalidade e uso de terapias de alta complexidade, significativo ônus financeiro ao sistema de saúde, tanto público como privado (RAJAN *et al*, 2012). Nesse contexto, a Lesão Renal Aguda é uma complicação importante e frequente em pacientes internados em ambiente hospitalar. Seu impacto é resultante de maior tempo de permanência no leito hospitalar e terapias de suporte de alto custo, retardando o processo de recuperação e expondo-os a sobrecarga circulatória, hipercalcemia, acidose metabólica, complicações neurológicas e aumento do risco de mortalidade (CHAWLA *et al*, 2011). Em pacientes hospitalizados, em torno de 1-5% desenvolvem essa síndrome (KRIBBEN *et al*, 2003). A significância clínica da LRA resulta de sua alta taxa de mortalidade, que atualmente varia de 30-70% (KELLUM,

2008). Mesmo com a capacidade de recuperação renal em pacientes que sofreram LRA, o evento pode comprometer a sobrevivência à longo prazo, elevando o risco individual para desenvolver lesão renal crônica, doença cardiovascular e morte (COCA *et al*, 2009).

Segundo LAMEIRE *et al*. (2013) a pré-existência de doença renal crônica e/ou situações que manifestem redução da TFG, proteinúria e depleção de volume, são fatores de riscos comuns e importantes, tanto em jovens como em idosos para o desenvolvimento de lesão renal aguda. Outros fatores que contribuem para a manutenção do quadro de LRA são cirurgia vascular, hipovolemia, aterosclerose, diuréticos, insuficiência cardíaca congestiva, peritonite, obstrução ileal, cirurgia biliar, icterícia, diabetes mellitus, isquemia/reperfusão, sepse, dentre outros (SINGH *et al*, 2012).

Em 2002, como primeira tentativa de criar uma definição internacional sobre os achados clínicos na LRA, criou-se a classificação de LRA segundo critérios abreviados como RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage*) (tabela 01). Essa classificação considera três estágios de severidade (*Risk, Injury, Failure*), que se referem a critérios de diagnóstico e determinação da gravidade da LRA, e baseia-se no aumento da creatinina sérica e na produção de urina, bem como dois estágios finais (*Loss, End-Stage*), relacionados com critérios de evolução clínica do paciente e são determinados pela duração da perda da função renal. (KELLUM, 2011).

Este critério foi subsequentemente modificado pelo critério AKIN (*Acute Kidney Injury Network*) (tabela 02), objetivando aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, que caracterizou a LRA pela redução abrupta da função renal (dentro de 48 horas) com o aumento absoluto de 0,3 mg/dL no nível de creatinina sérica e por redução na produção de urina (MEHTA *et al*, 2007). Por causa dessas iniciativas, foi proposta a substituição do termo Insuficiência Renal Aguda (IRA) para Lesão Renal Aguda, visando enfatizar o espectro clínico inteiro, incluindo desde a presença de estágios progressivos de lesão tecidual até a perda da função renal e estabelecimento da doença (MEHTA *et al*, 2007; KELLUM *et al*, 2011).

Tabela 1 Classificação proposta para lesão renal aguda – RIFLE.

Classificação RIFLE	Critério TGF	Diurese
<i>Risk</i>	Aumento da SCr x 1.5 ou diminuição da TGF > 25%	diurese < 0,5ml/Kg/h em 6h
<i>Injury</i>	Aumento da SCr x 2 ou diminuição da TGF > 50%	diurese < 0,5ml/Kg/h em 12h
<i>Failure</i>	Aumento da SCr x 3 ou diminuição da TGF > 75% ou SCr > 4mg/dL	diurese < 0,3mg/Kg/h em 24h ou anúria por 12h
<i>Loss</i>	Perda completa da função renal > 4 semanas	
<i>End-Stage kidney disease</i>	Necessidade de TSR > 3 meses	

TGF – Taxa de Filtração Glomerular; SCr – Creatinina sérica; TSR – Terapia de Substituição Renal.

Tabela 2 Classificação proposta para Lesão Renal Aguda (AKIN).

Classificação AKIN	Critério SCr	Diurese
1	Aumento da SCr > 0,3 ou aumento > 1,5 a 2 x do valor basal	< 0,5 ml/Kg/h em > 6h
2	Aumento da SCr > 2 a 3 x do valor Basal	< 0,5 ml/Kg/h em > 12h
3	Aumento da SCr > 3 x do valor basal ou SCr > 4,0 mg/dL com um aumento agudo de pelo menos 0,5 mg/dL	< 0,3 ml/Kg/h em 24h ou anúria por 12h

SCr – Creatinina Sérica.

As causas de LRA podem ser de origem pré-renal, renal (intrínseca) e pós-renal (ABUELO, 2007). Falha pré-renal é causada por uma série de eventos que culminam com a diminuição do volume circulante e, portanto, do fluxo sanguíneo renal. É uma resposta funcional de um rim estruturalmente intacto à hipoperfusão, sendo esta a principal causa pré-renal de LRA, contribuindo para a ocorrência de aproximadamente 50% dos casos da doença (DEVARAJAN *et al*, 2006). As causas mais frequentes são desidratação (vômito, diarreia e febre), uso de diuréticos e insuficiência cardíaca, vasoconstrição intra-renal primária e obstrução reno-vascular. O seu diagnóstico é imprescindível, já que existe reversibilidade nesses casos, em um a dois dias e, se persistir, pode desencadear NTA (BONVENTRE, 2011).

LRA pós-renal ocorre por obstrução do trato urinário, causando interrupção do fluxo urinário, como ocorre em condições de hipertrofia prostática e cálculo renal. A importância do diagnóstico nesta patologia é a reversibilidade da insuficiência renal quando se utiliza o tratamento apropriado mais precocemente possível (HUMPHREYS *et al.*, 2005).

A LRA desencadeada por fatores intrínsecos (renal) ao rim é classificada de acordo com o principal local afetado (túbulos, interstício, vasos ou glomérulo) que, depois da pré-renal, é a segunda modalidade mais comum de LRA. Em torno de 70% a 90% dos casos deste tipo de LRA tem como causas comuns o dano tubular de origem isquêmica ou tóxica desencadeando a Necrose Tubular Aguda (NTA). Além disso, caracteriza-se por perda quase total, porém reversível, da função renal, que incluem todas as formas de lesões ao parênquima renal (tabela 03) (COSTA *et al.*, 2003; HUMPHREYS *et al.*, 2005).

A causa mais frequente de LRA renal em pacientes hospitalizados é de origem isquêmica (isquemia reperfusão-IRI) (CHERTOW *et al*, 2005; LAMEIRE *et al*, 2005; SCHRIER *et al*, 2004).

Tabela 3 Fatores responsáveis pelas LRAs com causas em origens intrínsecas.

Insuficiência renal aguda: (Renal ou intrínseca)	Causas
1- Hemodinâmicas:	➤ Politraumatismos, hemorragias, choque séptico, pancreatite, gastroenterite.
2-Nefrotóxicas:	➤ Antibióticos (aminoglicosídeos, tetraciclina, anfotericina, aciclovir) chumbo, ouro, deposição tubular de cálcio, ácido úrico, contrastes radiográficos, DAINES.
3- Venenos:	➤ Pesticidas, herbicidas, peçonhas.
4- Agentes nefrotóxicos endógenos:	➤ Mioglobina, hemoglobina, metahemoglobina.
5 – Isquemia	➤ Transplante renal, cirurgia vascular renal, insuficiência cardíaca.

Fonte: adaptado de PANNU *et al.*, (2008).

DAINES – Drogas anti-inflamatórias não esteroidais.

1.2 Lesão por Isquemia

A isquemia é definida como sendo a fluxo arterial restrito ou insuficiente para manter as funções teciduais normais, por meio da diminuição da oferta de oxigênio e nutrientes tais como glicose, proteínas, vitaminas, dentre outros, constituindo um dos mais importantes problemas enfrentados pela medicina, como o infarto agudo do miocárdio, a oclusão arterial aguda, a insuficiência vascular periférica e no transplante de órgãos (MAXWELL, 1997). A Isquemia pode ser total, quando o fluxo arterial é insuficiente para manter a vida celular, ou parcial, quando mantém a viabilidade, mas com risco de evoluir para morte celular dependendo da nobreza do tecido, do tempo de duração da isquemia, da demanda metabólica dos tecidos atingidos e da ausência de circulação colateral compensatória (BLANTZ *et al*, 2007). Os rins, quando comparado a

outros órgãos, são particularmente mais sensíveis à isquemia. Dessa forma, a oferta limitada de sangue e oxigênio por curtos períodos de tempo pode deflagrar a instalação de lesão renal aguda.

A lesão renal aguda isquêmica envolve mecanismos fisiopatológicos complexos como alterações na hemodinâmica renal, disfunção tubular, lesão de células endoteliais, ativação da resposta inflamatória e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Acontece nas várias intervenções cirúrgicas em que a irrigação sanguínea renal é interrompida. A lesão ocorre durante transplantes renais, intervenções cirúrgicas vasculares na aorta e nas artérias renais e na nefrectomia parcial. Nos transplantes renais, a incidência de disfunção do enxerto, rejeição aguda e nefropatias crônicas estão relacionadas com o grau de lesão isquêmica e aumenta proporcionalmente com o tempo de isquemia. Nas nefrectomias parciais, embora o objetivo seja a preservação da função renal, a lesão da isquemia frequentemente ocorre no parênquima renal remanescente, devido ao clampeamento da artéria renal, realizado com o objetivo de diminuir sangramento e permitir adequada visualização do campo operatório (FOLEY & CHARI, 2007; DESAI *et al*, 2005). Na clínica, a isquemia renal está frequentemente associada à disfunção de múltiplos órgãos e à sepse (BONVENTRE & WEINBERG, 2003). Segundo a definição *RIFLE*, aproximadamente dois terços dos pacientes evoluem com diagnóstico de LRA em unidades de terapia intensiva e de 4 a 5% desses pacientes recebem suporte de terapias de substituição renal (TSR).

Estudos pré-clínicos em animais reproduzem o quadro de LRA isquêmica por meio de um modelo de isquemia/reperfusão (I/R), onde o fluxo sanguíneo renal é interrompido com o uso de *clamps* vasculares durante 20 a 60 minutos, seguindo um período de reperfusão (HOSTE *et al*, 2008; HEYMAN *et al*, 2010). Estudos experimentais mostraram que tanto a isquemia como o re-estabelecimento do fluxo sanguíneo (reperfusão) nos rins que sofreram esse processo após preservações hipotérmicas, ativam uma complexa sequência de eventos que sustenta a lesão renal e têm um papel central no desenvolvimento da lesão renal aguda (SECIN, 2008). Estudos prévios em modelos animais demonstraram que as consequências da I/R dependem do tempo de isquemia e da intensidade, resultando em diversas alterações bioquímicas e necrose celular. A Necrose Tubular Aguda (NTA) representa a característica mais marcante do dano renal isquêmico, embora seja passível de recuperação completa

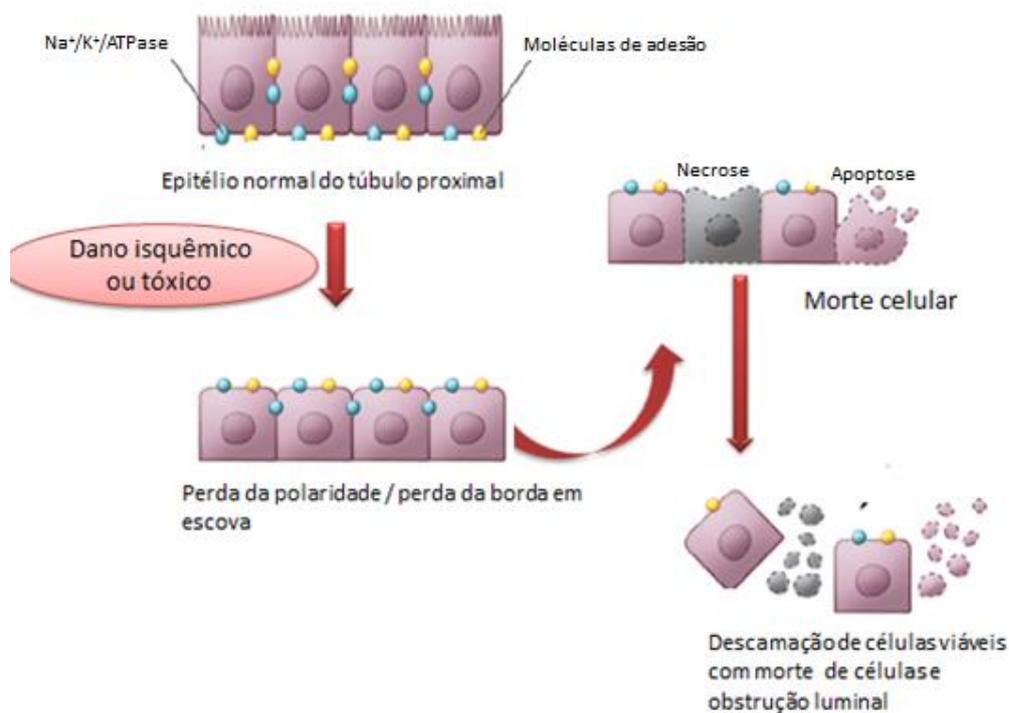
graças à capacidade de regeneração das células tubulares (TORRAS *et al.*, 1999). Na histologia de tecidos renais, os achados mais evidentes da isquemia são o edema, a vacuolização celular, as alterações na “borda em escova” das células do epitélio tubular renal e o infiltrado de células inflamatórias (BONVENTRE, 2008).

A isquemia leva à hipóxia tecidual e ao metabolismo anaeróbico. A diminuição da fosforilação oxidativa leva ao consumo das reservas de ATP e interrupção de todas as funções celulares dependentes de energia. Logo, o dano relacionado à privação de oxigênio resulta em lesões com rápida perda de polaridade celular e integridade do citoesqueleto, alterações na borda em escova no túbulo proximal (Fig. 01), danos no funcionamento das moléculas de adesão e em outras proteínas de membrana (Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$), seguidos de apoptose e necrose. Distúrbios na bomba de sódio-potássio são causados devido à depleção de ATP, necessário para o seu funcionamento normal, que por sua vez é essencial para manter a alta concentração intracelular de potássio e baixa concentração de sódio. Quando a bomba de sódio-potássio está prejudicada, cloreto de sódio (NaCl) e água difunde passivamente para o interior da célula, resultando em edema e dano na membrana citoplasmática (MAXWELL, 1997).

Muitas das lesões isquêmicas envolvem as células do túbulo proximal, sendo a causa primária responsável pela ativação dos principais mecanismos fisiopatológicos que levam à perda da TFG durante as LRAs, como discutido anteriormente. O segmento proximal e o ramo ascendente espesso medular da alça de Henle são as regiões do rim que são alvos de dano isquêmico (WALKER e ENDRE, 2008).

Consideravelmente, parte das lesões que atingem a região do túbulo proximal ocorre por NTA. Embora o termo NTA não seja completamente apropriado, é utilizado universalmente para designar o quadro clínico de IRA provocado por lesão isquêmica, cuja reversão imediata não ocorre após a remoção da causa inicial. A NTA é provocada por isquemia em 50% dos casos e por nefrotoxicidade em 35% (COSTA *et al.*, 2003).

Fig. 1 Mecanismos envolvidos no dano por isquemia.



Fonte: adaptado: BONVENTRE, (2008)

As mitocôndrias também são alvos importantes de lesões agudas causadas por processo de isquemia (KONOPKA, 2007). Dentro desta organela há uma diminuição do NADH, ATP e atividade da ATP sintetase, além de aumentar a atividade da fosfolipase A₂. Além disso, ocorre um acúmulo de cálcio e um aumento na produção de radicais livres pela mitocôndria. A associação entre estes eventos pode ser responsável pelas lesões e pela morte celular, possivelmente devido ao fenômeno de transição da permeabilidade da membrana interna da mitocôndria.

É considerável a presença de eventos inflamatórios nessa fisiopatologia, onde as moléculas de adesão de leucócitos desempenham um papel crítico e, a capacidade dos próprios leucócitos ativados em estimular citocinas (BONVENTRE, 2013). É bem descrito para lesões isquêmicas o dano tecidual e lesão aos capilares, além de extravasamento, o que poderia contribuir para a congestão vascular que é geralmente observada (BELLOMO, 2004).

A isquemia causa uma estimulação da produção de neutrófilos, acompanhados de radicais livres de oxigênio, sendo os principais eventos que resultam na lesão. Sob condições isquêmicas, uma redução no suprimento de oxigênio causa um aumento na aderência de neutrófilos em células tubulares endoteliais (MILHOAN *et al*, 1992; LUCCHESI, 1987; GOLDMAN *et al*, 1991) devido a uma expressão de moléculas de adesão aumentada na superfície dessas células, resultando na diapedese dos neutrófilos e produção de radicais livres de oxigênio (PATERSON *et al*, 1989). Adicionalmente aos efeitos citotóxicos diretos causados pela hipóxia, a isquemia renal induz uma reação inflamatória resultante da síntese de enzimas e citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α), resultante do acúmulo de cálcio intracelular (TAKADA *et al*, 1997; DONNAHOO *et al*, 1999; DAEMEN *et al*, 1999; KOFLER *et al*, 2003).

Muitas das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), produzidos por isquemia, ativam os mecanismos de sinalização que resulta na síntese de TNF- α (DONNAHOO *et al*, 2000). TNF- α é uma citocina pró-inflamatória capaz de regular a sua própria expressão, bem como a expressão de outros genes importantes na resposta inflamatória (DONNAHOO *et al*, 1999). TNF- α , junto com a isquemia, aumentam a atividade da enzima iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzida) para sintetizar o óxido nítrico (SANDERS *et al*, 2001; MORRISSEY *et al*, 1994).

O óxido nítrico está envolvido na fisiopatologia da LRA por I/R. Expressão aumentada da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) possui um papel crucial na indução da lesão renal, enquanto que uma redução na atividade da Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) contribui para o dano resultante da disfunção endotelial (HEEMSKERK *et al*, 2009).

A Lesão por isquemia também é caracterizada por uma série de eventos vasculares, incluindo alterações no tônus vascular, aumento da permeabilidade vascular a proteínas plasmáticas, alterações estruturais no túbulo renal e acúmulo de neutrófilos ativados devido a expressão aumentada de moléculas de adesão para neutrófilos (RABB *et al*, 1997). As alterações vasculares desencadeadas pela isquemia são decorrentes de mecanismo vasoconstritor autônomo envolvendo resposta exacerbada a agentes

vasoconstritores como endotelina, angiotensina II, adenosina e resposta diminuída a agentes vasodilatadores como acetilcolina, óxido nítrico e bradicinina.

Lesão Renal Aguda *Isquêmica* (LRAi) é o mais frequente tipo de lesão renal aguda em pacientes hospitalizados. Embora a hipoperfusão renal primeiramente afeta a função e estrutura do epitélio tubular, alterações da microvasculatura e resposta inflamatória dentro do espaço intersticial são de particular importância considerando a restauração pós-isquêmica da função renal.

1.3 Lesão por Reperfusão

A reperfusão de áreas isquêmicas pode contribuir para o estabelecimento da LRA, sendo chamado de lesão por reperfusão, podendo causar um dano maior àquele gerado apenas pela isquemia (ABELA *et al*, 2003). A reperfusão exacerba o processo inflamatório iniciado com a instalação da isquemia, correspondente a um infiltrado onde predominam leucócitos mononucleados, e também promove a liberação de várias citocinas, que estimulam a expressão de moléculas de adesão (ICAM – moléculas de adesão intracelular), principalmente as selectinas, que ativam a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, aumentando a inflamação. Os leucócitos aderidos liberam radicais livres e mediadores inflamatórios, incluindo fatores de ativação plaquetários e leucotrienos (BONVENTRE *et al*, 2004).

O mecanismo de lesão tecidual mediado por radicais livres, iniciado pelo processo de isquemia, acontece principalmente após a readmissão do oxigênio, pela reperfusão. Em condições não-isquêmicas, a atividade da enzima xantina oxidase é muito baixa. Entretanto, quando o tecido é submetido à isquemia, a atividade dessa enzima aumenta rapidamente devido à formação da xantina desidrogenase e do aumento da produção de hipoxantina formada pela depleção de ATP no processo de isquemia. Logo, a xantina oxidase catalisa a reação que forma xantina e superóxido a partir da hipoxantina em combinação com o oxigênio proveniente da reperfusão. O superóxido, pela ação da enzima SOD (Superóxido Dismutase), forma peróxido de hidrogênio. Quando o peróxido de hidrogênio não é transformado em água pela catalase, forma facilmente o radical livre hidroxila, que é altamente tóxico e reativo. O acúmulo de hipoxantina, decorrente da quebra do ATP, não se traduz na formação do superóxido sem a presença do oxigênio advindo da reperfusão. Logo, a lesão tecidual pelo estresse

oxidativo só se estabelece com a reperfusão (BULKLEY, 1987). O principal processo pelo qual o radical livre hidroxila provoca esse dano é a peroxidação lipídica, que ocorre pela reação dos radicais livres com os lipídios que formam as membranas mitocondriais e celulares. Espécies reativas de oxigênio, como os radicais livres, também danificam estruturas como proteínas, macromoléculas não protéicas e a molécula de DNA, que uma vez oxidada, pode sofrer danos irrecuperáveis que levam à morte celular (MURPHY, 2009).

Dessa forma, a lesão por isquemia/reperfusão (I/R) pode ser definida como todas as alterações resultantes da interrupção e do re-estabelecimento do fornecimento de oxigênio para tecidos e órgãos, uma vez que a isquemia inicia a lesão por meio da privação da energia necessária para a manutenção do gradiente iônico e da homeostase celular, enquanto a reperfusão agrava essa lesão exacerbando reações inflamatórias e envolvendo radicais livre de oxigênio.

Lesão induzida por I/R é o principal fator etiológico de LRA e responsável por 72% dos casos, afetando significativamente a morbidade e mortalidade dos pacientes em diversas situações clínicas, incluindo transplante renal, medicina intensiva, cirurgias renais, vasculares e sepse (CONG *et al*, 2012). Além disso, a isquemia está associada com a diminuição da sobrevida do enxerto em pacientes com rins transplantados e com a alta morbidade e mortalidade em pacientes com rins nativos (WEVER *et al*, 2011).

1.4 Estresse Oxidativo

Organismos pluricelulares, como os mamíferos, desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos de transporte de oxigênio para os tecidos. No meio celular, o oxigênio molecular é difundido até as mitocôndrias, onde tem o papel fundamental de receber os elétrons extraídos dos substratos, por meio de diferentes reações enzimáticas. Estas reações, de oxidação e redução, ocorrem simultaneamente na célula e estão acopladas de tal maneira que possibilitam uma transferência eficiente e controlada de parte da energia armazenada nas ligações químicas dos substratos para o ATP (Adenosina Trifosfato), que quando hidrolisado fornece energia para que ocorram as diversas funções celulares (OLIVEIRA *et al*, 2004). Nesse processo, tem-se sempre a formação de espécies intermediárias de oxigênio, com potencial citotóxico, chamadas

de espécies reativas de oxigênio (EROs). Na cadeia de transporte de elétrons do processo respiratório, grande parte do oxigênio é reduzido à água, em uma reação catalisada pela enzima citocromo-oxidase, com produção de energia. Entretanto, uma pequena parte (2-5%) deste oxigênio pode sofrer redução univalente sequencial, formando EROs e radicais livres (ALESSIO, 1999).

1.4.1 Radicais livres

Radicaais livres são estruturas químicas com elétrons desemparelhados, tornando-os muito instáveis, extremamente reativos e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com diversas moléculas integrantes da estrutura celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Radicaais livres de oxigênio, assim como os de bromo e de nitrogênio, são exemplos de radicais livres. Espécies reativas incluem não só radicais livres, mas também não radicais que são agentes oxidantes, ou ainda que sejam facilmente convertidos a radicais. Alguns exemplos são:

- Espécie reativa de oxigênio do tipo radical livre: superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}).
- Espécie reativa de nitrogênio do tipo radical livre: óxido nítrico (NO^{\bullet}) e nitrato ($NO_3^{\bullet-}$).
- Espécie reativa de oxigênio não radical livre: peróxido de hidrogênio (H_2O_2).
- Espécie reativa de nitrogênio não radical livre: peroxinitrato ($O_2NOO^{\bullet-}$).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e os sistemas de defesas antioxidantes (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004), e pode resultar de:

- Diminuição dos níveis de antioxidantes: mutações afetando a atividade de defesa de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), ou glutatona peroxidase (GPx), ou toxinas que destroem as defesas antioxidantes. Por exemplo, muitos xenobióticos são metabolizados por conjugação com a glutatona reduzida (GSH). Altas doses podem esgotar o GSH e causar estresse oxidativo mesmo se o próprio xenobiótico não for capaz de gerar espécies reativas. Deficiências na dieta

de minerais (Ferro, Zinco, Magnésio, Cobre) e/ou antioxidantes podem causar estresse oxidativo.

- Aumento na produção de compostos oxidantes: exposição de células ou organismos a elevados níveis de oxigênio ou a outras substâncias que são espécies reativas (NO_2^*) ou são metabolizadas para gerar espécies reativas (Paraquat), ou excessiva ativação de sistemas naturais produzindo tais espécies (ativação inapropriada de células fagocíticas em doenças inflamatórias crônicas).

O papel dos radicais livres no processo de isquemia e reperfusão, causando lesão tecidual, têm sido extensamente estudados nos rins (SOUTHARD *et al*, 1991) e, recentemente, o interesse científico voltou-se para uma possível prevenção dessa lesão por agentes farmacológicos, inclusive em pacientes transplantados (FERREIRA *et al*, 1994).

1.4.2 Defesas Antioxidantes

O oxigênio pode causar danos ao organismo, logo, os organismos aeróbios só conseguem sobreviver na sua presença por terem desenvolvido defesas antioxidantes. Normalmente, em indivíduos saudáveis, existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes controlam os níveis de espécies reativas, permitindo que estas desempenhem seu papel dentro do metabolismo normal. Entretanto, há situações que perturbam esse equilíbrio, seja através da diminuição das defesas antioxidantes, seja pelo aumento das espécies reativas ou mesmo da combinação de ambos, resultando no estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As consequências do estresse oxidativo incluem:

- Lipoperoxidação na membrana celular,
- Oxidação de proteínas,
- Dano celular (este envolve dano em diferentes alvos moleculares: lipídio, DNA, proteína, carboidrato, etc,
- Morte celular. O dano oxidativo, principalmente no DNA, pode desencadear a morte celular, por necrose ou apoptose. Porém, a célula pode se recuperar do dano

oxidativo por reparação ou pela substituição das moléculas danificadas, ou pode sobreviver mesmo com o dano oxidativo persistente.

Os antioxidantes podem ser produzidos internamente (endógenos) ou adquiridos na dieta (exógenos), onde destacam-se o β -caroteno (vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), alguns metais como cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) (BELZER & SOUTHARD, 1988). HALLIWELL e GUTTERIDGE (1999) definiram um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, retarda significativamente ou impede a oxidação do referido substrato. As principais enzimas antioxidantes são:

- Superóxido Dismutase (SOD): os eritrócitos são capazes de remover o radical superóxido cataliticamente através da enzima SOD contendo cobre e zinco (CuZnSOD).

- Catalases (CAT): as catalases catalisam diretamente a reação que transforma o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

- Outras peroxidases: contribuem com o sistema antioxidante por prevenirem o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Incluem o citocromo C peroxidase, o NADH oxidase, e outras inespecíficas como as mieloperoxidases (MPO).

Para proteção celular, o organismo dispõe de um sistema de defesa composto por enzimas que atuam desintoxicando os agentes agressores. Dentre os responsáveis por exercer essa proteção, através de uma ação antioxidante, temos a enzima GSH (PAGLIUSO *et al*, 2006; KOVACIC *et al*, 2008).

A GSH é um tripéptido (L- γ -glutamil- L-cysteinyl - glicina) que está presente na maioria das células. Representa o tiol não proteico mais abundante nas células de mamíferos, considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula e tem como ação participar das reações redox celulares (LEITE *et al*, 2003; SANTANGELO *et al*, 2004).

Este peptídeo antioxidante é sintetizado no citoplasma e está presente em concentrações mais elevadas na matriz mitocondrial. Os baixos níveis de GSH podem estar diretamente relacionados com o aumento de EROS, peroxidação lipídica e presença de radicais hidroxilas (SAID, 2011).

Durante o processo de estresse oxidativo, algumas proteínas exercem um efeito renoprotetor contra o dano oxidativo e, entre estas proteínas, o papel citoprotetor da heme-oxigenase é enfatizado (BOLISSETTY *et al*, 2010).

A heme-oxigenase (HO-1) é a enzima limitante responsável pela degradação do grupo heme, um complexo de ferro-porfirina derivada de várias proteínas heme, em ferro, facilitando a conversão de heme para biliverdina. Essa conversão ocorre com a abertura do anel de heme na presença de NADPH, liberando o ferro e monóxido de carbono. Subsequentemente, a biliverdina é convertida para bilirrubina sob ação da enzima biliverdina redutase (KANWAR, 2001). A indução de HO-1 é considerada como modulador da resposta adaptativa e protetora de uma célula na presença de uma lesão oxidativa ou inflamatória (AGARWAL *et al*, 2000).

A enzima HO-1 está associada a vários processos patológicos, incluindo a LRA. Nos últimos anos, os investigadores foram capazes de demonstrar que a expressão da HO-1 é aumentada em condições associadas com o estresse oxidativo, como foi relatado no estudo de YANG *et al* (2013), que relatou um aumento nos níveis de HO-1 após LRA por I/R, e que os produtos finais da heme degradação, incluindo a biliverdina e bilirrubina, fornecem proteção contra lesão renal por I/R através de suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias (KIRBY *et al*, 2006). Logo, uma expressão aumentada dessa enzima aumenta a resistência contra a ameaça oxidativa (LEE *et al*, 2005).

1.5 Própolis Vermelha

A palavra própolis é derivada do grego pro-, em defesa, e polis-, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade. A própolis brasileira é coletada e produzida pelas abelhas *Apis mellifera*, sendo uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico de diversas fontes vegetais, como ramos, flores e exsudatos de árvores. Além desses materiais, na colméia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas (FRANCO *et al*, 2000; PEREIRA *et al*, 2002)

Ela é usada na colméia para reparar frestas ou danos, no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e na proteção contra a entrada de intrusos e predadores (WATSON *et al*, 2006). A composição da própolis varia de acordo com sua origem botânica, contendo, de um modo geral, 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30- 40%

de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (PARK *et al*, 2002; BURDOCK, 1998; FUNARI *et al*, 2006; WOISKY & SALATINO, 1998).

Os diferentes tipos de própolis brasileiras são classificadas em 12 grupos, baseados nas suas características físico-químicas (PARK *et al*, 2000). Entretanto, um 13º grupo, que inclui a própolis vermelha, foi criado, sendo esta encontrada pelo Nordeste brasileiro. Possui origem botânica da planta *Dalbergia ecastophylum*, responsável pela cor vermelha desse tipo de própolis (DAUGSCH *et al*, 2008; FRANCHI *et al*, 2012; PICCINELLI *et al*, 2011).

A própolis é usada em várias partes do mundo onde é indicada para melhorar a saúde e prevenir doenças como inflamação, doenças do coração, diabetes e câncer (KADOTA *et al*, 2002). Problemas tratados com própolis incluem halitose, eczema, infecções na garganta, úlceras e infecções urinárias (PEREIRA *et al*, 2002). Atualmente, a própolis é usada como um medicamento popular e está disponível na forma de cápsulas, como um extrato (hidroalcoólico ou glicólico), como enxaguatório bucal, na forma de pó, entre outras (CAPASSO & CASTALDO, 2002; SOARES *et al*, 2006).

1.5.1 Histórico

A própolis é um dos diversos produtos naturais que vem sendo utilizado há séculos pelo homem (VARGAS *et al*, 2004). Foi primeiramente reconhecida por suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno (CAPASSO & CASTALDO, 2002). O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 a.C. (DA SILVA *et al*, 2006). Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas (DA SILVA *et al*, 2006). Na metade dos anos 80, a própolis tornou-se um importante produto na medicina alternativa e complementar, sendo o Japão o principal importador de própolis, com preferência pela própolis brasileira (SALATINO *et al*, 2005). Em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e sua

“composição”, indexado no *Chemical Abstracts*. Em 1968 surgiu no *Chemical Abstracts* o resumo da primeira patente utilizando a própolis (Romena®, para a produção de loções para banho). Até meados do ano 2000, o número de trabalhos publicados citados no *Chemical Abstracts* totaliza 450, oriundos de 39 países (dos cinco continentes), além de 239 patentes (FRANCO *et al*, 2000). No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu somente na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrando em seu livro, “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (LIMA, 2006).

1.5.2 Composição Química

A análise de numerosas amostras diferentes de própolis revela que a composição química é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da vegetação de cada região visitada pelas abelhas (PARK *et al*, 2002) e com o período de coleta da resina (ROCHA *et al*, 2003). Além disso, a variabilidade genética das abelhas rainhas também influencia na composição química (PARK *et al*, 1998). Deste modo, um número significativo de trabalhos com a química da própolis foi publicado para entender que sua composição varia grandemente e depende da flora local e da região de coleta (MOREIRA, 1986; BANKOVA, 2005; SOUSA *et al*, 2007).

A composição química da própolis vermelha inclui compostos fenólicos, triterpenóides, pterocarpanos, chalconas, isoflavonóides (como a galangina, quercetina, pinocembrina, kaempferol), terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (HU *et al*, 2005; HAYACIBARA *et al*, 2005; OZKUL *et al*, 2004; MATSUDA *et al*, 2002). Há também na sua constituição elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI *et al*, 1996). De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos compostos polifenólicos (LIMA, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Existem diversos relatos importantes, nos quais o processo de isquemia e reperfusão renal estão implicados como uma causa importante para a gênese de LRA por NTA, envolvendo numerosos mecanismos de nefrotoxicidade (COLLINO *et al*, 2013; SANDHI *et al*, 2013). Estudos recentes têm identificado uma variedade de substâncias incluindo a eritropoietina (HU *et al*, 2012) e a glutamina (ESPOSITO *et al*, 2011) para o tratamento do dano renal causado por I/R. Entretanto, a eficácia desses tratamentos existentes para esse tipo de lesão ainda é limitada e poucos protetores renais tem tido sucesso na aplicação clínica.

O modelo de LRA por Isquemia/Reperfusão como objeto de estudo é extremamente valioso, pois proporciona um processo de indução de dano tubular, além de desencadear efeitos agudos sobre a função renal em investigação.

Nas últimas décadas, foi observado um aumento, em todo o mundo, no uso de produtos naturais (HAYACIBARA *et al*, 2005). Dessa forma, a própolis vermelha se tornou potencial objeto de estudo farmacológico, demonstrando apresentar diversas atividades biológicas, como antibacteriano (BUENO-SILVA *et al*, 2013; RIGHI *et al*, 2011), antifúngico (SIQUEIRA *et al*, 2009), antiinflamatório (MOSSALAYL *et al*, 2013), antioxidante (FROZZA *et al*, 2013), dentre outros. Esse potencial biológico se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes da própolis (MARCUCCI *et al*, 1996). No entanto, estas ações ainda não foram completamente elucidadas sobre o quadro de LRA desencadeado por I/R, gerando assim um amplo interesse na utilização dos mesmos, principalmente no ponto de vista terapêutico.

Apesar de diferentes estudos demonstrarem diversos efeitos biológicos da própolis, a atividade antioxidante merece especial interesse devido a grande quantidade de compostos fenólicos, que são relatados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes encontrados na própolis (MANI *et al*, 2006; VICENTINO *et al*, 2007). Da SILVA *et al* (2006) sugerem que os flavonóides desempenham importante papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira, mas outros fatores poderiam estar envolvidos (CHOI *et al*, 2006).

Nesse contexto, o presente estudo vem na tentativa de demonstrar que algumas estratégias farmacológicas, quando adotadas, poderiam proporcionar benefício para a

problemática em questão, tendo como ênfase os agentes fitoterápicos antioxidantes, que têm se consolidado nessa procura. Portanto, esse trabalho tem como objetivo padronizar o modelo de lesão renal aguda induzida por Isquemia/Reperusão e avaliar o efeito nefroprotetor do extrato alcoólico de Própolis Vermelha, através de sua atividade antioxidante.

.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito nefroprotetor do extrato alcoólico de Própolis Vermelha na Lesão Renal Aguda induzida por Isquemia/Reperusão em um modelo animal *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de LRA por Isquemia/Reperusão em ratos.
- Verificar os possíveis efeitos protetores na função renal de ratos submetidos à indução de LRA por Isquemia/Reperusão.
- Verificar os biomarcadores tradicionais de lesão tubular.
- Avaliar o perfil oxidativo da lesão renal por Isquemia/Reperusão em ratos tratados com o extrato alcoólico de Própolis Vermelha.
- Verificar as possíveis alterações histológicas na presença do extrato alcoólico de Própolis Vermelha em ratos submetidos ou não à LRA por Isquemia/Reperusão.
- Verificar o efeito do Extrato alcoólico de própolis vermelha na expressão da eNOS e Heme-Oxigenase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos adultos machos Wistar (250-300g), fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para coleta da urina de 24h. Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará sob protocolo n° 39/13.

4.2 Modelo Isquemia/Reperusão Renal

Todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg i.p.). Durante a cirurgia, os animais foram colocados em uma manta térmica aquecida, para manter a temperatura controlada de aproximadamente 36°C. Uma laparotomia abdominal (Fig. 01) pela linha média foi realizada, e ambos os rins foram localizados visualmente (Fig. 02). Para induzir a isquemia, foi feita uma oclusão renal unilateral no rim esquerdo por 60min, por clampeamento da artéria renal, onde foi confirmada a isquemia pela mudança de cor no rim (Fig. 03). No rim direito foi realizada uma nefrectomia, logo após o início da isquemia. Após o término da isquemia, os animais foram imediatamente submetidos à sutura da incisão abdominal feito em duas camadas, músculo e pele, com fio de polipropileno 4.0 (PolipropyPoint®). O período de reperusão foi iniciado após o tempo de isquemia por liberação da circulação pela artéria renal (Fig. 04), e durou por 48h. O tempo escolhido para I/R foi o capaz de causar disfunção renal significativa e lesão do rim do animal, além de produzir uma característica patofisiológica reconhecida de insuficiência renal aguda (CHATTERJEE *et al*, 2000).

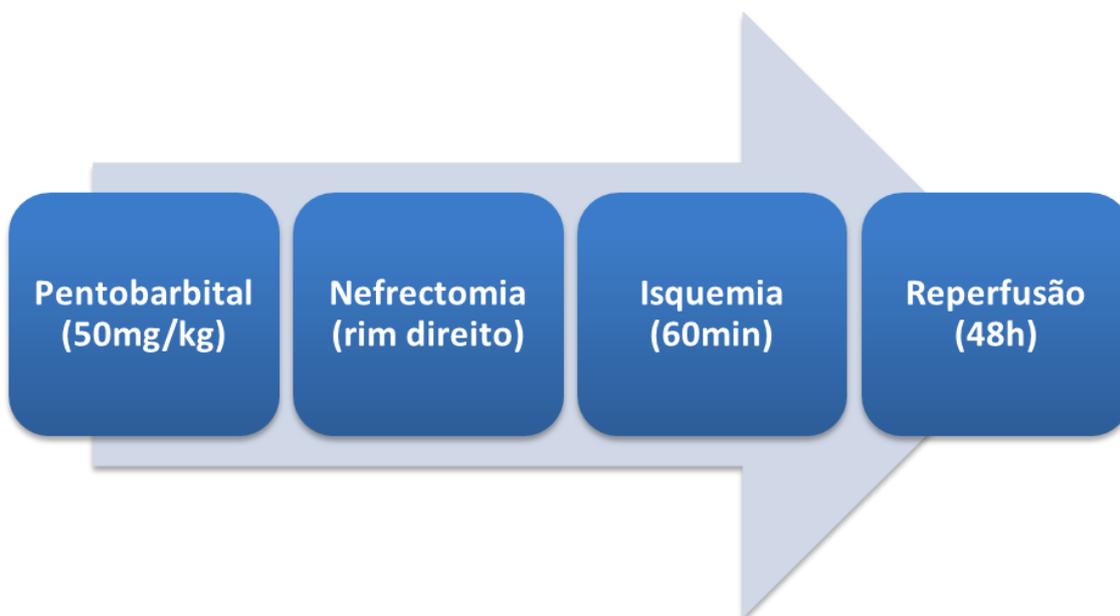


Fig. 2 Protocolo de indução da Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperusão.

4.3 Substâncias utilizadas

O extrato alcoólico de própolis vermelha foi comprado na empresa PharmaNectar® (Minas Gérias, Brasil), na concentração de 0,25g/ml. Para a realização dos experimentos, foi utilizada a dose de 150mg/kg/dia. Todos os produtos químicos e reagentes aqui mencionadas foram obtidos pela Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA) e pela Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, cada um contendo 6 animais:

- **SHAM + veículo (SHAM):** animais foram submetidos à administração oral de veículo (solução alcoólica) por três dias. No quarto dia, foi administrada a última dose, e então, 1h depois, os animais foram sujeitos à laparotomia sem isquemia e sem nefrectomia.
- **SHAM + Própolis Vermelha (GPV):** animais foram submetidos à administração oral de Extrato Alcoólico de Própolis Vermelha por três dias. No quarto dia, foi

administrada a última dose, e então, os animais foram sujeitos à laparotomia sem isquemia e sem nefrectomia.

- **I/R + veículo (GIR):** animais foram submetidos à administração oral de veículo por três dias. No quarto dia, foi administrada a última dose, e então, 1h depois, os animais foram sujeitos à laparotomia com isquemia e nefrectomia.

- **I/R + Própolis Vermelha (GPVIR):** animais foram submetidos à administração oral de Extrato Alcoólico de Própolis Vermelha (150mg/kg/dia) por três dias. No quarto dia, foi administrada a última dose, e então, os animais foram sujeitos à laparotomia com isquemia e nefrectomia.

O tempo de reperfusão nos grupos que sofreram isquemia (GIR e GPVIR) foi de 48h. Os grupos SHAM e FPV4, uma vez que não há isquemia/reperfusão, simularam as 48h de reperfusão. Os animais ficaram em gaiolas metabólicas nas últimas 24h do experimento, por onde foi coletada a urina de 24h. Logo após a obtenção do volume urinário, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e, em seguida, foi conduzida uma laparotomia e dissecação da veia cava abdominal, por onde foi coletado o sangue através da punção deste vaso. As amostras sanguíneas foram coletadas em microtúbulos (2 mL) contendo 20µL de heparina a 10% e, posteriormente, centrifugadas a 3.500 rpm a uma temperatura de 4 °C durante 15 minutos. As amostras de plasma obtidas foram armazenadas em um freezer a -80°C para dosagens bioquímicas. Seguidamente à coleta sanguínea, foi coletado o rim que sofreu a lesão por Isquemia/Reperfusão, no qual foi armazenado em formol tamponado 10% para o posterior estudo histopatológico. O restante do tecido foi mantido no gelo e rapidamente conduzido a -80°C para serem utilizados nos protocolos do dano oxidativo.

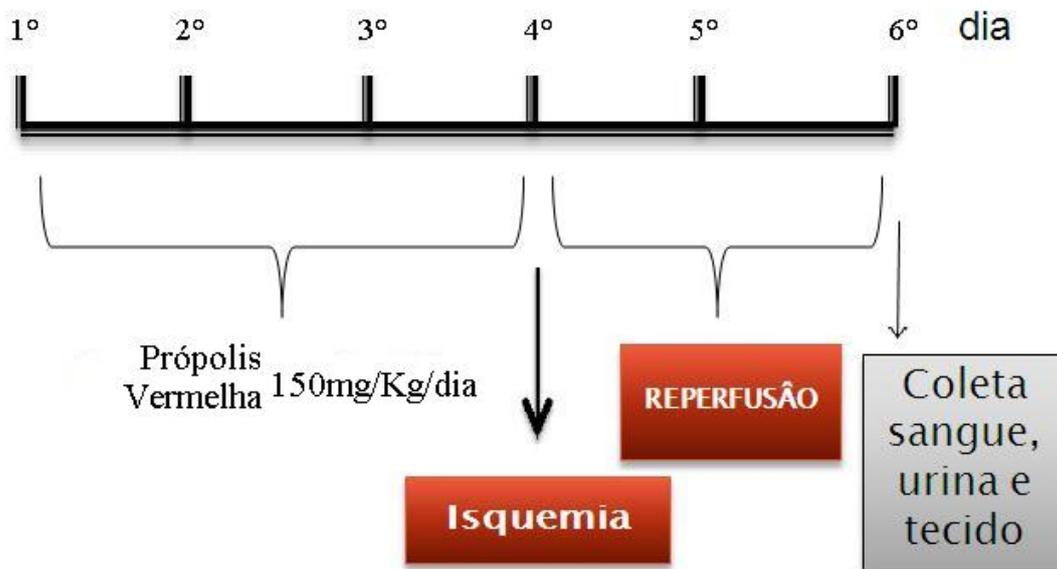


Fig. 3 Representação esquemática do protocolo experimental.

4.5 Avaliação da Função Renal

Para avaliação da função renal, amostras de sangue foram coletadas ao término da reperfusion, 48h após a isquemia. Também foi coletada a urina nas últimas 24h de reperfusion. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 1500rpm por 10min, a 8°C. Em seguida foi extraído o plasma, e este foi usado nas dosagens de Creatinina, Uréia, Sódio, Potássio e Cloreto. Essas dosagens também foram feitas na urina de 24h. Uréia e creatinina foram medidos através de método colorimétrico por um aparelho semi-automático (LABQUEST®), usando kits de diagnóstico (LABTEST®, Brasil). A determinação de sódio, potássio e cloreto foi feita através de um aparelho eletrodo íon-seletivo (Rapid Chem 744, Bayer Diagnostic).

- **Dosagem de creatinina plasmática**

A dosagem de Creatinina plasmática foi realizada, através do kit comercial Creatinina K (Labtest®, Brasil). Adicionou-se 0,1ml de Padrão ou amostra (plasma) a

1ml de Picrato Alcalino (NaOH + Acido pícrico), e foi feito a leitura no espectrofotômetro a 520nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

- **Dosagem de creatinina urinária**

Para dosagem de creatinina urinária, foram adicionados 0,2ml de urina em 4,8ml de água (diluição 1:25). Em seguida, foram realizados os mesmos processos descritos anteriormente para mensuração de creatinina plasmática.

- **Clearance de Creatinina**

O *Clearance* de creatinina (Clcr) foi calculado para determinar a função renal dos animais, calculando-se a taxa de filtração glomerular (TFG). Este foi utilizado para determinar a função renal dos animais e calculado por meio da seguinte fórmula

$$\text{Clcreat} = \text{CU} \times \text{V} / \text{CP}$$

Sendo:

CU = creatinina urinária, em mg/dl;

V = volume urinário das últimas 24h, em ml;

CP= creatinina plasmática, em mg/dl;

Os valores do Clcr foram expressos em **ml/min**.

- **Dosagem Uréia**

A concentração de uréia plasmática foi realizada através do kit comercial Uréia CE (Labtest®, Brasil) de acordo com as instruções do fornecedor. A ureia é hidrolisada pela urease a íons amônia e CO₂. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação de cor é proporcional à quantidade de ureia na amostra. Tomou-se 3 tubos de ensaio e procedeu-se como a seguir:

- Adicionou-se 0,01ml de Padrão ou Amostra em 1ml de Urease Tamponada;
- Misturou e incubou a 37°C por 5 minutos;
- Adicionou-se 1ml do Oxidante de uso em cada tubo;
- Misturou e incubou a 37°C por 5 minutos.

A absorbância foi de 600nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

4.6 Avaliação da Função Tubular

A fração excretada de sódio ($FENa^+$) e a fração excretada de potássio (FEK^+) consistem nos percentis de Na^+ e K^+ filtrados e excretados na urina. Existe uma variação muito grande no manejo iônico destes durante os quadros de Lesão Renal Aguda.

A fração de excreção de sódio ($FENa^+$) e (FEK^+) foi calculada a partir da mensuração de sódio e potássio urinário e plasmático por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil) pelo método eletrodo íon seletivo. Foi utilizado como diluente o Snap Park® (Roche, Brasil) para preparo da solução padrão e solução para mensuração de eletrólitos urinária. O aparelho foi calibrado usando padrão contendo 140 mEq/l de Na^+ e 5 mEq/l de K^+ . O controle para mensuração das amostras foi realizado com Isetrol® (Roche, Brasil).

Com as concentrações plasmáticas e urinárias de sódio e potássio foram determinadas as frações de excreção de Na^+ e K^+ ($FENa^+$, FEK^+). Estes parâmetros servem para analisar do manejo renal de tais íons.

O cálculo utiliza as seguintes fórmulas:

$$FENa^+ = \frac{\text{Clearance } Na^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

Clearance K⁺

$$FEK^+ = \frac{\text{---}}{\text{---}} \times 100$$

Clearance de creatinina

Os valores foram expressos em %.

4.7 Dosagem de MDA urinário (TBARS)

Para verificar o estresse oxidativo renal, foi analisada a produção de malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica determinado pela reação com ácido tiobarbitúrico. Para tanto, 0,4 ml da amostra de urina com 0,6 ml de H₂O foram adicionados a 1,0 ml de TCA 10% (tricloroacético) e 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2). 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 durante 20 minutos para reação com ácido tiobarbitúrico. Após refrigeração e adição de TCA 70%, a mistura final foi centrifugada por 15min a 3000 rpm e a leitura foi realizada por espectrofotometria em absorvância de 534 nm.

4.8 Determinação da concentração de MDA no tecido renal

Para confirmar o dano direto oxidativo no tecido renal, os níveis de malondialdeído (MDA) nos rins também foi determinado pelo método de UCHIYAMA & MIHARA (1978). Animais foram sacrificados 48h após reperusão, e o rim esquerdo foi removido e homogeneizado com 1,15% KCL para fazer um homogenato a 10%. Em seguida, 3ml de solução de ácido fosfórico 1% e 1ml de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6% foram adicionados a 0,5ml do homogenato em um tubo. A mistura foi aquecida em água a ponto de ebulição por 45min. Em seguida, 4ml de solução de *n*-butanol foi adicionado à mistura vigorosamente. A absorvância foi medida por espectrofotometria a 532 e 520 nm. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido.

4.9 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) em tecido renal

A determinação da concentração da GSH, uma enzima antioxidante hidrossolúvel, baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412nm, conforme descrito por SEDLAK & LINDSAY (1968). Preparou-se o homogenato do rim esquerdo a 10% em EDTA (0,02 M). Em seguida, foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 400 µL do sobrenadante e adicionou-se 800 µL de tampão Tris-HCl (0,4M), pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB (0,01 M). Após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm, através de um espectrofotômetro. A concentração da Glutathiona Reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

4.10 Análise Histológica

Após 48h de reperfusão, o rim esquerdo foi removido e colocado em uma solução de Formol tamponado 10%. Após 24h, o rim foi transferido para solução alcoólica 70% e levado para análise histológica. O tecido renal foi fixado com solução formalina 10%, e depois incorporado com parafina. Seções de corte de 5µm foram então corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As lesões das células tubulares proximais foram analisadas de acordo com a classificação proposta por GOUJON *et al* (1999), modificada segundo a graduação de BANFF (SOLEZ *et al*, 2007). O método de avaliação foi baseado em sete padrões morfológicos básicos típicos das lesões tubulares proximais (vacuolização do citoplasma apical, necrose tubular, dilatação tubular, descolamento das células, integridade da borda em escova, edema intracelular e desnudamento da membrana basal) graduados em cinco escalas de pontuação: 1 (nenhuma anormalidade), 2 (lesões brandas em até 10% do tecido renal), 3 (lesões afetando entre 10 e 25% do tecido renal), 4 (lesões acometendo de 25% a 50% do tecido renal), 5 (lesões em mais de 50% do tecido renal estudado).

4.11 Imunohistoquímica para detecção da enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) e para Heme-oxigenase

A imunohistoquímica para NOSe e Heme-oxigenase foi realizada utilizando o método de estrepto-avidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Após 48h de reperusão, os animais foram sacrificados e o rim esquerdo foi removido e fixado em formol a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidos a tratamento com EDTA 10% para a desmineralização. A seguir, as hemiarçadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-eNOS diluído 1:200 e com anticorpo policlonal primário de cabra para Heme-oxigenase diluído em 1:200. Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente, como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%. As seções foram avaliadas em microscópio sob aumento de x400. Para a estatística, foi realizada uma contagem semi-quantitativa das amostras, de acordo com a intensidade da coloração e da quantidade de células tubulares coradas no córtex renal. A contagem foi baseada em um sistema de pontuação que varia de 0 a 4, onde 0: sem coloração, 1: 0 a 25% de túbulos marcados, 2: 25 a 50% de túbulos marcados, 3: 50 a 75% de túbulos marcados, 4: > 75% de túbulos marcados. O número de células positivas para heme-oxigenase em cada

amostra foi calculado pela contagem do número de células positivas em 20 campos selecionados aleatoriamente na região cortical (WANG *et al*, 2012).

4.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão médio (EPM). Para realizar a comparação entre os grupos foi empregado ANOVA (com pós-teste de Newman Keuls), utilizando-se como critério de significância $p < 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0®.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre os marcadores de função renal

5.1.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre os valores de creatinina e uréia plasmático após LRA induzida por I/R (Isquemia e Reperusão).

Para investigar o efeito protetor da própolis vermelha na lesão renal aguda induzida por I/R, níveis séricos de creatinina e uréia foram medidos 48h após o início da reperusão (Fig. 05). Comparado com o grupo SHAM, os animais que sofreram lesão renal por I/R exibiram um aumento significativo nos níveis de creatinina ($2,7 \pm 0,9$ mg/dL vs $0,6 \pm 0,5$ mg/dL) e uréia plasmática ($274,3 \pm 91,81$ mg/dL vs $39,36 \pm 6,29$ mg/dL) ($p < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento com própolis vermelha diminuiu significativamente os níveis de creatinina ($1,8 \pm 0,5$ mg/dL) e uréia ($181,1 \pm 65,6$) no plasma, após a lesão ($p < 0,05$).

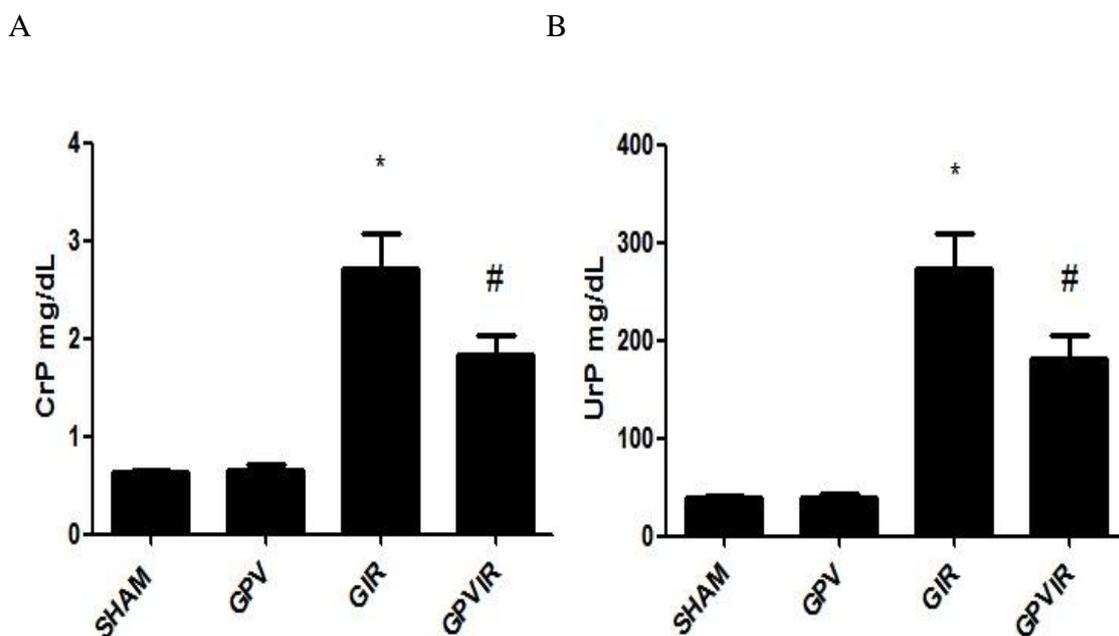


Fig. 4 Efeito da Própolis Vermelha na função renal após LRA por I/R. CrP: creatinina plasmática; UrP: uréia plasmática. A: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da concentração de creatinina plasmática (mg/dl). SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. *($p < 0,05$) vs SHAM, #($p < 0,05$) GIR. B: Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da concentração de uréia plasmática(mg/dl). SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. *($p < 0,05$) VS SHAM, #($p < 0,05$) vs GIR.

5.1.2 Efeito da Própolis Vermelha no *Clearance* de creatinina após LRA induzida por I/R

O *Clearance* de creatinina (Clcr) foi calculado para determinar a função renal estimando-se a taxa de filtração glomerular (TFG) (Fig.06). TGF reduzida demonstra comprometimento da função renal. Comparado com o grupo SHAM, os animais que sofreram lesão renal por I/R tiveram uma importante diminuição no *clearance* de creatinina ($1,29 \pm 0,46$ mg/dL vs $0,073 \pm 0,048$ mg/dL) ($p < 0,05$). O pré-tratamento com própolis vermelha aumentou de forma significativa o *clearance* após a lesão renal ($0,41 \pm 0,14$ mg/dL vs $0,073 \pm 0,048$ mg/dL) ($p < 0,05$).

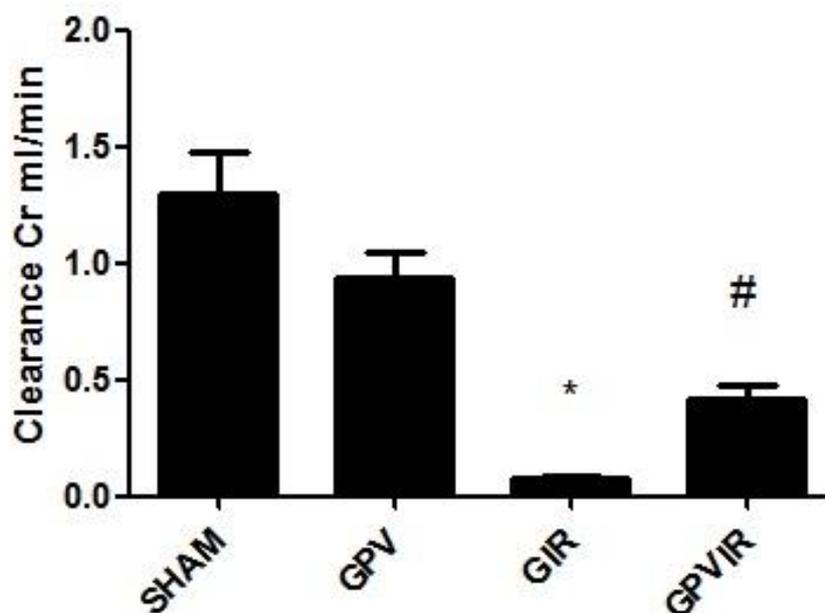


Fig. 5 Efeito da Própolis Vermelha na taxa de filtração glomerular após LRA por I/R, através do cálculo do *Clearance* de creatinina. Cr: creatinina. Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. do *Clearance* de creatinina (ml/min). SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. *($p < 0,05$) vs SHAM, #($p < 0,05$) vs GIR.

5.1.3 Efeito da Própolis Vermelha sobre a função tubular após LRA por I/R

Para avaliação da capacidade funcional tubular, foi calculado a Fração de Excreção de Sódio (percentagem do sódio excretado em relação ao sódio filtrado). Houve um aumento significativo da percentagem de sódio excretado no grupo que sofreu lesão por I/R em relação ao grupo SHAM ($1,03 \pm 0,39$ vs $0,23 \pm 0,011$) ($p < 0,05$), o que significa uma inabilidade dos rins dos animais deste grupo em manter a função tubular adequada (Fig.7). O pré-tratamento com Própolis Vermelha diminuiu significativamente a percentagem de sódio excretado em comparação com o grupo que sofreu a lesão ($0,58 \pm 0,30$ vs $1,03 \pm 0,39$) ($p < 0,05$).

Na figura 08, assim como o resultado anterior, mostram-se valores nos quais o grupo GIR atinge níveis significativamente maiores excreção de K^+ , em relação ao grupo SHAM ($134,4 \pm 54,94$ vs $7,5 \pm 2,9$, $p < 0,05$), reforçando o resultado do grau lesivo tubular. Esses valores foram significativamente reduzidos no grupo tratado com a própolis em relação ao grupo que sofreu a lesão por I/R ($64,74 \pm 52,44$ vs $134,4 \pm 54,94$, $P < 0,05$).

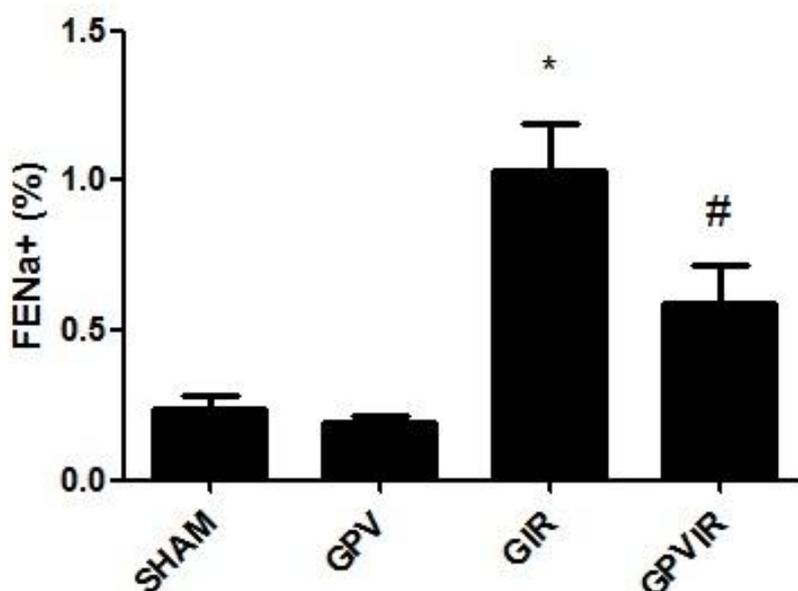


Fig. 6 Efeito da Própolis Vermelha sobre a função tubular. FENa⁺: Fração de Excreção de Sódio. Os valores da figura representam a média ± E.P.M. da FENa⁺ (%). SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. Dados mostram diferença significativa *($p < 0,05$) comparado com o grupo SHAM, e #($p < 0,05$) comparado com o grupo GIR.

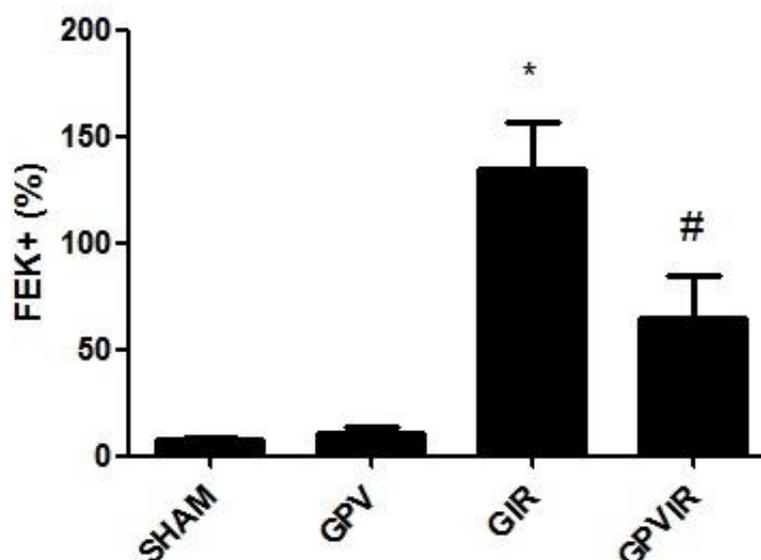


Fig. 7 Efeito da Própolis Vermelha sobre a função tubular. FEK⁺: Fração de Excreção de Potássio. Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. da FEK⁺ (%). SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. Dados mostram diferença significativa *($p < 0,05$) comparado com o grupo SHAM, e #($p < 0,05$) comparado com o grupo GIR.

5.2 Efeito da Própolis Vermelha sobre o perfil do dano oxidativo

5.2.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre os níveis de MDA urinário após a LRA.

A figura 09 mostra que o grupo que sofreu lesão renal por I/R apresentou valores de MDA urinário aumentados quando comparados com o grupo SHAM ($271,4 \pm 145,6$ MDA/24h vs $81,37 \pm 10,67$ MDA/24h) ($p < 0,05$). Entretanto, os animais que receberam tratamento com própolis vermelha antes da indução da LRA apresentaram valores significativamente menores que o grupo GIR ($161,4 \pm 81,01$ vs $271,4 \pm 145,6$) ($p < 0,05$), o que nos sugere um papel protetor contra o dano oxidativo da lesão por I/R.

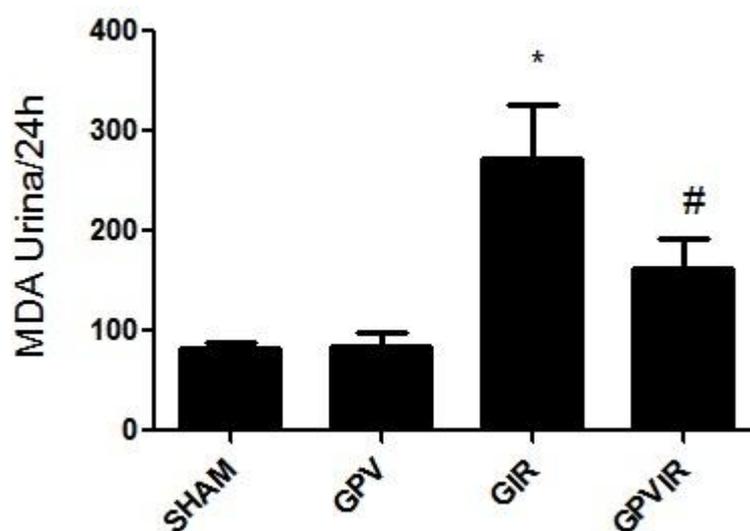


Fig. 8 Efeito da Própolis Vermelha sobre os valores de malondealdeído urinário (MDA). Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. Dados mostram diferença significativa dos valores de MDA *($p < 0,05$) comparado com o grupo SHAM, e #($p < 0,05$) comparado com o grupo GIR.

5.2.2 Efeito da Própolis Vermelha sobre os níveis de MDA no tecido renal após a LRA.

A figura 10 mostra que os valores de MDA no tecido renal no grupo que sofreu lesão por I/R estavam significativamente aumentados quando comparados com os valores de MDA do grupo que não sofreu lesão ($133,9 \pm 23,36$ mcg/g tecido vs $68,10 \pm 3,7$ mcg/g tecido) ($p < 0,05$), demonstrando um dano oxidativo considerável através da LRA por I/R. Entretanto, o grupo que recebeu pré-tratamento com a própolis vermelha diminuiu significativamente os valores de MDA no tecido em relação ao grupo sem tratamento ($90,22 \pm 20,82$ mcg/g tecido vs $133,9 \pm 23,36$ mcg/g tecido) ($p < 0,05$).

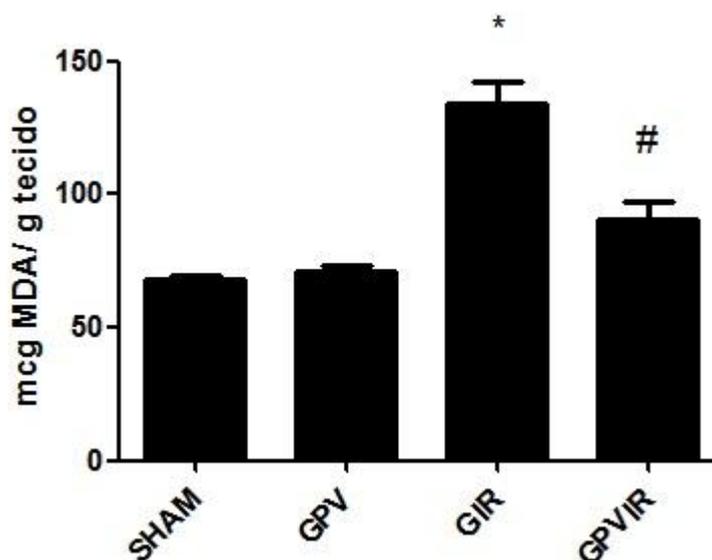


Fig. 9 Efeito da Própolis Vermelha sobre os valores de malondealdeído (MDA) no tecido renal. Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. de MDA/g tecido. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. Dados mostram diferença significativa dos valores de MDA *($p < 0,05$) comparado com o grupo SHAM, e #($p < 0,05$) comparado com o grupo GIR.

5.2.3 Efeito da Própolis Vermelha nos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) após LRA por I/R.

A figura 11 mostra que o grupo que sofreu lesão por I/R apresentou valores de GSH reduzidos em relação ao grupo que não sofreu lesão ($1267 \pm 229,5$ mcg/g tecido vs $1659 \pm 107,9$ mcg/g tecido), demonstrando um dano oxidativo considerável resultante da LRA por I/R. Os animais do grupo que recebeu tratamento com própolis vermelha apresentaram um aumento significativo nos valores de GSH quando comparados com o grupo que sofreu apenas a lesão ($1784 \pm 297,4$ mcg/g tecido vs $1267 \pm 229,5$) ($P < 0,05$), o que nos sugere uma proteção tecidual contra o dano oxidativo causada pela I/R.

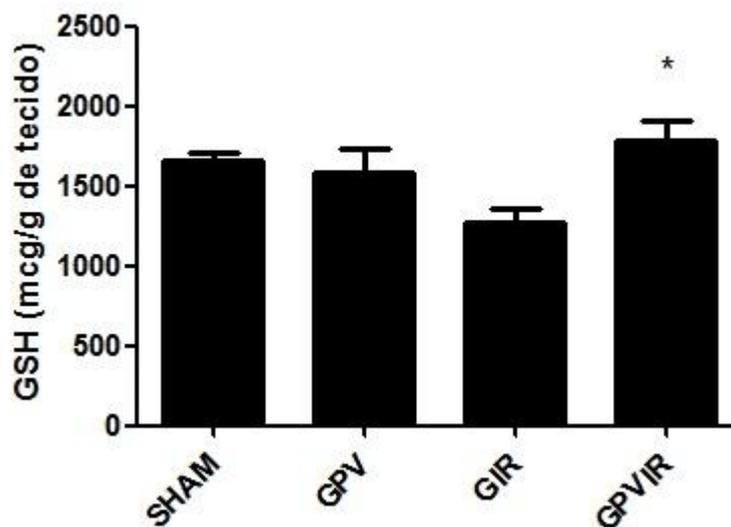


Fig. 10 Efeito da Própolis Vermelha nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) após LRA por I/R. Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. dos valores de GSH (mcg/g tecido). SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. Dados mostram diferença significativa *($P < 0,05$) comparado com o grupo GIR.

5.3 Análise Histológica

A avaliação histológica das amostras de tecidos renais indicou necrose tubular, dilatação tubular, infiltrado de células inflamatórias e edema celular no interstício tubular do córtex renal dos animais após 48h de reperfusão, como mostra a figura 12. As lesões foram menos intensas nos animais tratados com própolis vermelha comparados com os animais sem tratamento. Do ponto de vista estatístico, foi observado um aumento significativo na contagem do escore de necrose tubular no grupo I/R em relação ao grupo SHAM ($3,6 \pm 0,5$ vs $0,2 \pm 0,4$ $P < 0,05$). A própolis foi capaz de diminuir a elevação da contagem do escore ($2,0 \pm 0,7$ vs $3,6 \pm 0,5$ $P < 0,05$). O escore de necrose tubular pode ser visto na figura 13.

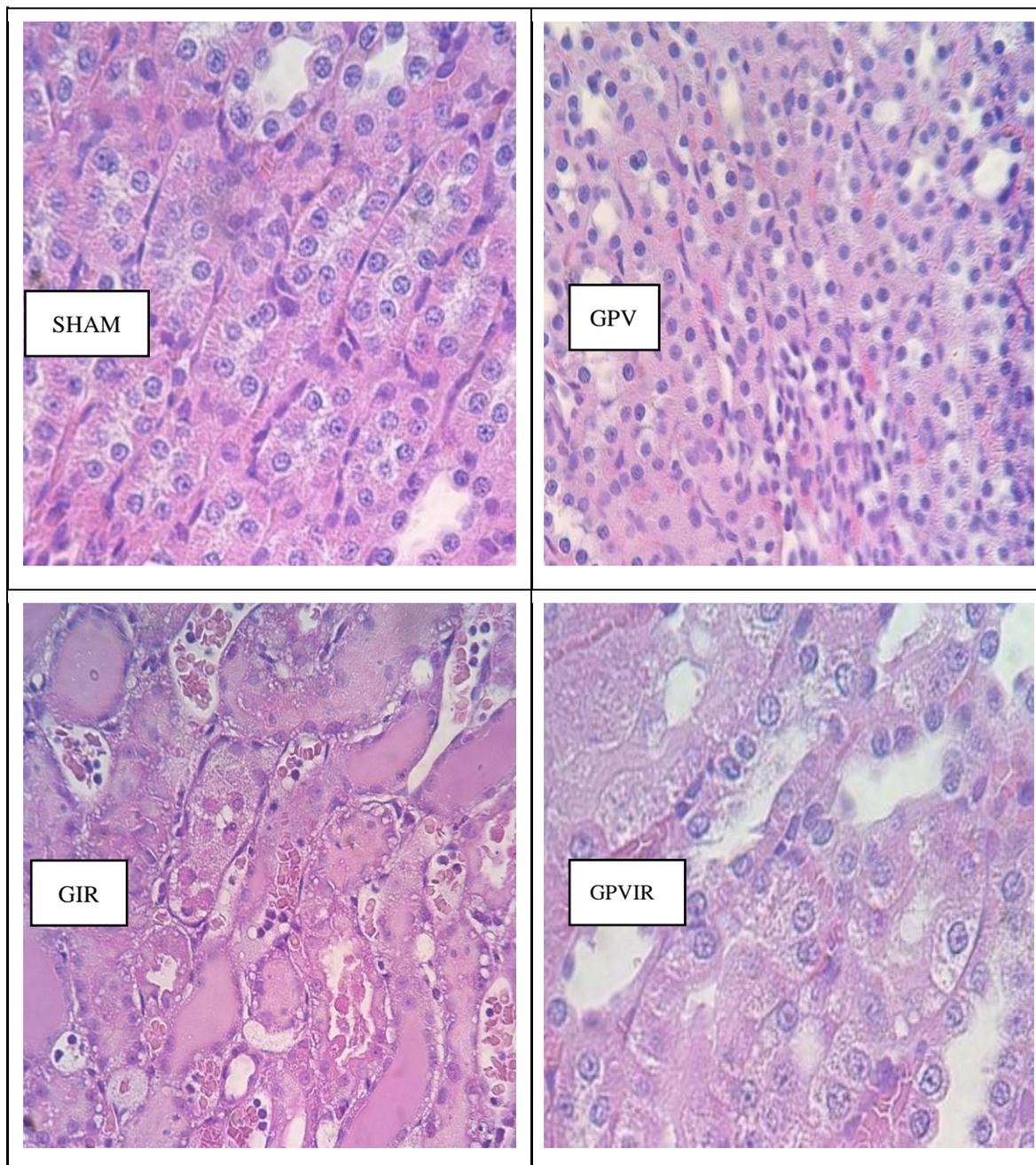


Fig. 11 Fotomicrografia de rim de rato ao final do experimento de Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperusão (Hematoxilina-Eosina). Aumento 400x. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha.

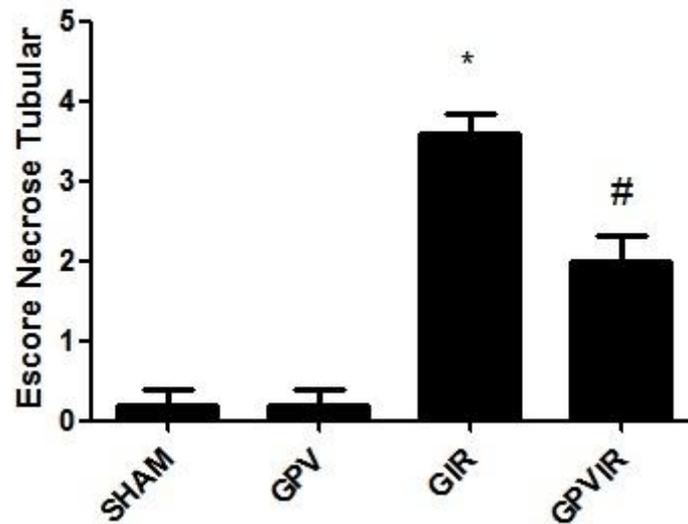


Fig. 12 Efeito da Própolis Vermelha sobre o escore de necrose tubular após lesão por I/R. Os valores da figura representam a média \pm E.P.M do escore da Necrose Tubular Aguda. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. * $p < 0.05$ vs SHAM, # $p < 0.05$ vs GIR.

5.4 Análise Imunohistoquímica

5.4.1 Efeito da Própolis Vermelha sobre a eNOS

Após 48h do processo cirúrgico, as amostras dos animais do grupo I/R (GIR) demonstraram uma reduzida marcação da proteína eNOS comparado com o grupo SHAM, através de uma análise semiquantitativa na imunohistoquímica (0.6 ± 0.5 vs. 1.8 ± 0.4 , $p < 0,005$). Entretanto, a administração da própolis vermelha preveniu completamente a diminuição da expressão da eNOS, demonstrada por uma maior marcação desta nos animais do grupo GPVIR ($2,2 \pm 0,4$ vs $0,6 \pm 0,5$, $p < 0,05$), como pode ser visto nas figuras 14 e 15.

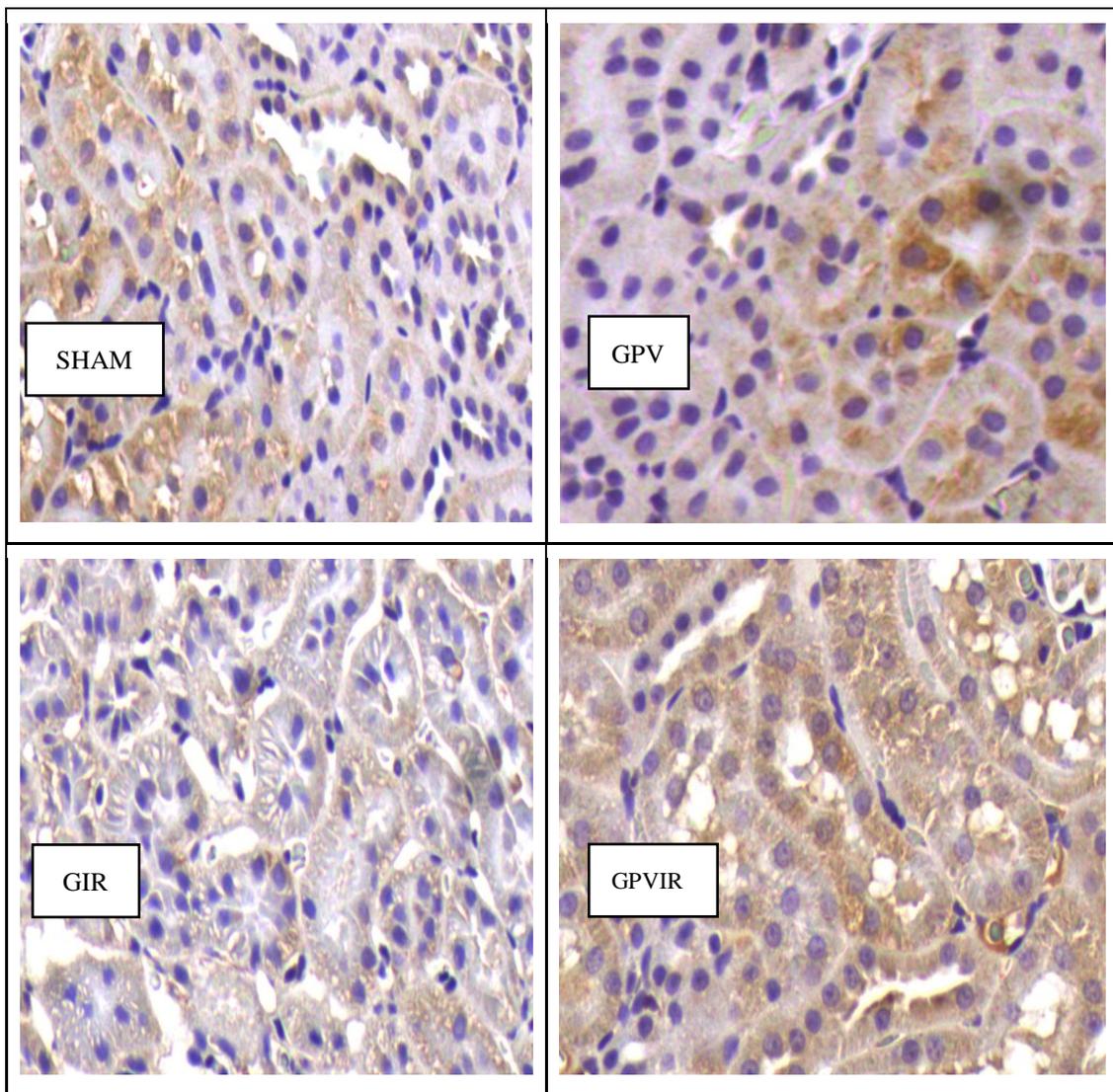


Fig. 13 Fotomicrografia das lâminas de imunohistoquímica de rim de rato para eNOS ao final do experimento de Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperusão. Aumento 400x. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha.

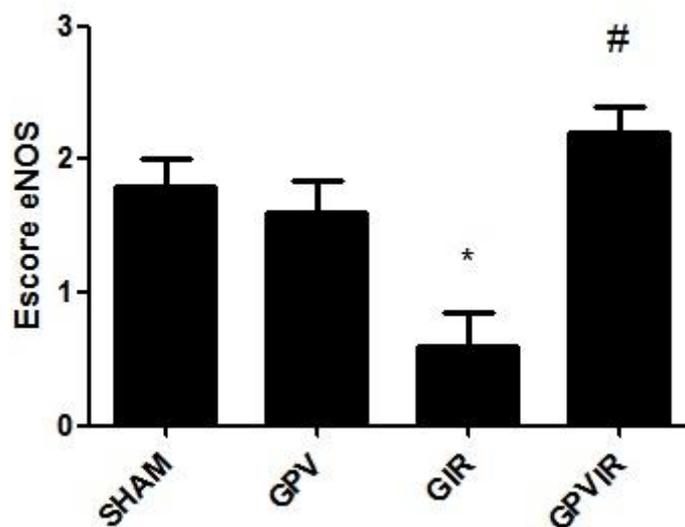


Fig. 14 Efeito da Própolis Vermelha sobre a expressão de eNOS após lesão por I/R. Os valores da figura representam a média \pm E.P.M do escore de eNOS. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. * $p < 0.05$ vs SHAM, # $p < 0.05$ vs GIR.

5.4.2 Efeito da Própolis Vermelha sobre a Heme-oxigenase

Foi observada uma forte coloração positiva da heme-oxigenase no grupo I/R, comparado com o grupo SHAM ($1,4 \pm 0,5$ vs $0,6 \pm 0,5$ $p < 0,05$), que foi corado apenas marginalmente nas células tubulares (Fig. 16). A imunocoloração da heme-oxigenase no grupo tratado com própolis foi marcado mais intensamente em relação ao grupo I/R ($2,6 \pm 0,5$ vs $1,4 \pm 0,5$ $p < 0,05$). A avaliação semiquantitativa pode ser vista na figura 17.

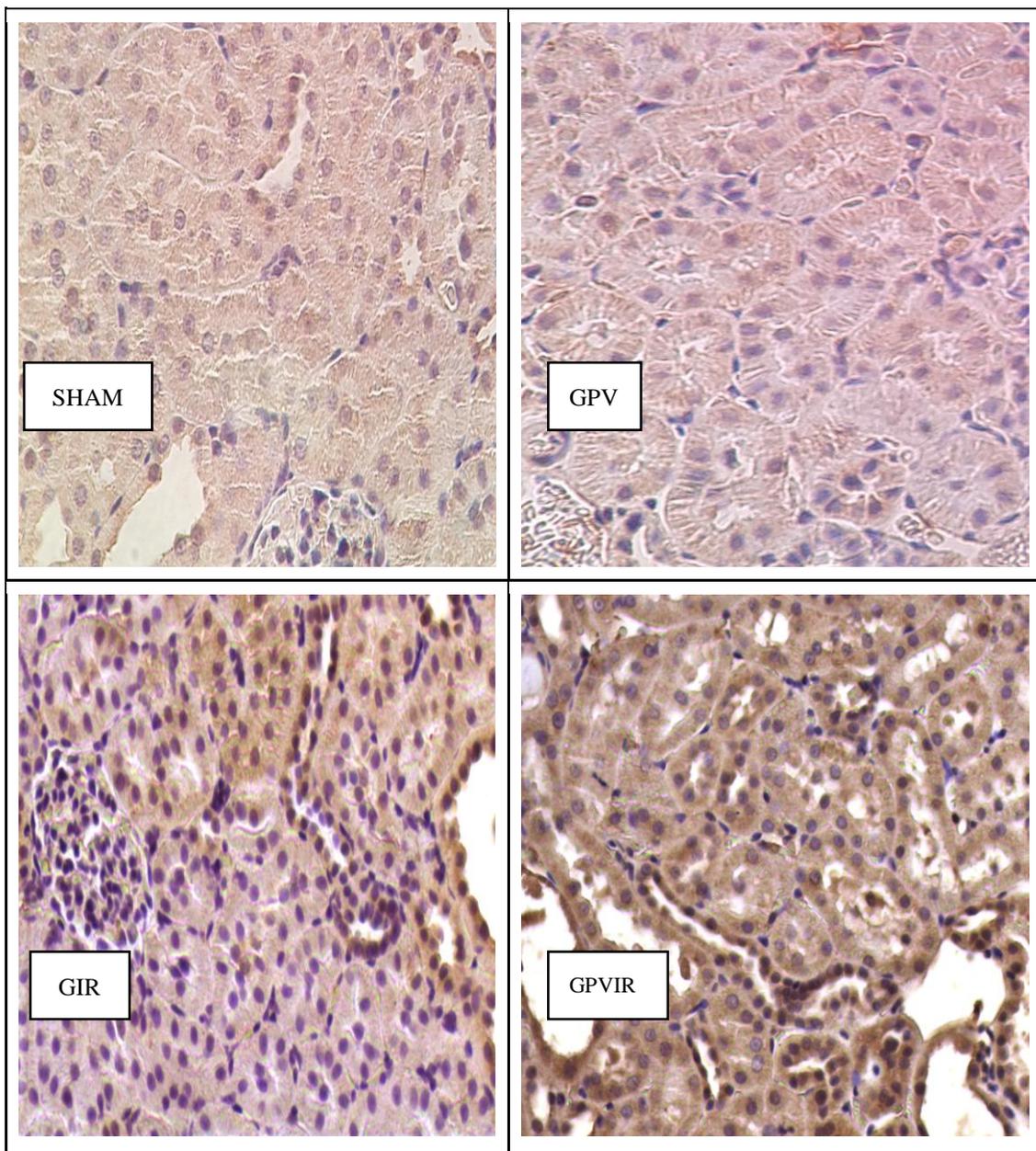


Fig. 15 Fotomicrografia das lâminas de imunohistoquímica de rim de rato para Heme-Oxigenase ao final do experimento de Lesão Renal Aguda por Isquemia/Reperusão. Aumento 400x. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha.

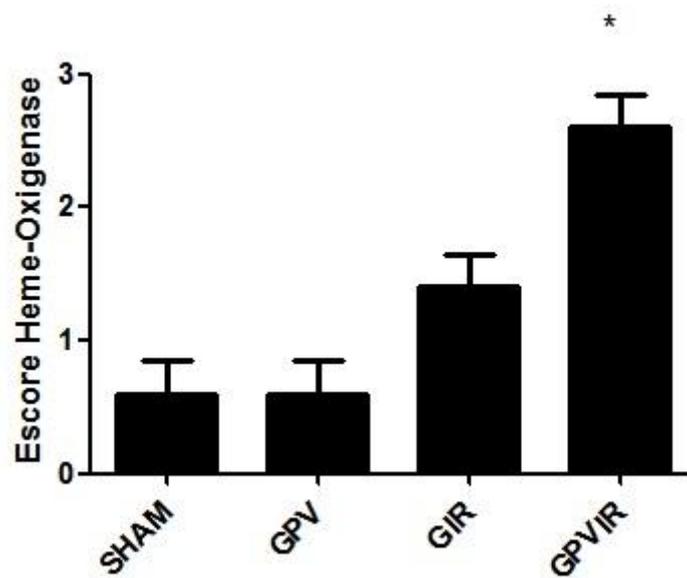


Fig. 16 Efeito da Própolis Vermelha sobre a expressão dos níveis de heme-oxigenase após lesão renal por I/R. Os valores da figura representam a média \pm E.P.M do escore de heme-oxigenase. SHAM= SHAM + veículo; GPV= SHAM + Própolis Vermelha; GIR= I/R + veículo; GPVIR= I/R + Própolis Vermelha. * $p < 0.05$ vs GIR.

6 DISCUSSÃO

A LRA é caracterizada pela rápida perda da função renal e da incapacidade dos rins em excretar substâncias, concentrar a urina e de manter o balanço hidroeletrólítico adequado no organismo. Geralmente, é resultado de causas isquêmicas que se mantêm por períodos variáveis de tempo. Apesar do grande avanço no entendimento e no tratamento dos mecanismos fisiopatológicos, nos últimos 40 anos os índices de mortalidade ainda continuam excessivamente elevados (SCHRIER *et al*, 2004; BELLOMO, 2011). Isquemia, seguida de reperfusão, é uma das maiores causas de LRA, na qual é uma frequente síndrome clínica com alta morbidade e mortalidade (THADANI *et al*, 1996). Lesão por I/R no tecido renal inicia um complexo evento celular que resulta em dano e morte das células renais devido a uma combinação de apoptose e necrose (LIEBERTHAL *et al*, 1996). É um fenômeno complicado, devido ao fato de a reperfusão, apesar de ser essencial para a sobrevivência do tecido renal que sofreu isquemia, causar um dano adicional, chamado lesão por reperfusão (PALLER *et al*, 1984). A fisiopatologia da LRA por I/R envolve um complexa relação entre a hemodinâmica renal, a lesão tubular e a geração de EROs (GILL *et al*, 2005; McCORDY *et al*, 2005).

Dessa forma, é válida a busca de substâncias que tenham ação protetora sobre células ou tecidos submetidos à isquemia/reperfusão. Sabe-se que nas últimas décadas, foi observado um aumento no uso de produtos naturais em pesquisa (HAYACIBARA *et al*, 2005). Sendo assim, a Própolis Vermelha se destaca nesse contexto como uma substância de potencial terapêutico, uma vez que inúmeros trabalhos demonstram as atividades biológicas desta, bem como suas possíveis aplicações terapêuticas (SOARES *et al*, 2006). Entretanto, apesar desse grande número de estudos e do fato de existir uma considerável quantidade de informações disponíveis no que concerne aos aspectos químicos e biológicos da própolis, sua aplicação terapêutica ainda pode ser considerada incipiente (FUNARI & FERRO, 2006).

No presente estudo, conseguimos reproduzir um quadro de LRA induzida por I/R em um modelo animal, e usamos a Própolis Vermelha com o objetivo de tentar prevenir danos no tecido renal através de uma possível nefroproteção. PARLAKPINAR *et al*, 2005, DERA KHSHANFAR *et al*, 2007, e BLEDSOE *et al*, 2008, demonstraram

experimentalmente alternativas terapêuticas advindas de produtos naturais em diferentes tipos de nefropatia, expondo assim, a eficácia destes em relação a esta fisiopatologia.

Os modelos de lesão renal contribuem para o esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos e para o estudo de possíveis alternativas terapêuticas de nefroproteção, contribuindo para reduzir a severidade da lesão tubular frente ao insulto isquêmico.

O modelo de LRA do nosso estudo é válido e confiável, pois reproduzimos alterações renais conforme relatos clínicos de outros estudos. Foi observado uma elevação significativa da creatinina sérica no grupo que sofreu lesão por I/R, sendo esse dado reforçado pelo estudo de ALTINTAS *et al* (2012) e de GANG *et al* (2013), no qual relatou dados similares de creatinina sérica em animais que sofreram o mesmo processo de lesão renal (isquemia de 60min + nefrectomia, seguido de reperfusão). De acordo com os resultados, o pré-tratamento com a própolis reduziu significativamente os valores de creatinina sérica comparado com o grupo que sofreu apenas a lesão por I/R

Outro achado importante em nosso estudo foi a elevação da uréia sérica após I/R quando comparado com o grupo controle. Este resultado está de acordo com relatos descritos anteriormente na literatura, como o estudo de ZOU *et al*, (2013). No presente estudo, a própolis vermelha também foi capaz de reduzir os valores de uréia sérica em relação ao grupo I/R.

Elevação na creatinina e uréia sérica é um sinal de deterioração da função glomerular, que resulta em uma disfunção renal de acordo com o tempo (SAHNA *et al*, 2006). A concentração de creatinina no plasma é mais significante em relação aos níveis de uréia na fase inicial da doença renal, pois uma pequena elevação da creatinina resulta diretamente na queda da taxa de filtração glomerular (TFG), o que indica a possibilidade de haver algum problema renal (EATON & POOLER, 2006). Por outro lado, níveis de uréia começam a subir depois que acontece um dano no parênquima renal. Como a uréia também sofre filtração, nos infere o mesmo tipo de análise anterior, na qual uma medida de sua concentração plasmática também é um indicador da TFG. A excreção renal deve igualar-se à produção, se não os níveis plasmáticos podem aumentar até um valor patológico, produzindo condições chamadas de uremia. Foi observado um acentuado aumento nos níveis plasmáticos de uréia. Esses achados são compatíveis com o dano renal relacionado com a lesão isquêmica (ROGERS *et al*, 2012). Portanto, a diminuição plasmática nos níveis destes compostos (creatinina e

uréia) pelo tratamento com a própolis no nosso estudo nos sugere um efeito benéfico dos componentes desta substância.

A TFG é um parâmetro de fundamental importância para avaliação da função renal, pois nos fornece uma estimativa do número de néfrons funcionantes, sendo então considerada uma estimativa legítima para a identificação de disfunção renal. A avaliação da TFG no nosso estudo se deu a partir do *Clearance* de creatinina (Clcr). A LRA induzida por I/R resultou em uma diminuição significativa no Clcr, comparado ao grupo controle. Esse resultado encontrado está de acordo com relato de outros autores, como o de COLLINO *et al* (2013) e o de SANDHI *et al* (2013). O tratamento com o extrato alcoólico de própolis vermelha reverteu a redução do Clcr desencadeado pela lesão isquêmica, indicando um efeito benéfico da substância através da melhora da função glomerular.

O túbulo proximal é responsável pela reabsorção da maior parte das substâncias que são filtradas pelo glomérulo, principalmente pela reabsorção de sódio através dos transportadores na membrana apical das células tubulares. Essa é uma função importante do rim, uma vez que o transporte de outros íons e de solutos necessita diretamente ou indiretamente da reabsorção de Na^+ . Esse mecanismo utiliza, indiretamente, a energia liberada pela quebra do ATP. Portanto, é fundamental a disponibilidade de energia advinda dos ATPs, que são fornecidos pelas vias metabólicas. Logo, alterações nestas vias, como a causada pela isquemia, modificam a integridade estrutural das células tubulares, resultando em modificações na taxa e na função tubular (KHUNDMIRI *et al*, 2004; FATIMA *et al*, 2005; BANDAY *et al*, 2008). Em condições normais, cerca de 65% da carga filtrada de sódio são reabsorvidos (EATON & POOLER, 2006). Por outro lado, em condições isquêmicas, devido a um déficit de energia, ocorre um desequilíbrio da bomba de Na^+K^+ -ATPase, o que gera uma disfunção dessa proteína transportadora na membrana da célula do túbulo. Isso resulta em uma falha na reabsorção de Na^+ nessa região, procedendo em elevação da FENa^+ (DEVARAJAN *et al*, 2006).

No presente estudo, foi visto que houve um comprometimento da função tubular pelo aumento da FENa^+ após a instalação da LRA. Este resultado está de acordo com os resultados de outros estudos, como o estudo de ASHTIYANI *et al* (2013) e de TANAKA *et al* (2013), que relataram que mesmo com o tempo de isquemia de 45min houve um aumento significativo na excreção de sódio.

A própolis vermelha foi capaz de reduzir a elevação na $FENa^+$ provocada pela LRA.

Em condições normais, a intensa reabsorção de Na^+ pelo túbulo proximal forma o gradiente químico que favorece a reabsorção passiva de outras substâncias permeáveis ao epitélio tubular, como o K^+ (RIELA *et al*, 2010). Dessa forma, um aumento na excreção de Na^+ acarreta também um aumento da excreção de K^+ .

Outra justificativa para elevada excreção de potássio, é que no ducto coletor a secreção de K^+ está diretamente relacionada com a reabsorção de Na^+ . Logo, devido ao aporte aumentado de sódio para o ducto coletor, uma vez que este não está sendo reabsorvido no túbulo proximal, mais sódio acaba entrando nas células principais e mais potássio é secretado (BERNE E LEVY, 2009).

Assim, da mesma forma como encontrado para a $FENa^+$, obteve-se uma elevação significativa da FEK^+ . Esse resultado corrobora com o estudo de STOJILJKOVIC *et al* (2012).

A própolis também foi capaz de reduzir a elevação na FEK^+ provocada pela LRA, mostrando assim um efeito protetor da substância em estudo. Dessa forma, os resultados encontrados em relação à $FENa^+$ e à FEK^+ indicaram elevados níveis desses íons excretados na urina, caracterizando bem o comprometimento tubular na LRA por I/R. De acordo com estudos como o de KIM *et al* (2013), disfunções na excreção de sódio e potássio observados no quadro de LRA isquêmica está associado com necrose do túbulo proximal.

É fato que a necrose tem sido proposta como mecanismo de morte celular em rins que sofrem lesão por I/R (DAEMEN *et al*, 2002; SAIKUMAR *et al*, 2003). Os achados histopatológicos no presente estudo demonstraram que o os animais controles apresentaram aspecto morfológico normal, com preservação da arquitetura renal e sem alterações. Alguns estudos, com indução de I/R em ratos, observaram alterações na morfologia renal através da avaliação histológica, semelhantes às encontradas pelo presente trabalho, caracterizadas por necrose tubular, edema celular no interstício tubular do córtex renal, infiltrado de células inflamatórias e dilatação tubular (FERREYRA *et al*, 2013; SENER *et al*, 2006).

Em nosso estudo, a gradação histológica foi feita através do escore de necrose tubular, que é baseado em uma gradação de pontuação referente à porcentagem das lesões do tecido renal (SOLEZ *et al*, 2007). Do ponto de vista estatístico, houve um

aumento significativo no escore de necrose tubular dos tecidos de animais submetidos à I/R em relação ao grupo controle, o que está de acordo com relatos anteriores, como o de HWANG *et al* (2013) e o de ZHANG *et al* (2013). Foi observado que a própolis foi capaz de reduzir significativamente esse aumento na pontuação após o estabelecimento da LRA por I/R, reforçando o efeito protetor tubular da substância.

Sugere-se que o efeito benéfico da própolis vermelha tenha sido evidenciado através da proteção diante do dano celular ocasionado pela lesão por I/R sobre as proteínas transportadoras na membrana do túbulo proximal. Tal efeito benéfico provavelmente foi advindo do seu papel antioxidante, reportado anteriormente pelo estudo de FROZZA *et al* (2013), e pelo papel anti-inflamatório, reportado por SILVA *et al* (2012).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante total do organismo. Dentre os principais locais de produção destas espécies nos organismos vivos estão o sistema de transportes mitocondrial, sistema peroxisomal de ácido graxo, citocromo P-450 e células fagocíticas (OZBEK, 2012). Na literatura, é relatado que o estresse oxidativo esteja envolvido como mediador da sinalização intracelular relacionada com a perda da função celular e aos processos de apoptose, necrose e diminuição da defesa antioxidante do organismo, o que tem sido associado com dano glomerular, nas doenças tubulares e na lesão renal aguda (QUIROS *et al*, 2011).

A lesão por I/R causa uma estimulação na produção de radicais livres de oxigênio, sendo um dos principais eventos que resultam na lesão. Diversos estudos têm associado esse aumento na produção de EROs na LRA induzida por I/R em modelos animais, como relatado por ASHTIYANI *et al* (2013), e BERNARDI *et al* (2012).

A lesão por I/R é resultante do dano citotóxico epitelial tubular. Tanto o processo de isquemia como o de reperfusão aumenta diretamente a produção de EROs na cadeia respiratória mitocondrial. A interação entre as elevadas quantidades de EROs com os lipídios danifica a estrutura e funcionalidade dos mesmos. Quando interagem com os lipídios das membranas, causam alterações em sua fluidez, permeabilidade e integridade. Estas alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana celular originam a peroxidação lipídica, que é apoiada pelo aumento dos níveis de MDA, um

aldeído resultante deste processo que pode ser facilmente identificado nas estruturas biológicas (OZEN, 2004; OUEDRAOGO *et al*, 2013).

No presente estudo, nós determinamos os níveis de MDA tanto no tecido renal como nas amostras de urina, e observamos um aumento significativo nos níveis de MDA urinário e no tecido renal de animais expostos à LRA por I/R, em comparação com o grupo que não sofreu a lesão. Esses resultados foram similares e estão de acordo com estudos prévios, como o de ESPOSITO *et al* (2011) e o de HADI *et al* (2011).

O tratamento com a própolis vermelha diminuiu a elevação de MDA, tanto na urina como no tecido renal, causada pela lesão por I/R. Resultado semelhante foi relatado por YONAR *et al* (2012), no qual observou o efeito protetor do própolis ao reduzir os níveis de MDA tecidual, em um estudo que investigava o papel deste contra um dano oxidativo causado por um agente inseticida.

Sabe-se que durante as lesões renais ocorrem depleções significativas nos níveis de GSH, como a que ocorre durante um evento isquêmico. Nesses casos, é de fundamental importância o papel desta enzima para fornecer proteção à função renal (HEUVEL, 2012).

No nosso estudo, foi observado que os níveis de GSH diminuíram consideravelmente após o estabelecimento da LRA por I/R, uma vez que os animais que não sofreram esse tipo de lesão estavam com níveis bem superiores de GSH. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores, como o de BAYRAK *et al* (2008) e de KORKMAZ & KOLANKAYA (2010).

Foi observado que no grupo que recebeu tratamento com a própolis, mesmo após o estabelecimento da lesão renal, os níveis de GSH sofreram um aumento significativo, demonstrando que o extrato foi capaz de reverter a depleção de GSH resultante da LRA por I/R, o que nos sugere um potencial antioxidante considerável.

Este potencial antioxidante do extrato de própolis foi relatado em um estudo realizado por YONAR *et al* (2011), no qual se observou que este foi capaz de normalizar os níveis de GSH em um modelo de dano oxidativo induzido por oxitetraciclina.

O óxido nítrico (NO) é um radical sintetizado durante a conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina pela família de enzimas conhecidas como NOS (Óxido

Nítrico Sintase). A NOS endotelial (eNOS) é um membro dessa família que gera NO nas células endoteliais e regula o tônus vascular (FURCHGOTT *et al*, 1980), enquanto que a iNOS (NOS induzida) é dependente do cálcio para sua ativação. Durante o processo isquêmico, o óxido nítrico é produzido pela eNOS, uma vez que esta é ativada e tem sua expressão aumentada (GOLIGORSKY *et al*, 2002). Diversos estudos demonstraram que o aumento da atividade da eNOS está associada com uma redução da lesão por I/R (CHEN *et al*, 2008).

Em nosso estudo, a expressão da eNOS no tecido foi diminuída significativamente após o estabelecimento da lesão renal por I/R. Este resultado está de acordo com o estudo de BETZ *et al* (2012), que observou que dano renal induzido por I/R levou a uma redução na expressão da eNOS no córtex renal quando comparado com o grupo SHAM. O tratamento com o própolis foi capaz de reverter essa diminuição, aumentando de forma significativa a expressão da eNOS no tecido.

Estudos recentes relatam que há uma significativa redução da atividade da eNOS (87%) no córtex renal de ratos submetidos à dano por I/R (KOMURAI *et al*, 2003), e que essa expressão reduzida prejudica a função renal (WESSELLS *et al*, 2006). Portanto, sugerimos através dos nossos resultados que o própolis exerce um efeito protetor contra o dano renal por I/R através de um aumento da expressão da eNOS.

Como foi citado anteriormente, as espécies reativas de oxigênio (EROs), possuem um papel importante nas disfunções tubulares e glomerulares durante uma LRA isquêmica (BONVENTRE *et al*, 2003). O desequilíbrio entre as enzimas antioxidantes e a produção excessiva de EROs durante o processo de lesão isquêmica estão envolvidos na lesão oxidativa renal (McCORD, 2000).

Na presença de estresse oxidativo, ocorre a indução de enzimas antioxidantes e de genes de proteínas de resposta ao estresse, como acontece com a heme-oxigenase (HO-1) (SIKORSKI *et al*, 2004). A HO-1 é a enzima limitante responsável pela degradação do grupo heme em ferro, facilitando a conversão de heme para biliverdina. Essa conversão ocorre com a abertura do anel de heme na presença de NADPH, liberando o ferro e monóxido de carbono. Subsequentemente, a biliverdina é convertida para bilirrubina sob ação da enzima biliverdina redutase (KANWAR, 2001). A indução de HO-1 é considerada como modulador da resposta adaptativa e protetora de uma célula na presença de uma lesão oxidativa ou inflamatória (AGARWAL *et al*, 2000).

A enzima HO-1 está associada a vários processos patológicos, incluindo a IRA. Nos últimos anos, os investigadores foram capazes de demonstrar que a expressão da HO-1 é aumentada em condições associadas com o estresse oxidativo, e que os produtos finais da heme degradação, incluindo a biliverdina e bilirrubina, fornecem proteção contra lesão renal por I/R através de suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias (KIRBY *et al*, 2006). Logo, uma expressão aumentada dessa enzima aumenta a resistência contra a ameaça oxidativa (LEE *et al*, 2005).

No presente estudo, vimos através da imunohistoquímica que a LRA por I/R aumentou consideravelmente os níveis de HO-1 comparados com o grupo SHAM, o que está de acordo com a literatura, como o estudo de YANG *et al* (2013), que relatou também um aumento nos níveis de HO-1 após I/R renal.

Entretanto, podemos observar que o tratamento com o própolis aumentou significativamente a expressão da enzima HO-1 depois do dano por I/R em relação ao grupo SHAM, o que nos sugere que a substância participa na proteção renal através desse mecanismo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação dos efeitos farmacológicos do extrato alcoólico de própolis vermelha, administrada no modelo de LRA por I/R em ratos, nos permitiu tirar as seguintes conclusões:

- ✓ O modelo utilizado neste trabalho de lesão renal aguda induzida por Isquemia/Reperusão (60min + 48h), foi eficaz e adequado, uma vez que desencadeou alterações nos parâmetros renais que indicam lesão: aumento na concentração plasmática de creatinina e uréia, redução do *Clearence* de creatinina, aumento na $FENa^+$ e FEK^+ , aumento do dano oxidativo e redução da defesa antioxidante, além da participação enzimas protetoras (eNOS e Heme-Oxygenase).
- ✓ O extrato alcoólico de própolis vermelha reverteu às alterações dos parâmetros da função renal causada pela LRA, tais como: diminuição dos níveis de creatinina e uréia e aumento da TFG através do aumento do *clearence* de creatinina.
- ✓ O dano tubular proximal resultante da LRA por I/R foi protegido pelo extrato alcoólico de própolis vermelha, por meio da diminuição da $FENa^+$ e FEK^+ .
- ✓ Os achados histopatológicos demonstraram lesões menos intensa nos animais tratados com a própolis vermelha indicando nefroproteção.
- ✓ Foi observada ação antioxidante da própolis vermelha, representada pela diminuição dos níveis de MDA urinários e teciduais, bem como pela elevação dos níveis de GSH..
- ✓ Os achados imunohistoquímicos demonstraram proteção através da elevação da expressão de enzimas protetoras como eNOS e Heme-Oxygenase no grupo tratado.

8 CONCLUSÃO

Esse estudo sugere um efeito protetor da própolis vermelha na Lesão Renal Aguda induzida por Isquemia e Reperfusão. Esta foi a primeira demonstração do efeito da própolis vermelha nesse modelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELA, C.B., HOMER-VANNIASINKHAM, S. clinical implications of ischemia-reperfusion injury. **Pathophysiology**, v.9, p.229-240, 2003.

ABUELO, J.G. Normotensive Ischemic Acute Renal Failure. **The New England Journal of Medicine**. v.357 p.797-805, 2007.

AGARWAL, A., NICK, H.S. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. **J. Am. Soc. Nephrol**, vol.11, p.965-73, 2000.

ALESSIO, H.M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in sport and exercise**, v. 25, p. 218-224, 1999.

ALTINTAS, R., PARLAKPINAR, H., BEYTUR, A., VARDI, N., POLAT, A., SAGIR, M., ODABAS, G.P. Protective Effect of Dextran on Ischemia-Reperfusion-Induced Renal Injury in Rats. **Kidney & Blood Press research**, vol.36, p.220-230, 2012.

ASHTIYANI, S.C., NAJAFI, H., JALALVANDI, S., HOSSEINEIS, F. Protective Effects of *Rosa Canina* L Fruit Extracts on Renal Disturbances Induced by Reperfusion Injury in Rats. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, vol.7, p.290-8, 2013.

ASHTIYANI, S.C., ZOHRABI, M., HASSANPOOR, A., HOSSEINI, N., HAJIHASHEMI, S. Oral Administration of the Aqueous Extract of *Rosmarinus Officinalis* in Rats Before Renal Reperfusion Injury. **IJKD**, vol.7: p.367-377, 2013.

BANDAY, A.A., FAROOQ, N., PRIYAMVADA, S., YUSUFI, A.N.K., KHAN, F. Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. **Life sciences**, vol.82, p.450-9, 2008.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J Ethnopharmacol**, vol.100, p.114-117, 2005.

BAYRAK, O., UZ, E., BAYRAK, R., TURGUT, F.ATMACA, A.F., SAHIN, S., YALDARAM, M.E., KAYA, A., CIMENTEPE, E., AKCAY, A. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. **World J. Urol.**, vol.26, p.285–291, 2008.

BELLOMO, R., RONCO, C., KELLUM, J.A., MEHTA, R.L., PALEVSKY, P. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Critical Care**, v.8, p.204-212, 2004.

BELLOMO. R. Acute Renal Failure. **Respir. Crit. Care Med.**, vol.32, p.639-650, 2011.

BELZER, F.O., SOUTHARD, J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. **Transplantation**, v.45, p. 673-676, 1988.

BERNARDI, R.M., CONSTANTINO, L., MACHADO, R.A., VUOLO, F., BUDNI, P., RITTER, C., DAL-PIZZOL, F. N-acetylcysteine and deferoxamine protects against acute renal failure induced by ischemia/reperfusion in rats. **Rev. Bras. Ter. Intensiva.**, vol.24(3), p.219-223, 2012.

BERNE e LEVY. **Fisiologia**. 6^a ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2009.

BETZ, B., SCHNEIDER, R., KRESS, T., SCHICK, M.A., WANNER, C., SAUVANT, C. Rosiglitazone Affects Nitric Oxide Synthases and Improves Renal Outcome in a Rat Model of Severe Ischemia/Reperfusion Injury. **PPAR Research**, vol.2012, 2012.

BLANTZ, R.C., DENG, A., MIRACLE, C.M., THOMSON, S.C. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.**, vol.118, p.23-43, 2007.

BLEDSON, G., SHEN YAO, Y., HAGIWARA, M., MIZELL, B., TEUTON, M., GRASS, D., CHAO, L., CHAO, J. Role of Tissue Kallikrein in Prevention and

Recovery of Gentamicin-Induced Renal Injury. **Toxicological sciences**, vol.102, p.433–443, 2008.

BOLISETTY S., *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits renal tubular macroautophagy in acute kidney injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, vol.21, p.1702–1712, 2010.

BONVENTRE, J.V., WEINBERG, J.M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **J Am SOC Nephrol**, vol.14(8), p.2199-210, 2003.

BONVENTRE, J.V., Zuk A. ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney int.**, v.66(2), p.480-485, 2004.

BONVENTRE, J. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. **Nephrology Rounds**, v.6, p.304-64, 2008.

BONVENTRE, J.V., YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Science in medicine**, v. 121, p. 4210-4221, 2011.

BUENO-SILVA, B., ALENCAR, S.M., KOO, H., IKEGAKI, M., SILVA, G.V., NAPIMOGA, M.H., ROSALEN, P.L. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **J Agric Food Chem**. Vol.15(19), p.4546-50, 2013.

BULKLEY, G.B. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. **Br. J. Cancer Suppl.**, vol.8, p.66-73, 1987.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **FoodChemToxicol**, vol.36, p.347-363, 1998.

CAPASSO, F., CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, vol.73, p.1-6, 2002.

CHATTERJEE, P.K, ZACHAROWSKI, K., CUZZOCREA, S., OTTO, M., THIEMERMANN, C. Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase reduce

renal ischemia–reperfusion injury in the anesthetized rat in vivo. **FASEB J**, vol.14, p.641–651, 2000.

CHAWLA, L.S., AMDUR, R.L., AMODEO, S., KIMMEL, P.L., PALANT, C.E. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. **Kidney Int.**, v.79, p.1361-1369, 2011.

CHEN, H., XING, B., LIU, X., ZHAN, B., ZHOU, J. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. **J. Surg. Res.**, vol.149, p.287-295, 2008.

CHERTOW, G. M., BURDICK, E., HONOUR, M., BONVENTRE, J. V., BATES, D.W. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol.16, no.11, p.3365–3370, 2005.

CHOI, Y.M., NOH, D.O., CHO, S.Y., SUH, H.J., KIM, K.M., KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT**, vol.39, p.756-761, 2006.

COCA, S.G., YUSUF, B., SHIPAK, M.G., GARG, A.X., PARIKH, C.R. Long term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Am J Kidney Dis**, vol.53(6), p.961-73, 2009.

COLLINO, M., ROGAZZO, M., PINI, A., BENETTI, E., ROSA, C.R., CHIAZZA, F., FANTOZZI, R., BANI, D., MASINI, E. Acute treatment with relaxin protects the kidney against ischaemia/reperfusion injury. **J. Cell. Mol. Med.**, vol.X, p. 1-12, 2013.

CONG, G., CUI, L., ZANG, M., HAO, L. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by a polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides*. **Int J Biol Macromol.**, v.56, p. 14-19, 2012.

COSTA, J. C; NETO, O. M. Insuficiência renal aguda. Simpósio: Urgência e emergência nefrológicas. V. 36, p.307-324, São Paulo, 2003.

COSTA, M.F.B., LIBORIO, A.B., MARTINS, C.S., SOARES, P.M.G., RODRIGUES, F.A.P., MENESES, G.C., MARTINS, A.M.C. Red propolis ameliorates Ischemic-Reperfusion Acute Kidney Injury. **Free Radical Research**, 2013.

DA SILVA, J.F.M., SOUZA, M.C., MATTA, S.R., ANDRADE, M.R., VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chem.**, vol.99, p.431-435, 2006.

DAEMEN, M.A., VANT VEER, C., WOLFS, T.G., BUURMAN, W.A. Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: Involvement of IL-12 and IL-18. **J Immunol**, vol.162, p.5506-5510, 1999.

DAEMEN, M.A., De VRIES, B., BUUMAN, W.A. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. **Transplantation**, vol.73, p.1693–1700, 2002.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PARK, Y.K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** Vol.5, p.435–441, 2008.

DERAKHSHANFAR, A., BIDADKOSH, A., KAZEMINIA, S. Vitamin E protection against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: a biochemical and histopathologic study. **Iranian Journal of Veterinary Research**, vol.8, p.231-238, 2007.

DESAI, M.M., GILL, I.S., RAMANI, A.P., SPALIVIERO, M., RYBICHI, L., KAOUK, J.H. The impact of warm ischemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. **BJU Int**, vol.95, p.377 – 83, 2005.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol.17, p.1503-20, 2006.

DONNAHOO, K.K., MENG, X., AYALA, A., CAIN, M.P., HARKEN, A.H., MELDRUM, D.R. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. **Am J Physiol**, vol.277, p.922-929, 1999.

DONNAHOO, K.K., SHAMES, B.D., HARKEN, A.H., MELDRUM, D.R. Role of tumor necrosis factor in renal ischemia and reperfusion injury (Review). **J Urol**, vol.162, p.196-203, 1999.

DONNAHOO, K.K., MELDRUM, D.R., SHENKAR, R., CHUNG, C., ABRAHAM, E., HARKEN, A.H. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NF κ B and increases TNF- α bioactivity in the kidney. **J Urol**, vol.163, p.1328-1332, 2000.

EATON, D.C., POOLER, J.P. **Fisiologia renal de Vander**. 6^a ed. Porto Alegre, Artmed, 2006.

ESPOSITO E., MONDELLO, S., Di PAOLA, R., MAZZON, E., ITALIANO, D., PATERNITI, I., MONDELLO, P., ALOISI, C., CUZZOCREA, S. Glutamine contributes to ameliorate inflammation after renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, vol.383, p.493–508, 2011.

FATIMA, S., ARIVARASU, N.A., BANDAY, A.A., YUSUFI, A.N.K., MAHMOOD, R. Effect of potassium dichromate on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. **Human and Experimental Toxicology**, vol.24, p. 631–638, 2005.

FERREIRA, A.L.A. Ação de íons Fe⁺⁺⁺ no sistema de óxido-redução do glutation e na lipoperoxidação de membrana em eritrócitos humanos [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 1994.

FERREYRA, C., VARGAS, F., GOMEZ, I.R., PEREZ, R., O'VALLES, F., OSUNA, A. Preconditioning with Triiodothyronine Improves the Clinical Signs and Acute Tubular Necrosis Induced by Ischemia/Reperfusion in Rats. **Plos One**, vol.8., 2013.

FOLEY, D.P., CHARI, R.S. Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies. **Transplant Rev**, vol.1, p.43– 53, 2007.

FONSECA, C.D., WATANABE, M., VATIIMA, M.F.F. Role of Heme Oxygenase-1 in Polymyxin B-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol.56, p.5082–5087, 2012.

FRANCHI JR., G.C., MORAESs, C.S., TORETI, V.C., DAUGSCH, A., NOWILL, A.E., PARK, Y.K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, 2012, 918956-1–918956-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/918956>.

FRANCO, S.L., BRUSCH, M.L., MOURA, L.P.P., BUENO, J.H.P. Avaliação Farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Rev Bras Farmacogn**, vol.9, p.1-10, 2000.

FROZZA, C.O.S., GARCIA, C.S.C., GAMBATO, G., SOUZA, M.D.O., SALVADOR, M., MOURA, S., PADILHA, F.F., SEIXAS, F.K., COLLARES, T., BORSUK, S., DELLAGOSTIN, O.A., HENRIQUES, J.A.P., ROESCH., M.E. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red própolis. **Food and Chemical Toxicology**, vol.52, p.137–142, 2013.

FUNARI, C.S., FERRO, V.O. Análise de Própolis. **CiêncTecnolAliment**, vol.26, p.171-178, 2006.

FUNARI, C.S., FERRO, V.O., MATHOR, M.B. Analysis of **propolis** from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **J. Ethnopharmacol**, vol.42, p.206-12, 2006.

FURCHGOTT, R., ZAWADZK, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, vol.288, p.373–376, 1980.

GANG, G.T., HWANG, J.H., KIM, Y.H., NOH, J.R., KIM, K.S., LEONG, J.Y., CHOI, D.E., LEE, K.W., LUNG, J.Y., SHONG, M., LEE, C.H. Protection of

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, vol.67, p.139–149, 2013.

GILL, N., NALLY, J.V., FATICA, R.A. Failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis, and management. **Chest.**, vol.128, p.2847, 2005.

GODA, N., SUZUKI, K., NAITO, M., *et al.* Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. **J Clin Invest**, vol.101, p.604–612, 1998

GOLDMAN, G., WELBOUM, R., KLAUSNER, J.M., VALERI, C.R., SHEPRO, D., HECHTMAN, H.B. Thromboxane mediates diapedesis after ischemia by activation of neutrophil adhesion receptors interacting with basally expressed intercellular adhesion molecule-1. **Circ Res**, vol.68, p.1013-1019, 1991.

GOLIGORSKY, M.S., BRODSKY, S.V., NOIRI, E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. **Kidney Int.**, vol.61, p.855–861, 2002.

HADI, N.R., AL-AMRAN, N.H., HUSSEIN, A.H. Effects of thyroid hormone analogue and a leukotrienes pathway-blocker on renal ischemia/ reperfusion injury in mice. **BMC Nephrology**, vol.12, p.70, 2011.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, vol.142, p.231-255, 2004.

HAYACIBARA, M.F., KOO, H., ROSALEN, P.L., DUARTE, S., FRANCO, E.M., BROWEN, W.H., IKEGAKI, M., CURY, J.A. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J. Ethno pharmacol**, vol.100, p.110-115, 2005.

HEEMSKERK, S., MASEREEUW, R., RUSSEL, F.G., PICKKERS, P.. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. **Nat Rev Nephrol.**, vol.5, p.629-640, 2009.

HEUVEL, M. G. W., VAN DEN A., BAST G.R.M.M., HAENEN A.W., AMBERGEN, J.F., MERMANS, R.R.W.J. The role of antioxidants in ischaemia-reperfusion in a human DIEP flap model. **British Journal of Plastic Surgery**, 2012.

HEYMAN, S.N., ROSENBERGER, C., ROSEN, S. experimental ischemia-reperfusion: biases and myths – the proximal vs distal hypoxic tubular injury debate revisited. **KidneyInt**, vol.77(1), p.9-16, 2010.

HOSTE, E.A.J, SCHURGERS, M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is this problem? **Crit Care Med**, vol.36, p.146-151, 2008.

HU, F., HEPBURN, H.R., LI, Y., CHEN, M., RADLOFF, S.E., DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis(bee glue) on acute inflammatory animal models. **Ethnopharmacol**, vol.100, p.276-283, 2005.

HU, L., YANG, C., ZHAO, T. Erythropoietin ameliorates renal ischemia and reperfusion injury via inhibiting tubulointerstitial inflammation. **J. Surg. Res.**, vol.176, p.260, 2012.

HUMPHREYS, B. D., SOIFFER, R.J., MAGEE, C.C. Renal Failure Associated with Cancer and Its Treatment:An Update. **Am Soc Nephrol**, v.16, p.151–161, 2005.

HSU, S.M., RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, vol.29(11), p.1349-53, 1981.

HWANG, H.S., YANG, K.J., PARK, K.C., CHOI, H.S., KIM, S.H., HONG, S.Y., JEON, B.H., CHANG, Y.K., PARK, C.W., KIM, S.Y., LEE, S.J., YANG, C.W. Pretreatment with paricalcitol attenuates inflammation in ischemia–reperfusion injury via the up-regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. **Nephrol. Dial. Transplant.**, vol.28, p.1156–1166, 2013.

KADOTA, S., BANSKOTA, A.H., NAGAOKA, T., SUMIOKA, L.Y., TEZUCA, Y., AWALE, S., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K. Antioproliferative activity of

the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, vol.80, p.67-73, 2002.

KANWAR, Y.S. Heme oxygenase-1 in renal injury: conclusions of studies in humans and animal models [editorial]. **Kidney Int.**, vol.59, p.378-98, 2001.

KELLUM, J. A. Acute kidney injury. **Critical Care Medicine**, vol.36, p.S141–S145, 2008.

KELLUM, J.A., SRISAWAT, N. Acute kidney injury: definition, epidemiology and outcome. **Current Opinion in Critical Care**, v.17, p.548-555, 2011.

KHUNDMIRI, S.J., ASGHAR, M., KHAN, F., SALIM, S., YUSUFI, A.N.K. Effect of ischemia and reperfusion on enzymes of carbohydrate metabolism in rat kidney. **Journal of Nephrology**, vol.17, p.1–7. 2004.

KIM, E.J., LEE, Y.J., AHN, Y.M., LEE, H., KANG, D.G., LEE, H.S. Renoprotective effect of *Alpiniae oxyphyllae* Fructus on ischemia/ reperfusion-induced acute renal failure. **Arch. Pharm. Res.**, vol.36, p.1004–1012, 2013.

KIRKBY, K.A., ADIN, C.A. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. **Am. J. Physiol. Ren. Physiol**, vol.290, p.563, 2006.

KOFLER, J., YOKOTA, N., WEISFELDT, M., TRAYSTMAN, R.J., RABB, H. Acute renal failure after whole body ischemia is characterized by inflammation and T cell mediated injury. **Am J Physiol: Renal Physiol**, vol.285, p.87-94, 2003.

KOMURAI, M., ISHII, Y., MATSUOKA, F., et al. Role of nitric oxide synthase activity in experimental ischemic acute renal failure in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, vol.244(1-2), p.129–133, 2003.

KONOPKA, L.C., JURACH, A. Experimental model for the study of chronic renal ischemia in rats: morphologic, histological and ultra-structural analysis. **Acta Cir Bras**, vol.22(1), p.12-21, 2007.

KORKMAZ, A. and KOLANKAYA, D. Protective Effect of Rutin on the Ischemia/Reperfusion Induced Damage in Rat Kidney. **Journal of Surgical Research**, vol.164, p.309–315, 2010.

KOVACIC. P., SOMANATHAN, R. Unifying mechanism for eyetoxicity: electron transfer, reactive oxygen species, antioxidant benefits, cell signaling and cell membranes. **Res. Cell Membr. Free Radic.**, vol.2, p.56–69, 2008.

KRIBBEN, A., HERGET-ROSENTHAL, S., PIETRUCK, F., PHILIPP, T. Acute renal failure: a review. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, vol.128, N.22, p. 1231–1236, 2003.

LAMEIRE, N., VAN BIESEN, W., VANHOLDER, R. Acute renal failure. **The Lancet**, vol.365, no.9457, p.417–430, 2005.

LAMEIRE, N.H., BAGGA, N., CRUZ, D., MAESENEER, J., ENDRE, Z., KELLUM, J.A., LIU, K.D.L., MEHTA, R.L., PANNU, N. Acute kidney injury: an increasing global concern. **The Lancet**, v.6736, p.1-10, 2013.

LEE, P.C., HO, I.C., LEE, T.C. Oxidative stress mediates sodium arsenite-induced expression of heme oxygenase-1, monocyte chemoattractant protein-1, and interleukin-6 in vascular smooth muscle cells. **Toxicol. Sci.**, vol.85, p.541, 2005.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição, Clínica**, v.2, p.1-14, 2003.

LIEBERTHAL, W., LEVINE, J.S. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. **American Journal of Physiology**, vol.271, p.477–488, 1996.

LIMA, M.G. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

LUCCHESI, B.R. Role of neutrophils in ischemic heart disease: pathophysiologic role in myocardial ischemia and coronary artery reperfusion. **Cardiovasc Clin**, vol.18, p.35-48, 1987.

- McCORD, J.M. The evolution of free radical and oxidative stress. **Am. J. Med.**, vol.108, p.652-9, 2000.
- McCORD, J.M., EDEAS, M.A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. **Biomed Pharmacother**, vol.59, p.139, 2005.
- MANI, F., DAMASCENO, H.C.R., NOVELLI, E.L.B., MARTINS, E.A.M., SFORCIN, J.M. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J Ethnopharmacol**, vol.105, p.95-98, 2006.
- MARCUCCI, M.C., FERRERES, F., GARCÍA-VIGUERA, C., BANKOVA, V.S., DE CASTRO, S.L., DANTAS, A.P., VALENTE, P.H.M., PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, vol.74, p.105-112, 1996.
- MATSUDA, A.H., MACHADO, L.B., MASTRO, N.L. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiat. Phys. Chem.**, vol.63, p.353-355, 2002.
- MAXWELL, S.R.J., LIP, G.Y.H. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **Int. J. Cardiol.**, vol.58, p.95-117, 1997.
- MEHTA, R.L., KELLUM, J.A., SHAH, S.V., et al. Acute Kidney Injury Network (AKIN): report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Crit Care**, vol.11(2), p. 31, 2007.
- MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, vol.72, p.405-411, 2005.
- MILHOAN, K.A., LANE, T.A., BLOOR, C.M. Hypoxia induces endothelial cells to increase their adherence for neutrophils: role of PAF. **Am J Physiol**, vol.263, p.956-962, 1992.
- MOREIRA, T.F. Composição química do própolis: Vitaminas e aminoácidos. **Rev Bras Farmacogn**, vol.1, p.12-19, 1986.

MORRISSEY, J.J., McCRACKEN, R., KANETO, H., YANG, B., MONTANI, D., KLAHR, S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. **Kidney Int**, vol.45, p.998-1005, 1994.

MOSSALAYL, M.D., RAMBERT, J., RENOUF E., MICOULEAU, M., MÉRILLON, J.M. Grape polyphenols and propolis mixture inhibits inflammatory mediator release from human leukocytes and reduces clinical scores in experimental arthritis. **Phytomedicine**., vol.944-7113(13)00318-8, 2013.

MURPHY, B.M., DANDY, D.S., HENRY, C.S Analysis of oxidative stress biomarkers using a simultaneous competitive/non-competitive micromosaic immunoassay. **Anal Chim Acta**, vol.27, p.1-6, 2009.

OLIVEIRA, E.M., RAMIRES, P.R., LANCHA JUNIOR, A.H. Nutrição e bioquímica do exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, V. 18, p. 7-19, 2004.

OZBEK, E. Induction of oxidative stress in kidney. **International journal of nephrology**, v.2012, p.1-6, 2012.

OZEN, S. ERSAN ODACI, E.; AKYOL, O.; IRAZ, M.; YILDIRIM, Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of applied toxicology : JAT**, v.24, p.27-35, 2004.

OZKUL, Y., SILICI, S., ERÖGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, vol.12, p.742-747, 2004.

PAGLIUSO, R.G., GOLONI-BERTOLLO, E.M., ABBUD FILHO, M., PAVARINO-BERTELLI, E.C. Estresse oxidativo e Disfunção Crônica do Enxerto: Renal Oxidative stress and Renal Chronic Allograft Dysfunction. **Arq. Ciênc. Saúde**., v.13, n.4, p.223-227, 2006.

PALLER, M.S., HOLDAL, J.R., FERRIS, T.F. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. **J Clin Invest**., vol.74, p.1156, 1984.

PANNU, N., NADIM, M.K. An overview of drug-induced acute kidney injury. **Crit Care Med**., v.36, p.216-223, 2008.

PARK, Y.K., IKEGAKI, M., ABREU, J.A.S., ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **CiêncTecnolAliment**, vol.18, p.313-318, 1998.

PARK, Y.K., IKEGAKI, M., ALENCAR, S.M., MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Sci.**, vol.21, p.85–90, 2000.

PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., SCAMPARINE, A.R.P., AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, vol.2, p.997-1003, 2002.

PARLAKPINAR, H., TASDEMIRA, S., POLATB, A., BAY-KARABULUT, N., VARDID, M., UCARD, A. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. **Toxicology**, vol.207, p.169-177, 2005.

PATERSON, I.S., KLUSNER, J.M., GOLDMAN, G., KOBZIK, L., WELBOURN, R., VALERI, C.R., SHEPRO, D., HECHTMAN, H.B. Thromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst. **Surgery**. vol.106(2), p.224-9, 1989.

PEREIRA, A.S., SEIXAS, F.R.M.S., AQUINO NETO F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim Nova**, vol.25, p.321-326, 2002.

PICCINELLI, A.L., LOTTI, C., CAMPONE, L., CUESTA-RUBIO, O., CAMPO FERNADEZ, M., RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, vol.59, p.6484–6491, 2011.

QUIROS, Y., VICENTE-VICENTE, L., MORALES, A.L., LPÉZ-NOVOA, J.M., HERNANDES, F.J.L. An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the

Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. **Toxicological sciences**, v.119, n.2, p.245-256, 2011.

RABB, H., O' MEARA, Y.M., MADERNA, P., COLEMAN, P., BRADY, H.R. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. **Kidney Int**, vol.51, p.1463-1468, 1997.

RAJAN, D., WU, R., SHAH, K.G., JACOB, A., COPPA, G.F., WANG. P. Human ghrelin protects animals from renal ischemia-reperfusion injury through the vagus nerve. **Surgery**, v.151, p.37-47, 2012.

RIELLA, L.V., RIELLA, C.V., RIELLA, M.C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2010.

RIGHI, A.A., ALVES, T.R., NEGRI, G., MARQUES, L.M., BREVER, H., SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J. Sci. Food Agric.**, vol.91, p.2363–2370, 2011.

ROCHA, L., DOS SANTOS, L.R., ARCENIO, F., CARVALHO, E.S., LÚCIO, E.M.R.A., ARAÚJO, G.L., TEIXEIRA, L.A., SHARAPIN, N. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn**, vol.13, p.71-74, 2003.

ROGERS, N.M., STEPHENSON, M.D., KITCHING, A.R., HOROWITZ, J.D., COATES, P.T.H. ischaemia–reperfusion injury by liposomal delivery of curcumin to renal tubular epithelial and antigen-presenting cells. **British Journal of Pharmacology**, vol.166, p.194–209, 2012.

SAID, M. The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. **Fundamental & clinical pharmacology**, v.25, p.708-16, 2011.

SAIKUMAR, P., VENKATACHALAM, M.A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. **Semin. Nephrol.**, vol.23, p.511–521, 2003.

SAHNA, E., PARLAKPINAR, H., CIHAN, O.F., TURKOZ, Y., ACET, A. Effects of aminoguanidine against renal ischemiareperfusion injury in rats. **Cell Biochem Funct.**, vol.24, p.137–141, 2006.

SALATINO, A., TEIXEIRA, E.W., NEGRI, G., MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **e CAM**,vol.2, p.33-38, 2005.

SANDERS, D.B., LARSON, D.F., HUNTER, K., GORMAN, M., YANG, B. Comparison of tumor necrosis factor-alpha effect on the expression of iNOS in macro and cardiac myocytes. **Perfusion**, vol.16, p.67-74, 2001.

SANDHI, J., SINGH, J.P., KAUR, T., GHUMAN, S.S., SINGH, A.P. Involvement of progesterone receptors in ascorbic acidemediated protection against ischemia-reperfusioninduced acute kidney injury. **Journal of surgical research**, 2013.

SANTANGELO, F., WITKO-SARSAT, V., DRUEKE, T., DESCAMPS, B. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, n.8, 2004.

SCHRIER, R. W., WANG, W., POOLE, B., MITRA, A.Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy.**TheJournal of Clinical Investigation**, vol.114, no.1, p.5–14, 2004.

SECIN, F.P. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. **Adv UroL.**, 2008.

SEDLAK, J.,LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonproteinsulfhydryl groups in tissues with ellman reagents. **Anal.Biochem.**,vol.25, p.192-205, 1988

SENER, G., SEHIRLI, O., VELIOGLU-OGUNÇ, A., CETINEL, S., GEDIK, N., CANER, M., SAKARCAN, A., YEGEN, B.C. Montelukast protects against renal Ischemia/Reperfusion injury in rats. **Pharmacol. Res.**, vol.54, p.65-71, 2006.

SFORCIN, J.M., FERNANDES, J.R.A., LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolisantibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, vol.73, p.243- 249, 2000.

SIKORSKI, E.M., HOCK, T., HILL-KAPTURCZAK, N., AGARWAL, A. The storyso far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. **Am. J. Renal Physiol.**, vol.286, p.425-41, 2004.

SILVA, J.C., RODRIGUES, S., FEAS, X. ESTEVINHO, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of própolis. **Food and Chemical Toxicology**, vol.50, p.1790–1795, 2012.

SINGH, A.P., MUTHURAMAN, A., JAGGI, A.S., SINGH, N., GROVER, K., HAWAN, R. Animal models of acute renal failure. **Pharmacol Rep.**, v.64, p.31-44, 2012.

SIQUEIRA, A.B., GOMES, B.S., CAMBUIM, I., MAIA, R., ABREU, S., SOUZA-MOTTA, C.M., De QUEIROZ, L.A., PORTO, A.L. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, vol.48, p.90–96, 2009.

SOARES, A.K.A., CARMO, G.C., QUENTAL, D.P., NASCIMENTO, D.F., BEZERRA, F.A.F., MORAES, M.O., MORAES, M.E.A. Avaliaçãoda segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikaniaglomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaiferaofficinalis*, *Myroxylontoluifera*, *Nasturtiumofficinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis.**Rev Bras Farmacogn**, vol.16, p.447-454, 2006.

SOLEZ, K., COLVIN, R.B., RACUSEN, L.C., et al. Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy. **Am. J. Transplant.**, vol.7, p.518-526, 2007.

SOUSA, J.P.B., FURTADO, N.A.J.C., JORGE, R., SOARES, A.E.E., BASTOS, J.K.Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev BrasFarmacogn**, vol.17, p.85-93, 2007.

SOUTHARD, J.H., DEN BUTTER, B., MARSH, D.C., LINDELL, S., BELZER, F.O. The role of oxygen free radicals in organ preservation. **KlinWochenschr**, vol.69(21-23), p.1073-6, 1991.

STOJILJKOVIC, N., STOILJKOVICB, M., RANDJELOVICA, P., VELJKOVICA, S., SZCZEPAŃSKA, M., ADAMCZYK, P., ZIORA, K., SZCZEPA S.K.I.T. Rasburicase in the treatment of acute kidney injury in a boy with non-malignancy hyperuricemia. **Pediatrics Polska**, vol.87, p.521-524, 2012.

TAKADA, M., NADEAU, K.C., SHAW, G.D., MARQUETTE, K .A., TILNEY,N.L.Thecytokineadhesionmolecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the ratkidney.Inhibition by a soluble P-selectinligand. **J. Clin. Invest.**, vol.99, p.2682-2690, 1997.

TANAKA, R., TAKAYAMA, J., TAKAOKA, M., SUGINO, Y., OHKITA, M., MATSUMARA, Y. Oligomycin, an F1FO-ATPase Inhibitor, Protects Against Ischemic Acute Kidney Injury in Male but Not in Female Rats. **J. Pharmacol Sci.**, vol.123, p.227–234, 2013.

THADANI, R., PASCCUAL, M., BONVENTRE, J.V. Acute renal failure. **New England Journal of Medicine**, vol.334, p.1146–1448, 1996.

TORRAS, J., CRUZADO, J.M., GRYNIO, J.M. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. **Transplant. Proc.**, vol.31, p.2217-8, 1999.

UCHUYAMA, M., MIHARA, M. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl4 intoxication, and vitamin Edeficiency.**Biochemic.Med.**, vol.23, p.302-311, 1978.

VARGAS, A.C., LOGUERCIO, A.P., WITT, N.M., DA COSTA, M.M., SÁ e SILVA, M., VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, vol.34, p.159-163, 2004.

VICENTINO, A.R.R., MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev BrasFarmacogn**,vol.17, p.384-387, 2007.

WALKER, R.J., ENDRE, Z.H. Cellular Mechanisms of Drug Nephrotoxicity. **Seldin and Giebisch's The Kidney**, chapter 87, p. 2507-2535, 2008.

WANG, Z., SCHELEY, G., TURKOGLU, G., et al. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. **Nephrol. Dial. Transpl.**, vol.27, p.929, 2012.

WATSON, D.G., PEYFOON, E., ZHENG, L., LU, D., SEIDEL, V., JOHNSTON, B., et al. Application of principal components analysis to H-1-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. **Phytochem. Anal.**, vol.17, p.323–331, 2006.

WESSELLS, H., TEAL, T.H., LETTRELL, I.P., SULLIVAN, C.J. Effect of endothelial cell-based iNOS gene transfer on cavernosal eNOS expression and mouse erectile responses. **International Journal of Impotence Research**, vol.8(5), p.438–445, 2006.

WEVER, K.E., WAGENER, F.A.D.T.G., FRIELINK, C., BOERMAN, O.C., SCHEFFER, G.J. ALLISON, A. MASEREEUW, R., RONGEN, G.A. Diannexin protects against renal ischemia reperfusion injury and targets phosphatidylserines in ischemic tissue. **PLoS One**, v.6, 2011.

WOISKY, R.G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apicult Res**, vol.37, p.99-105, 1998.

YANG, H., LI, H., WANG, Z., SHI, Y., JIANG, G., ZENG, F. Exendin-4 ameliorates renal ischemia reperfusion injury in the rat. **Journal of Surgical Research**, 2013.

YONAR, M.E., YONAR, S.M., SILIC, S. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). **Fish & Shellfish immunology**, vol.31, p. 318-325, 2011.

YONAR, M.E., YONAR, S.M., URAL, M.S., SILICI, S., UKCAN, M. Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. **Food and Chemical Toxicology**, vol.50, p.2703–2708, 2012.

ZHANG, J., YAO, Y., XIAO, F., LAN, X., YU, C., ZHANG, Y., JIANG, C., YANG, J., PEI, G., LI, Y., RONG, S., HU, S., LI, J., XU, G. Administration of dexamethasone protects mice against ischemia/reperfusion induced renal injury by suppressing PI3K/AKT signaling. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, vol.6(11), p.2366-2375, 2013.

ZOU, C., HU, H., XI, X., SHI, Z., WANG, G., HUANG, X. Pioglitazone protects against renal ischemia-reperfusion injury by enhancing antioxidant capacity. **Journal of surgical research**, 2013.