

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVIA DANIELE RODRIGUES

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE ÁCIDO ALFA LIPÓICO NA  
PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EXPERIMENTAL

CURITIBA

2012

SILVIA DANIELE RODRIGUES

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE ÁCIDO ALFA LIPÓICO NA  
PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Básica.

Orientadora: Profa. Dra.Lia Sumie Nakao.

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Rodrigues, Silvia Daniele

Efeitos da administração oral de ácido alfa lipóico na progressão da doença renal crônica experimental. / Silvia Daniele Rodrigues. – Curitiba, 2012.

62 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lia Sumie Nakao

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Doença renal. 2. Estresse oxidativo. 3. Ácido Lipoico. I. Título II. Nakao, Lia Sumie. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 612.463



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## TERMO DE APROVAÇÃO

**“EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO  
NA PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA  
EXPERIMENTAL”**,

por

**SÍLVIA DANIELE RODRIGUES**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lia Sumie Nakao (presidente)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia Regina Martinez

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Giseli Klassen

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karin Braun Prado  
membro suplente

Curitiba, 10 de outubro de 2012.

Aos meus pais João e Eloina,  
Aos meus irmãos Flávio e Camila,  
Ao Gustavo  
E ao meu cationeiro Bidu bandido,  
Pelo amor incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Lia Sumie Nakao, pela parceria e orientação nas dificuldades encontradas durante o mestrado.

Aos professores Silvio Marques Zanata e Adriana Frohlich.

Ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

Ao CNPq, Instituto Redoxoma e CAPES pelo fomento à pesquisa.

Ao grupo de Pesquisa em Patologia Redox:

Aos alunos e ex-alunos do grupo de Pesquisa em Neurobiologia da Navegação Axonal, Fernanda, Amanda, Susan, Breno, Giuseppe, Celso, Ana Paula, Luiz Eduardo Rizzo, Karime, Michele Dietrich e especialmente ao Max Ingberman.

Aos meus pais, João e Eloina, que juntamente com as agências de fomento “paitrocinaram” esse projeto de pesquisa e de vida.

Sem mais, obrigada.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

*Albert Einstein.*

## RESUMO

Uremia é o acúmulo de toxinas urêmicas no sangue resultante da degeneração das funções renais. O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio na sinalização e no controle redox. Esse desequilíbrio contribui para o desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas tais, como doenças vasculares, respiratórias, artrite e câncer. De fato, o estresse oxidativo parece contribuir para a progressão da doença renal crônica (DRC). A compreensão dos papéis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) sobre o progresso da DRC pode levar a prevenção e/ou tratamento dessa patologia. No nosso trabalho empregamos a uremia experimental em ratos para investigar o efeito de um tratamento crônico com ácido alfa-lipóico (LA), um composto lipo/hidrossolúvel que apresenta duas formas, uma reduzida conhecida como dihidrolipóico (DHLLA) e outra oxidada conhecida como lipoato (LA). Este composto apresenta ação antioxidante e anti-inflamatória, LA é cofator para enzimas mitocondriais bioenergéticas, desempenhando um papel importante nas reações desidrogenases mitocondriais, ambas as formas reagem com espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido, radicais hidroxila e peroxila, ácido hipocloroso e oxigênio singlete. Outra característica antioxidante importante está na proteção das membranas ao interagir com a vitamina C e a glutatona, que por sua vez pode reciclar a vitamina E. Tendo em vista estes fatores e para mimetizar a progressão da DRC, bem como para avaliar os possíveis efeitos antioxidantes de ácido alfa lipóico realizamos em nosso laboratório a nefrectomia de 5/6 em ratos Wistar (DRC), e também a operação de laparotomia em animais do grupo controle (*sham*). Por um período de 53 dias administramos ácido alfa lipóico *ad libitum* (25 mg/kg/dia), iniciando em 7 dias pós cirurgia e finalizando em 60 dias (pós cirúrgicos), em ambos os grupos. O potencial de redução, a concentração de ureia e a glomeruloesclerose tiveram níveis aumentados no grupo controle DRC, enquanto no grupo controle (*sham*) se manteve constante. Animais DRC quando tratados com LA apresentaram níveis significativamente menores em relação ao potencial de redução, a ureia e a glomeruloesclerose quando comparados ao grupo DRC sem tratamento. Estes resultados sugerem que a administração de LA pode ser potencialmente útil em prevenir tanto a geração de ROS / RNS quanto proteger contra os danos resultantes produzidos pelo estresse oxidativo em ratos com DRC. Dessa forma nossos dados

sugerem que futuramente ácido alfa lipóico pode ser utilizado como agente terapêutico contra as complicações causadas pela uremia.

Palavras-chave: Doença renal crônica. Estresse oxidativo. HPLC. Ácido alfa lipóico.

## ABSTRACT

Uremia is the accumulation of uremic toxins in the blood resulting from degeneration of kidney function. Oxidative stress is the result of imbalance in redox signaling and control. This imbalance contributes to the development of many chronic diseases such as vascular diseases, respiratory, arthritis and cancer. In fact, oxidative stress seems to contribute to the progression of chronic kidney disease (CKD). The understanding of the roles of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) on the progress of CKD can lead to prevention and / or treatment of this pathology. In our work we use the experimental uremia in mice to investigate the effect of chronic treatment with alpha-lipoic acid (LA), a compound lipo / hydrosoluble which has two forms, known as a reduced dihydrolipoic (DHLA) and the other known as oxidized lipoate (LA). This compound has antioxidant and anti-inflammatory, LA is a cofactor for mitochondrial bioenergetic enzymes, playing a major role in mitochondrial dehydrogenases reactions, both forms react with reactive oxygen species such as superoxide radicals, hydroxyl radicals and peroxy, hypochlorous acid and singlet oxygen. Another feature is important antioxidant in protecting the membranes by interacting with glutathione and vitamin C, which in turn can recycle vitamin E. Considering these factors and to mimic the progression of CKD, as well as to evaluate the possible effects of antioxidant alpha lipoic acid performed in our laboratory nephrectomy of 5/6 in Wistar rats (CKD), and also the operation of laparotomy in animals the control group (sham). For a period of 53 days manage ad libitum alpha lipoic acid (25 mg / kg / day), starting at 7 days after surgery and ending on day 60 (post-surgery) in both groups. The potential for reducing the concentration of urea and glomerulosclerosis had increased levels in CKD control group, while the control group (sham) remained constant. CKD animals when treated with LA showed significantly lower levels compared to the potential reduction in urea and glomerulosclerosis when compared with untreated CKD. These results suggest that the administration of LA may be potentially useful in preventing both the generation of ROS / RNS as protecting against damage resulting from oxidative stress produced in rats with CKD. Therefore, our data suggest that in the future alpha lipoic acid can be used as a therapeutic agent against complications caused by uremia.

Keywords: Chronic kidney disease. Oxidative stress. HPLC. Alpha lipoic acid.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM NÉFRON.....	21
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESTRUTURA MOLECULAR DE ÁCIDO ALFA LIPÓICO .....	29
FIGURA 3 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA HISTOLOGIA RENAL.....	39
FIGURA 4- MASSA RENAL E CORPÓREA .....	40
FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA REPRESENTATIVA DE TECIDO RENAL, POR COLORAÇÃO DIFERENCIAL PAS (ÁCIDO PERIÓDICO - SCHIFF), AUMENTO DE 200X.....	41
FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA EM AUMENTO DE 400x, TECIDO RENAL DE UM ANIMAL SHAM.....	42
FIGURA 7 – GLOMÉRULO VISTO POR MICROSCOPIA ÓPTICA EM AUMENTO DE 400X .....	43
FIGURA 8 – ANÁLISE DE UREIA PLASMÁTICA .....	44
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO .....	46
FIGURA 10 – ANÁLISE DO POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO .....	47
FIGURA 11 – CORRELAÇÃO DOS DADOS DE POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO E UREIA PLASMÁTICA.....	48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	16
TABELA 2 – MASSAS RENAIIS DE RATOS <i>Wistar</i> , CONTROLE E NEFRECTOMIZADOS .....	39
TABELA 3 – DADOS HISTOPATOLÓGICOS EM LÂMINA DE TECIDO RENAL .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

LA	- Ácido alfa lipóico
cm	- Centímetros
Cys	- Cisteína
Cyss	- Cistina
DCV	- Doença cardiovascular
DHLA	- 1,2-ácido-ditiolano-3-pentanóico
DP	- Desvio padrão
DRC	- Doença renal crônica
DTPA	- Diethylenetriaminepentaacetic dianhydride
Eh	- Potencial de redução
EPO	- Eritropoietina
ERNS	- Espécies reativas de nitrogênio
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
HPLC	- High performance liquid chromatography
IRA	- Insuficiência renal aguda
MEC	- Matriz extracelular
mV	- Milivolts
rpm	- Rotações por minuto
s/t	- Sem tratamento
SBN	- Sociedade brasileira de nefrologia
SUS	- Sistema único de saúde
TGF	- Taxa de filtração glomerular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	17
1.2 OBJETIVOS .....	17
1.2.1 Objetivo geral .....	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
1.3 METODOLOGIA.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 FISIOLOGIA RENAL .....	19
2.1 INSUFICIÊNCIA RENAL .....	22
2.1.1 INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA (IRA).....	22
2.1.2 INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA OU DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC).....	22
2.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DA DRC .....	23
2.3 MODELO DA NEFRECTOMIA DE 5/6.....	24
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.5 ÁCIDO ALFA-LIPÓICO (LA).....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1 INDUÇÃO DA UREMIA EXPERIMENTAL PELO MODELO DE ABLAÇÃO RENAL DE 5/6. ....	33
3.2 TRATAMENTO COM ÁCIDO ALFA LIPÓICO.....	34
3.3 COLETA DE AMOSTRAS .....	34
3.4 PLASMA.....	34
3.5 PREPARO DAS SEÇÕES HISTOLÓGICAS.....	35
3.6 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DA GLOMERULOESCLEROSE.....	35
3.7 DETERMINAÇÃO DE UREIA PLASMÁTICA.....	36
3.8 DETECÇÃO DE CYS E CYSS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO DESEMPENHO E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA (HPLC-EC).....	36
3.8.1 PREPARO DAS AMOSTRAS. ....	36
3.9 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	37
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	37
<b>4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 EFEITOS GERAIS DO LA EM RATOS COM NEFRECTOMIA DE 5/6.....	38

4.2 GLOMERULOESCLEROSE.....	40
5.3 DETERMINAÇÃO DE UREIA PLASMÁTICA .....	46
5.4 QUANTIFICAÇÃO DO POTENCIAL REDOX PLASMÁTICO.....	47
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A função primária do rim é manter constante a composição do meio extracelular. Quando há uma perda significativa da massa renal, seja ela por uma ablação ou consequência de uma lesão no tecido renal, os néfrons remanescentes hipertrofiam-se, esse é um mecanismo de resposta compensatório à perda de massa renal (Himmelfarb, 2009).

Observações clínicas, epidemiológicas e funcionais são compiladas para a caracterização da DRC em 5 estágios (Romão-Jr., 2004), onde a taxa de filtração glomerular (TFG) do paciente é o parâmetro final para esta classificação, tabela 1.

Nos estágios finais da doença, quando a TFG atinge valores criticamente baixos, instala-se a síndrome urêmica, caracterizada pelo acúmulo de solutos potencialmente tóxicos que deveriam ser excretados na urina, esses compostos podem modificar funções bioquímicas e fisiológicas do organismo. Segundo Vanholder (2008), atualmente são conhecidas mais de 110 toxinas urêmicas, distribuídas em três categorias de acordo com suas propriedades físico-químicas, são elas: pequenos compostos solúveis em água, solutos ligados às proteínas e moléculas de médio peso molecular (Vanholder, Baurmeister *et al.*, 2008). Nesta fase, as taxas de mortalidade elevam-se (Douglas, 2001), particularmente por doenças cardiovasculares (DCV) (Levey e Eknoyan, 1999).

TABELA 1. ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

<b>Estágio</b>	<b>Descrição</b>	<b>TFG (mL/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>
<b>1</b>	Dano renal com função normal ou elevada	≥ 90
<b>2</b>	Dano renal com função levemente reduzida	89-69
<b>3</b>	Função renal moderadamente reduzida	59-30
<b>4</b>	Função renal gravemente reduzida (sinais de uremia)	29-15
<b>5</b>	Falência renal	< 15 (ou em diálise)

FONTE: Adaptado de sociedade brasileira de nefrologia (2011).

A Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) registrou 92.091 casos de pacientes em diálise. A maioria dos pacientes em tratamento (67%) pertence à faixa etária que abrange entre 19-64 anos, 57% dos pacientes são do sexo masculino,

aproximadamente 36% dos indivíduos também apresentaram hipertensão arterial sistêmica (HAS) e 28% são diagnosticados com *Diabetes mellitus*.

No último censo (2011) a SBN divulgou que no Brasil existem atualmente 687 Unidade Renais cadastradas, sendo que, do total, 643 são unidades ativas com programa crônico de tratamento. Aproximadamente 85% das unidades de diálise no país são financiadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o que torna o estudo da DRC importante, uma vez que, a mesma acomete a cada ano um número maior de brasileiros, em virtude do envelhecimento natural da população e principalmente pelo aumento no número de hipertensos e portadores de diabetes *mellitus*, principais causas da doença renal crônica.

Dados semelhantes registrados na literatura utilizam para essas comorbidades o termo de identificação “riscos tradicionais”, para surgimento da DRC (Stenvinkel, Carrero *et al.*, 2008; Vianna, Soares *et al.*, 2011).

Além destes, também são investigados os “riscos não tradicionais” potencialmente perigosos ao surgimento da fisiopatologia renal, tais como disfunção endotelial, insuficiência cardíaca, aterosclerose, inflamação, estresse oxidativo, tabagismo além da presença de toxinas urêmicas (Miyata, Kurokawa *et al.*, 2000; Dummer, Thome *et al.*, 2007) que contribuem para o aparecimento e progressão de doença renal crônica (Karamouzis, Sarafidis *et al.*, 2008).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Embora não se conheçam exatamente os mecanismos pelos quais a DRC esteja relacionada à DCV, várias linhas de evidência apontam para um papel importante de alguns fatores de risco no desenvolvimento de DCV em DRC, como dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo (Nitta, 2012), este último parece contribuir para a progressão da DRC, justificando o estudo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e o uso de terapias antioxidantes para prevenção e/ou tratamento da doença. Nesse contexto torna-se interessante a investigação de agentes antioxidantes para utilização de terapia e/ou prevenção da progressão da doença renal crônica, através do modelo experimental.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a capacidade do LA, administrado oralmente em ratos submetidos à nefrectomia de 5/6, de inibir a progressão da doença renal crônica.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1. Induzir a DRC em ratos pelo modelo de nefrectomia de 5/6;
2. Avaliar os efeitos do LA sobre a filtração glomerular, determinando os níveis plasmáticos de ureia.
3. Avaliar os efeitos do LA no tecido renal, determinando a infiltração inflamatória e o grau de glomeruloesclerose nos cortes histológicos.
4. Determinar o estresse oxidativo sistêmico pela determinação do potencial redox plasmático.

## 1.3 METODOLOGIA

### *Abordagem experimental*

Este projeto foi submetido e aprovado pelo *Comitê de Ética no Uso de Animais* da Universidade Federal do Paraná sob o número 540 (processo 23075.075634/2011-17).

Foram utilizados para esse modelo experimental ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*) pesando entre 250-280g, os quais foram divididos em quatro grupos experimentais (DRC, *sham*, DRC+LA e *sham* + LA). No sétimo dia pós-cirúrgico teve início o tratamento crônico com LA. A solução aquosa de LA foi ofertada aos animais na água de beber (*ad libitum*). O tratamento foi administrado por 53 dias, totalizando 60 dias de experimentação animal. No sexagésimo dia, 6 ratos de cada grupo experimental foram avaliados e eutanasiados para coleta de amostras. Avaliamos os efeitos do LA na função renal, determinando níveis séricos de ureia, o potencial de redução de cisteína/cistina plasmático e a presença de glomeruloesclerose nas secções histológicas dos rins.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FISIOLOGIA RENAL

Os rins são órgãos pares localizados na parede posterior do abdome, fora da cavidade peritoneal, um de cada lado da coluna vertebral. Em um ser humano adulto pode atingir aproximadamente 12 centímetros (cm) de comprimento, 6 cm de largura e 2,5 cm de espessura, com uma variação de peso na faixa de 120 a 170g (Spence, 1991).

Protegidos pelas costelas, músculos e tecido adiposo, esses órgãos ainda possuem uma cápsula adiposa e outra fibrosa que além do papel de proteção, juntamente com o pedículo renal, auxiliam na sustentação dos rins em sua posição anatômica normal. Sua superfície convexa abriga o parênquima renal, que é subdividido em córtex e medula (Guyton e Hall, 2006).

O córtex, localizado na região mais externa imediatamente abaixo da cápsula renal contém os glomérulos, tubos distais e proximais e os ductos coletores; a medula por sua vez, está localizada abaixo da região cortical e contém as estruturas piramidais. Sua superfície côncava, chamada de hilo, é medial, sendo cada hilo penetrado por uma ramificação da artéria renal, veia renal, nervos e um ureter (Douglas, 2001).

Este órgão desempenha funções complexas, distintas e com capacidade integrativa de natureza homeostática (Guyton e Hall, 2006). Associada diretamente ao sistema cardiovascular possui elevada circulação sanguínea recebendo cerca de 20-25% do débito cardíaco.

Destacam-se as funções de natureza endócrina, com secreção hormonal renal importante. Brevemente, o parênquima renal secreta a eritropoietina (EPO), um hormônio essencial ao organismo por promover a eritropoiese, e renina, enzima que cliva o angiotensinogênio a angiotensina-1, induzindo assim o sistema renina-angiotensina. Este sistema possui ação vasoconstritora, ação estimulante de reabsorção de sódio e ação estimulante da secreção de aldosterona (Douglas, 2001).

Destacam-se ainda a atuação de cininas plasmáticas entre as quais podemos citar a ação da bradicinina tendo função moduladora da circulação renal agindo como elemento vasodilatador e regulador do tônus vascular sistêmico, estimulada pela ação

do óxido nítrico endotelial, que age na regulação da proliferação de células musculares lisas (Mombouli e Vanhoutte, 1995).

Quanto à capacidade de filtração do sangue, os rins possuem aproximadamente dois milhões de unidades filtrantes chamadas néfrons. Cada néfron é dividido em duas subunidades de origens, respectivamente, vascular e renal que juntas desempenham o papel de formação da urina e controle da homeostase (Guyton e Hall, 2006). A unidade do néfron é constituída por diferentes elementos como mostra a figura 1.

Brevemente, o sangue chegando pela artéria renal e entrando pela arteríola aferente, passa pelos capilares glomerulares, onde é ultrafiltrado, e sai pela arteríola eferente. O ultrafiltrado é então coletado na cápsula de Bowman e flui para o túbulo contorcido proximal até a alça de Henle, que determina o processo de contracorrente responsável pela diluição e concentração urinária. O líquido passa então pelo ramo ascendente conhecido por túbulo contorcido distal, que possui menor capacidade de transporte que o túbulo proximal, esta estrutura (túbulo coletor distal) é importante na reabsorção de água e sais terminando finalmente com a urina no ducto coletor (Douglas, 2001; Guyton e Hall, 2006).

Este processo permite a reabsorção de nutrientes essenciais (glicose, eletrólitos, aminoácidos e vitaminas) e eliminação de substâncias potencialmente tóxicas juntamente com o excesso de água (ureia, amônia, creatinina) (Brenner, 2008).

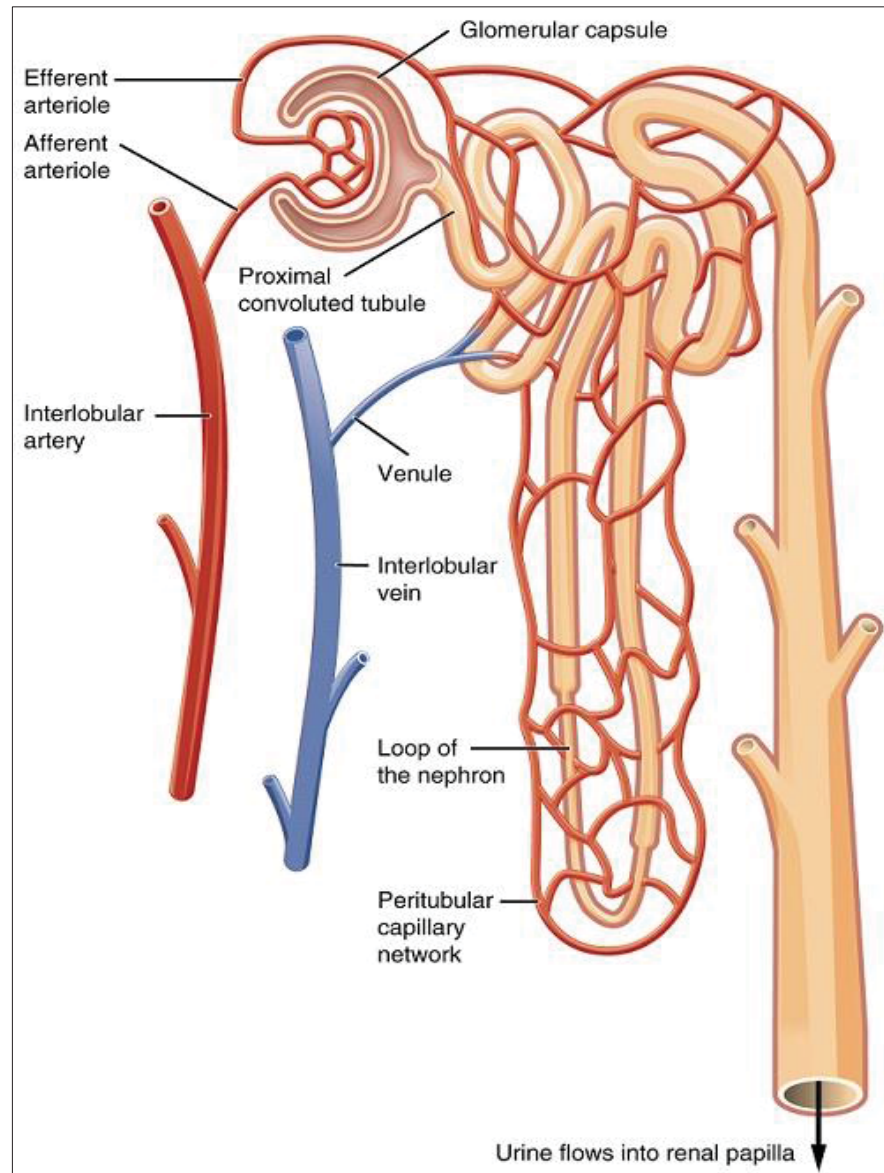


FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM NÉFRONS.  
 FONTE: disponível em <https://biologydictionary.net/nephron/>

Utiliza-se como índice de medida da função renal a taxa de filtração glomerular (TFG), contudo, a sua avaliação é realizada através de medida indireta e varia de acordo com a idade, sexo, musculatura e etnia de um indivíduo. Por convenção adota-se a taxa de filtração glomerular para uma superfície corporal padrão de  $1,73 \text{ m}^2$  ( $\text{mL}/\text{min}/1,72\text{m}^2$ ) (INTERNATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

A TFG corresponde à soma das taxas de filtração em todo o funcionamento dos néfrons, e tem sido considerada como melhor indicador da função renal total. São aplicados para mensuração da TGF métodos que consideram os níveis plasmáticos ou séricos de ureia e creatinina, uma das medidas adotadas para cálculo da TGF é o

*clearance* de creatinina, que é a análise da creatinina durante o período de 24 horas. (Brenner, 2008).

## 2.1 INSUFICIÊNCIA RENAL

A insuficiência renal é caracterizada pela perda da função de filtração e endócrino funcional dos rins, ou seja, a função renal torna-se inadequada à manutenção do meio interno homeostático. Essa fisiopatologia é subdividida em *Insuficiência Renal Aguda* (IRA) e *Insuficiência Renal Crônica* (IRC) ou Doença Renal Crônica (DRC).

### 2.1.1 INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA (IRA).

A IRA é caracterizada principalmente pela redução abrupta da função renal. Pode estar associada à falência múltipla de outros órgãos, ou ainda, ser resultado do declínio de mecanismos fundamentais, tais como, redução da taxa de filtração glomerular, desordens das funções tubulares, obstruções do fluxo urinário e da redução do fluxo sanguíneo renal, sendo consequência de evento fisiológico ou ainda por ação nefrotóxica (metais pesados, antibióticos, drogas imunossupressoras, anestésicos e etc). A taxa de mortalidade associada à presença dessa doença varia entre 27-60% (Hawkins, 2011; Urbschat, Obermuller *et al.*, 2011).

### 2.1.2 INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA OU DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

Descrita inicialmente no século XVII, por Richard Bright, a DRC apresenta um quadro fisiopatológico sistêmico causando a perda lenta, progressiva e irreversível da função renal (Weller e Nester, 1972). Em sua fase mais crítica (fase terminal de insuficiência renal crônica), os rins não conseguem mais manter a normalidade do organismo do paciente. Devido à característica adaptativa dos rins as agressões em seu tecido, os sintomas são tardios não aparecendo até que o funcionamento renal seja menor que um décimo do normal.

Entre as principais causas relacionadas à DRC estão diabetes *mellitus* e hipertensão (Van Buren e Toto, 2011; Coll-De-Tuero, Mata-Cases *et al.*, 2012).

Outros fatores também podem contribuir para o surgimento e agravamento dos estágios de falência renal, tais como, fatores genéticos, ambientais, hemodinâmicos (que levam a lesão mecânica e, principalmente, a uma contínua ativação de mediadores inflamatórios) e distúrbios metabólicos.

Existe uma correlação importante entre filtração glomerular, dislipidemia e inflamação, indivíduos com menor taxa de filtração glomerular, possuem uma maior concentração de triglicérides e, em contrapartida, menor concentração de HDL, assim como aumento de marcadores inflamatórios, quando comparados com os indivíduos com taxa de filtração glomerular normal (Lin, Hu *et al.*, 2006).

## 2.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DA DRC

De forma geral os mecanismos responsáveis pela perda da função renal ocorrem de acordo com uma sequência de eventos já conhecida pela literatura, como Chevalier descreveu em sua revisão, especificamente: ocorre uma lesão glomerular persistente que promove o aumento da pressão capilar favorecendo o aumento da filtração glomerular e da passagem de proteínas para o fluido tubular.

Esse acúmulo de proteínas no fluido tubular é chamado de proteinúria. A proteinúria, por sua vez, aumenta a produção de angiotensina-2, ela também promove a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que induzem o acúmulo de células leucocitárias no interstício renal. Dessa forma, a resposta imune causa, conseqüentemente, um processo inflamatório.

Como resposta a inflamação as células tubulares são substituídas por células cicatrizantes, ou seja, as células epiteliais são substituídas por fibroblastos intersticiais. Os fibroblastos então sintetizam colágeno com conseqüente deposição de matriz extracelular causando uma fibrose glomerular, conhecida como glomeruloesclerose. A glomeruloesclerose é um processo fisiopatológico pelo qual o tecido glomerular é substituído por matriz extracelular (MEC). Na DRC há deposição da MEC dentro dos glomérulos causando a morte das células glomerulares e posteriormente a perda dos glomérulos funcionais (Zatz, 2000; Pozzi, Voziyan *et al.*, 2009).

O glomérulo é dividido em quatro principais componentes: 1) leito capilar, composto por células endoteliais; 2) células mesangiais; 3) podócitos, células epiteliais diferenciadas; 4) membrana glomerular basal. Qualquer disfunção em um

desses quatro componentes do glomérulo pode causar glomeruloesclerose (Borza e Pozzi, 2012).

Outro relevante aspecto na DRC é a presença de isquemia renal, condicionada à evolução crônica da lesão renovascular (Dean, Englund *et al.*, 1985), causada principalmente pela hipoxia medular severa (Brezis e Rosen, 1995), a fibrose intersticial juntamente com a lesão tubular agravada são características de nefroangioescleroses, comumente presentes em pacientes hipertensos.

Entre os fatores que contribuem para a progressão do quadro patológico destacam-se a redução da densidade capilar peritubular, a diminuição do fluxo sanguíneo gerado pela hipoperfusão glomerular, a regulação do tônus vascular mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio, anemia e, possivelmente, pela hipertrofia glomerular (Beltowski, 2010).

Todos esses fatores somados contribuem para o aumento da hipertensão arterial sistêmica, comum em doentes renais em estágios avançados. Estudos associados à observação de peças histológicas (biópsia renal) (Moritz e Hayman, 1934; Dixon, Feldman *et al.*, 1961; Yuen, Lai *et al.*, 2008; Testagrossa, Azevedo Neto *et al.*, 2012) indicam que a rede de capilares envoltos pela cápsula glomerular e do parênquima renal é substituída por hialina. Essa substituição é caracterizada principalmente pela presença de edemas e da elevação da pressão arterial (Zatz, 2000; Zatz e Fujihara, 2002).

### 2.3 MODELO DA NEFRECTOMIA DE 5/6.

Mecanismos que mimetizam a doença renal crônica em modelos animais são há muito tempo investigados na literatura.

A utilização de agentes químicos nefrotóxicos como a administração parentérica de nitrato de urânio (Taulan, Paquet *et al.*, 2004), adriamicina (Harris, 2000) ou ingestão de adenina são avaliados por induzir dano renal em modelos animais como ratos, camundongos, coelhos e cães, contudo, os efeitos destas substâncias sobre os sistemas de órgãos linfóides raramente apresentam dano renal avançado e o monitoramento sistêmico desses agentes também é prejudicado. (Van, Watari *et al.*, 2012).

O modelo experimental de nefrectomia de 5/6, conhecido também por modelo de rim remanescente representa um dos mais utilizados modelos animais de

insuficiência renal, sendo bem caracterizada em ratos. Neste modelo, a redução da massa renal (cerca de 80% removido) é obtida por infarte ou excisão cirúrgica de ramos da artéria renal, com remoção do rim contralateral (Kai-Ming Chow, Zun-Chang Liu *et al.*, 2003).

Esse modelo permite investigar a influência de fatores farmacológicos (Pereira, Shimizu *et al.*, 2012), nutritivos (Gao, Huang *et al.*, 2011) e ainda, parâmetros funcionais e morfológicos renais (Svigliero, Kuncova *et al.*, 2010). Entre os modelos de indução de uremia experimental, a nefrectomia em 5/6 da massa renal é a que melhor representa os achados clínicos encontrados na literatura (Kai-Ming Chow, Zun-Chang Liu *et al.*, 2003).

O que explica a sobrevivência dos animais, e de pacientes em estágios mais avançados da DRC, após o processo de redução da massa renal é a própria capacidade funcional do rim, a qual excede em muito a necessidade mínima necessária à sobrevivência, permitindo que o organismo mantenha-se vivo com 10% ou menos de sua função renal normal, após a redução da massa renal por processos patológicos ou excisão (Zatz, 2000).

Neste modelo, observa-se que após a nefrectomia, os néfrons remanescentes sofrem hipertrofia compensatória, aumentando a capacidade de ultrafiltração em cerca de 3 vezes a taxa normal, devido a hipertrofia glomerular e tubular, e aumento do fluxo plasmático glomerular e da pressão glomerular.

Entretanto, ao atingir o limite do valor máximo de fluxo e pressão glomerulares, a TFG começa a declinar, à medida que o número de néfrons diminui, levando a perda da função renal. Assim, a adaptação atenua a queda progressiva da TFG, mas não a detém (Zatz, 2000).

## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de radicais livres e espécies reativas é caracterizada por um processo contínuo e fisiológico, que cumpre no organismo funções biológicas importantes atuando na defesa e na sinalização celular (Billack, Heck *et al.*, 2002).

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) está associada com o metabolismo e sinalização redox celulares. O consumo do oxigênio durante a respiração celular gera radicais livres como o superóxido, hidroxila e espécies reativas como peróxidos, contra os quais atua o sistema antioxidante

endógeno e exógeno. Contudo, a produção excessiva de radicais livres e espécies reativas, por exemplo, quando mecanismos de defesa antioxidante são insuficientes, pode conduzir a danos oxidativos a proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos, levando a situação de estresse oxidativo.

O conceito de estresse oxidativo definido a primeira vez em 1985 pelo pesquisador Helmut Sies e foi designado como sendo um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e oxidantes produzidos pelo organismo, promovendo um dano oxidativo (Sies, 1985; Augusto, 2006).

Diversos estudos mostraram que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de inúmeras patologias crônicas, tais como: vasculares, respiratórias, renais, artrites e câncer (Zafarullah, Li *et al.*, 2003; Valko, Rhodes *et al.*, 2006; Naito, Anzai *et al.*, 2008).

Uma nova definição para estresse oxidativo vem sendo utilizada, segundo esta definição, o estresse oxidativo é o resultado da disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle, levando a danos oxidativos a biomoléculas (Jones, 2006b).

A relação entre moléculas reduzidas e oxidadas pode ser quantificada pela determinação do potencial de redução plasmático (E) dos pares glutathiona/glutathiona dissulfeto (GSH/GSSG) e cisteína/cistina (CyS/CySS), sendo este último o par redox mais abundante presente no plasma (Jones, 2006).

A glutathiona é a principal defesa antioxidante endógena das células, é responsável pela manutenção do microambiente reduzido, que viabiliza a função celular normal (Ghezzi, 2011). A relação GSH / GSSG é indicadora do estado redox celular, e uma redução crônica nos níveis de GSH reflete uma reduzida capacidade antioxidante e conseqüentemente um aumento da vulnerabilidade a danos oxidativos (Rose, Melnyk *et al.*, 2012).

Em indivíduos saudáveis têm sido encontrados potenciais plasmático em torno de -90 a -60 mV (Jones, Park *et al.*, 2010; Park, Ziegler *et al.*, 2010). Em condições patofisiológicas ou patológicas, estes valores podem aumentar para até -20 mV (Jones, 2006b), denotando um forte estresse oxidativo.

Contudo essas informações ainda não podem ser consideradas como valores de referência ou que os potenciais sejam biomarcadores, pois não existem dados suficientes que demonstrem uma associação significativa entre estado redox plasmático mais oxidado e progressão de doença. Estudos de nosso grupo têm mostrado que o potencial de redução de uma população brasileira jovem e saudável

é bem mais redutor (Batista, 2010) do que os valores encontrados pelo grupo de Jones, que analisou tióis totais no plasma de 24 indivíduos saudáveis (Jones, Carlson *et al.*, 2000), e confirmam que a progressão da DRC é acompanhada por um aumento do  $E_{\text{hCysSS/Cys}}$  (Rodrigues, Batista *et al.*, 2012).

De fato, vários estudos, analisando marcadores clássicos de estresse oxidativo, como produtos de peroxidação lipídica, de danos oxidativos ao DNA e atividade de enzimas antioxidantes (Ribeiro, Campos *et al.*, 2009; Lee, Jackson *et al.*, 2011) indicam que o estresse oxidativo ocorre em pacientes de DRC. Ribeiro e colaboradores demonstraram que a doença renal crônica foi capaz de induzir lesão genética no sangue, fígado, coração e células de rim utilizando o modelo de redução de massa renal de 5/6. Outros dados sugerem que especialmente naqueles pacientes em diálise e em estágios finais danos oxidativos são importantes na progressão da patologia (Clermont, Lecour *et al.*, 2000; Locatelli, Canaud *et al.*, 2003; Vaziri, Dicus *et al.*, 2003; Lee, Jackson *et al.*, 2011).

A perda da função renal deve ser a causa responsável pelo estresse oxidativo, uma vez que sua reposição por diálise (Himmelfarb, Stenvinkel *et al.*, 2002) ou por transplante renal (Aveles, Criminacio *et al.*, 2010) melhora o estado redox plasmático.

Embora ainda não esteja claro o evento celular ou molecular inicial que desencadeia o estresse oxidativo, sabe-se que a ativação de leucócitos e de células vasculares por toxinas urêmicas e por citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na progressão da DRC (Bruchfeld, Carrero *et al.*, 2009; Himmelfarb, 2009). Entre as enzimas envolvidas, a NADPH oxidase (Zalba, Fortuno *et al.*, 2006), e a mieloperoxidase (Himmelfarb, Stenvinkel *et al.*, 2002) parecem ser as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS) responsáveis pelos danos oxidativos.

No modelo da nefrectomia de 5/6 em ratos, o qual tem sido bastante usado para estudos sobre vários aspectos da fisiopatologia da DRC (Fujihara, De Nucci *et al.*, 1995; Svirglerova, Kuncova *et al.*, 2010), foi possível caracterizar a participação da NADPH oxidase através do aumento de suas subunidades (nox-4, gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e rac1) nos tecidos renais remanescentes de ratos nefrectomizados com ablação de 5/6, da NRF2 (Kim e Vaziri, 2010) e da NF- $\kappa$ B no estresse oxidativo e inflamação na DRC, dado que a angiotensina-2 pode ativar NF- $\kappa$ B no sistema inflamatório, em células do parênquima renal residente e vasculares e, que a inibição do sistema NF- $\kappa$ B está associado a melhora da lesão vascular e da inflamação (Fujihara, Antunes *et al.*, 2007).

Utiliza-se a terapia antioxidante no controle da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio somadas à própria defesa antioxidante do organismo através de suplementação vitamínica (tocoferol, ácido ascórbico e retinol), bem como de substâncias com características antioxidantes capazes de sequestrar radicais livres e espécies não radicalares.

A glutatona e a cisteína são compostos redox que atuam como mecanismos de defesas antioxidantes não enzimáticos na eliminação de agentes oxidantes (Packer, Witt *et al.*, 1995; Jomova, Vondrakova *et al.*, 2010; Jones, Park *et al.*, 2010). A glutatona é um co-fator de inúmeras enzimas antioxidantes, como por exemplo da glutatona peroxidase, enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos (Descamps-Latscha, Druke *et al.*, 2001; Jones, 2006a; 2008). Assim, substâncias precursoras de cisteína e glutatona tornam-se potencialmente interessantes no tratamento de patologias associadas ao estresse oxidativo, dentre elas destacam-se os estudos com N-acetil-L-cisteína (NAC), estudada anteriormente pelo nosso grupo (França, 2010), o qual demonstrou que em células endoteliais incubadas com pool de soro de pacientes urêmicos e pré tratadas com NAC tiveram inibidos os sinais que demonstram a presença de estresse oxidativo como, diminuição de DHE pela fração de membrana, diminuição da produção de carbonila e aumento da relação GSH/GSSG entre outros fatores (dados não publicados).

## 2.5 ÁCIDO ALFA-LIPÓICO (LA)

Ácido alfa lipóico ou ácido tióico (1,2-ácido-ditiolano-3-pentanóico) é um composto sintetizado naturalmente através de ações enzimáticas na mitocôndria, existem formas enantiômeras, levógera (R) / dextrógera (S) e, pode ser encontrado na forma oxidada (LA) ou reduzida (DHLA), como mostra figura 2 (INDEX MERCK).

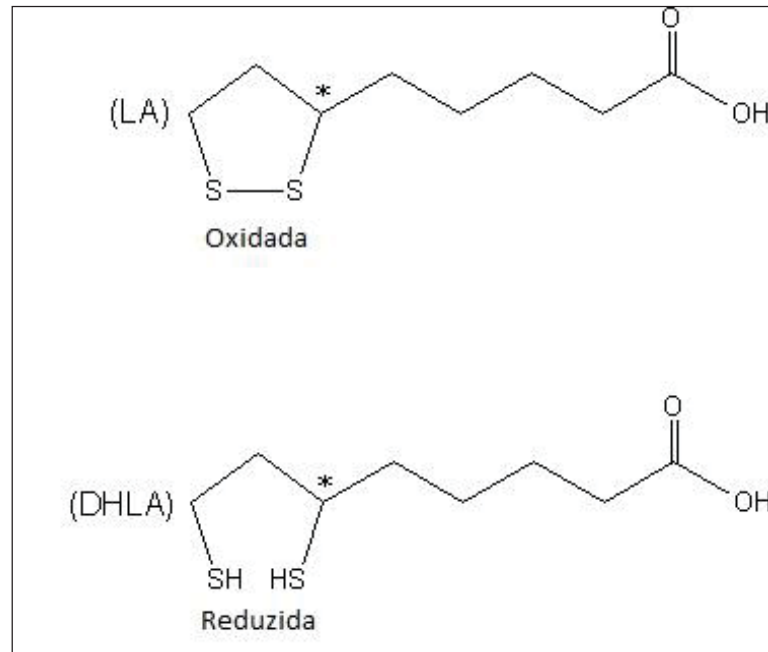


FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESTRUTURA MOLECULAR DE ÁCIDO ALFA LIPÓICO, onde (LA) representa a forma oxidada da molécula e, (DHLA) representa a forma reduzida da molécula.

FONTE: Adaptado de Oregon State University (2012).

LA é um ácido graxo, que atua como cofator de várias  $\alpha$ -cetoácido desidrogenases mitocondriais, e, portanto envolvido no metabolismo energético. Seu papel biológico como cofator é bem conhecido; contudo, o LA pode ser absorvido da dieta, ou por suplementação nutricional, e neste contexto, suas funções e efeitos ainda não estão completamente estabelecidos (Shay, Moreau *et al.*, 2009).

Durante muito tempo essa substância foi descrita como um potente antiinflamatório, mas estudos recentes têm demonstrado que o ácido alfa lipóico pode atuar como antioxidante, uma vez que as formas LA e DHLA criam um par redox que possui um padrão de potencial de redução igual a -320 mV e ambas as formas são capazes de retirar uma variedade de espécies reativas de oxigênio (Shay, Moreau *et al.*, 2009) demonstrando o alto poder redutor da forma DHLA. Contudo, ambas as formas apresentam funções antioxidantes, como capacidade de quelar metais redox, como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  (este somente pela forma reduzida), capacidade de seqüestrar radicais livres, como hidroxila e peroxila, e espécies reativas, como o oxigênio molecular singlete, o peroxinitrito e o ácido hipocloroso (Packer, Witt *et al.*, 1995; Shay, Moreau *et al.*, 2009; Goraca, Huk-Kolega *et al.*, 2011).

Pode atuar ainda como quelante de metal e evidências *in vitro* indicam que a forma LA induz indiretamente o aumento dos níveis de GSH em linhagens de células humanas assim como em cultura primária e, a forma DHLA é capaz de reduzir cistina à cisteína (Shay, Moreau *et al.*, 2009), como dito anteriormente, a cisteína é um substrato limitante na síntese de GSH, sugerindo ter efeito protetor na calcificação vascular e em diversas patologias crônicas (PARKER, WITF, TRISCHLER, 1995; LIBERMAN *et al.*, 2008).

De fato, alguns trabalhos têm demonstrado que a administração de LA em humanos tem levado a consideráveis melhoras em vários parâmetros clínicos e bioquímicos associados ao seu potencial antioxidante (Bilska e Wlodek, 2005), em condições basais (Marangon, Devaraj *et al.*, 1999) e patológicas, como no diabetes e suas complicações (Tankova, Koev *et al.*, 2004; Ziegler, 2004; Mittermayer, Pleiner *et al.*, 2010), câncer (Berkson, Rubin *et al.*, 2009) e doenças neurodegenerativas (Hager, Kenklies *et al.*, 2007).

Em animais experimentais, mais evidências sobre o papel antioxidante de LA têm sido demonstradas em situações como diabetes e suas complicações (Koya, Hayashi *et al.*, 2003; Yi e Maeda, 2006; Johnsen-Soriano, Garcia-Pous *et al.*, 2008; Winiarska, Malinska *et al.*, 2008), aterosclerose (Amom, Zakaria *et al.*, 2008), intoxicação por chumbo (Caylak, Aytekin *et al.*, 2008), glomerulonefrite (Budisavljevic, Hodge *et al.*, 2003) e infecção (Goraca e Jozefowicz-Okonkwo, 2007; Vanasco, Cimolai *et al.*, 2008).

Estudos recentes avaliaram o efeito protetor de LA contra a nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, em camundongos, induzidas por tratamento quimioterápico com cisplatina, os dados obtidos por El-Beshbishy e colaboradores mostraram uma diminuição nos níveis de creatinina sérica, diminuição na produção de malondialdeído e, aumento dos níveis de GSH, SOD catalase, glutathione peroxidase (GPx), principalmente pela iniciação da expressão de mRNA de genes antioxidantes, bem como a diminuição da resposta inflamatória nos animais avaliados (El-Beshbishy *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2012).

Apesar da reconhecida ação quelante de metais de transição e da ação sequestradora de espécies reativas, vários trabalhos têm demonstrado que ácido alfa lipóico pode atuar como antioxidante indiretamente, estimulando vias de sinalização celular, como a ativação de NRF2 (fator nuclear eritróide derivado-2) (Elangovan e

Hsieh, 2008; Shay, Moreau *et al.*, 2009), um fator de transcrição responsável pela expressão de várias enzimas antioxidantes e que culmina na produção de glutathiona.

Em condições normais, a proteína repressora KEAP1 se liga a NRF2 no citoplasma, contudo, na presença de espécies reativas de oxigênio KEAP1 é inativada liberando NRF2, o qual é translocado do citosol para o núcleo celular, dando início à resposta antioxidante. Brevemente, no núcleo celular NRF2 se liga a elementos de resposta antioxidantes (ARE) em uma região promotora dos genes que transcrevem enzimas antioxidantes endógenas. A ativação do complexo NRF2-ARE induz a produção de elementos citoprotetores e de proteínas, tais como: NADPH, SOD, catalase, GPx, peroxiredoxinas, quinona oxidoredutases (NQOs), hemoxigenases, glutamato cisteína ligase (GCL), glutathiona S-transferase, e etc, através desse mecanismo de defesa antioxidante o equilíbrio redox celular é reestabelecido, NRF2 então é dissociado do núcleo e transportado para ubiquitinação proteossômica (Magesh, Chen *et al.*, 2012).

Alternativamente, o aumento na produção de glutathiona pode ser resultado da redução metabólica do LA a DHLA, que por sua vez é liberado pela célula. No meio extracelular, DHLA reduz cistina a cisteína, a qual é internalizada e utilizada pela enzima  $\gamma$ -glutamil cisteína ligase (Han, Handelman *et al.*, 1997).

Os efeitos benéficos do LA em processos patológicos podem também ser resultado da sua capacidade de inibição da via inflamatória NF- $\kappa$ B (Packer, Witt *et al.*, 1995; Kunt, Forst *et al.*, 1999), capaz de prevenir obesidade e de estimular a produção de cAMP em células citotóxicas, a ativação da via de sinalização dependente de cAMP modula diversos aspectos da resposta imune, através da ativação dos receptores de proteína G e adenilato ciclase ácido alfa lipóico é capaz de modular a resposta inflamatória inibindo também a secreção de IFN- $\gamma$  (Salinthon, Schillace *et al.*, 2008).

Dados mostrando efeitos positivos do LA particularmente em modelos de diabetes e nefropatia diabética (Teichert, Hermann *et al.*, 2003) tem sido somados a estudos que utilizam LA no modelo DRC, particularmente um estudo demonstrando que pacientes de DRC e em hemodiálise conseguem metabolizar e excretar LA e seus metabólitos de forma independente do rim (Teichert, Tuemmers *et al.*, 2005).

Outros estudos ainda indicam a possibilidade de LA ter um efeito neuroprotetor. Modelos de lesão medular em ratos ou de hemorragia subaracnóide (Sheldon, Christen *et al.*, 2008) apontam que o uso de LA melhora significativamente os níveis de GSH no córtex cerebral de camundongos neonatal com lesão produzida por hipóxia

isquêmica, reduzindo dessa forma danos causados pelo estresse oxidativo. Nesses estudos a administração de LA foi pré-lesão; contudo em outros estudos o efeito protetor de LA só foi observado com administração via subcutânea (Wolz e Krieglstein, 1996).

A utilização de LA em estudos antiobesidade tem se mostrado muito promissora. Recentemente Fernandez-Galilea e colaboradores demonstraram em seus estudos que LA possui uma ação lipolítica (dose-dependente) atuando como inibidor de JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Fernandez-Galilea, Perez-Matute *et al.*, 2012). Essa proteína desempenha um papel central na regulação da lipólise, uma vez que seu silenciamento acelera a lipólise em adipócitos de ratos (Rozo, Vijayvargia *et al.*, 2008).

Efeitos da terapia com ácido alfa lipóico atenuando a isquemia / reperfusão através da desregulação de aquaporinas, bem como a diminuição da expressão endotelial de óxido nítrico, e transportadores de sódio no rim, foram observadas em modelo animal (Bae, Lee *et al.*, 2008).

Em relação à DRC, Ramos e colaboradores administraram LA oralmente em conjunto com tocoferóis em pacientes em estágios 3 e 4, durante o período de 8 semanas, mas não observaram diferenças significativas nos dados antropométricos, estado diabético, ou taxa de filtração glomerular marcadores de inflamação e de estresse oxidativo entre os grupos tratados e placebo (Ramos, Kane *et al.*, 2011). Entretanto recentemente, foi demonstrado que a administração de LA em ratos com nefrectomia de 5/6 melhorou índices de função renal, inflamação, glomeruloesclerose e estresse oxidativo após 8 semanas de tratamento, contudo nesse estudo observou-se que a continuação do tratamento apresentou uma diminuição nos níveis de função renal e aumentou os níveis de glomeruloesclerose após 12 semanas (Yu, Liu *et al.*, 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 INDUÇÃO DA UREMIA EXPERIMENTAL PELO MODELO DE ABLAÇÃO RENAL DE 5/6.

Ratos *Wistar* machos (n=48) foram submetidos à cirurgia de nefrectomia de 5/6 (Fujihara, De Nucci *et al.*, 1995) (n=24), ou cirurgia *sham* (n=24). Os ratos foram anestesiados com uma associação de ketamina (Vetnil®) e xilazina Xilazin®, respectivamente 50 mg/kg e 10 mg/kg, via intraperitoneal.

Em seguida fez-se a tricotomia e assepsia com álcool iodado da região abdominal. A cavidade abdominal foi aberta seguindo a orientação da linha alba. Com o auxílio de afastadores realizou-se a dissecação da artéria renal esquerda, procurando lesionar o mínimo de estruturas possíveis. Ao localizar o tronco da artéria renal foram ligados dois ou três ramos da mesma, utilizando fio mononylon 7-0. Imediatamente após o infarto renal esquerdo, o rim direito foi removido e, utilizando fio de algodão 4-0 foram suturados a artéria, a veia renal e o ureter, evitando dessa forma morte por hemorragia.

Então com a cavidade abdominal exposta o peritônio foi hidratado com 3 mL de soro fisiológico impedindo a aderência dos órgãos internos uns aos outros. A sutura da musculatura e da pele foi feita utilizando-se fio mononylon 4-0. A soma do infarto renal em 2/3 do rim esquerdo mais a retirada do rim direito caracterizam a nefrectomia de 5/6.

Para a laparotomia dos controles *sham* foi realizado procedimento semelhante ao descrito para o grupo nefrectomizado. No entanto, ao invés da ablação houve apenas manipulação do pedículo renal na região do hilo mantendo intactas todas as estruturas renais. Dessa forma, todos os grupos em estudo foram expostos ao estresse cirúrgico.

Após a cirurgia todos os ratos ficaram aquecidos sob luz amarela incandescente até a recuperação do efeito provocado pela anestesia. Em seguida os grupos de estudo foram colocados em gaiolas plásticas identificadas contendo maravalha, com acesso livre a água e ração, e em sala climatizada com ciclo 12/12 horas (claro / escuro).

A analgesia pós-operatória foi feita utilizando Buscopan® Veterinário. Durante sete dias administrou-se tetraciclina 500 mg/L oralmente, *ad libitum*. Ao término de

cada período experimental realizamos eutanásia por injeção intraperitoneal da associação de anestésicos ketamina + xilazina na dose letal de 100 mg/kg

### 3.2 TRATAMENTO COM ÁCIDO ALFA LIPÓICO

O tratamento com antioxidante foi realizado do 7º ao 60º dia após a cirurgia. A solução de ácido alfa lipóico foi preparada de acordo com protocolo estabelecido em nosso laboratório de acordo com a literatura (Shimizu, Coimbra *et al.*, 2005). Brevemente, pesou-se 250 mg de ácido alfa lipóico dissolvendo-o em 1L de água de torneira aquecida a 70°C sob contínua agitação.

A concentração final dessa solução é de 1,2 mM. Considerando que um rato ingere cerca de 30 mL de água/dia (durante uma semana controlamos o nível de água nas garrafas utilizadas por quatro animais *sham* e quatro animais nefrectomizados e, a partir dessa observação estimamos a ingestão diária de água), a dose diária de LA ficou em torno de 25 mg/kg/dia.

Foram disponibilizados 500 mL dessa solução para cada gaiola, contendo de 2 a 5 ratos por gaiola, armazenados em garrafa plástica de 600 mL de volume. A troca por uma solução fresca era feita a cada dois dias.

### 3.3 COLETA DE AMOSTRAS

Para a coleta de todas as amostras biológicas os animais foram previamente pesados e em seguida foi realizada eutanásia por dose letal de associação de anestésicos (ketamina + xilazina 100 mg/kg), via intraperitoneal.

### 3.4 PLASMA

O sangue foi coletado da artéria aorta através de seringas heparinizadas, e cuidadosamente transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 12 µL de uma solução de conservação contendo 5000 UI/mL de heparina sódica e 5 µL de 50 mM DTPA (ácido dietilenotriamina penta áctico) (Rodrigues, Batista *et al.*, 2012).

A heparina foi utilizada para evitar a coagulação, enquanto o DTPA atua como um quelante evitando a oxidação artefactual da cisteína. O sangue foi então centrifugado a 13000 rpm (microcentrifuga Sorvall) por 1 minuto para a separação das

células sanguíneas. O plasma foi imediatamente transferido para um segundo microtubo de 1,5 mL e congelado em gelo seco. Após este processo o plasma foi então estocado em freezer -80°C até a realização da análise.

### 3.5 PREPARO DAS SEÇÕES HISTOLÓGICAS

Para preparo das lâminas histológicas cortes longitudinais de rins foram fixados em solução contendo 85 mL de álcool 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial por 16 horas. Após o período de fixação os cortes foram então transferidos para soluções com proporções crescentes de álcool até que toda a água fosse substituída por álcool absoluto.

Na etapa de diafanização todo o álcool foi substituído por xilol, o bloco de tecido então passou por inúmeras trocas de parafina aquecida, o excesso de parafina então foi extraído e o bloco levado para microtomia (cortes com aproximadamente 5 µM).

### 3.6 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DA GLOMERULOESCLEROSE

Após a desparafinização e hidratação em concentrações alcoólicas decrescentes os cortes foram corados com PAS (ácido periódico de Schiff). Para isso, foram incubados com uma solução de ácido periódico 0,5% por 5 minutos, lavadas com água destilada, incubadas em Reativo de Schiff por 20 minutos, e lavados em água sulfurosa (10 mL de metabissulfeto de potássio 10% em 10 mL de HCl 1M, água destilada q.s.p para 200 mL) por 3 vezes de dois minutos cada lavagem.

A água sulfurosa foi então substituída por água destilada e as lâminas foram expostas à contra coloração de hematoxilina de Harris por 40 segundos. Ao final do processo, as lâminas foram lavadas, desidratadas em concentrações de álcoois crescentes e submetidas ao processo de montagem com Entellan®.

Para a análise do grau de glomeruloesclerose, foram contados 10 de campos de visualização em aumento de 100X. Esta análise foi realizada por dois observadores independentes.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DE UREIA PLASMÁTICA.

Os níveis plasmáticos de ureia foram determinados através de kit comercial Katal®. Brevemente, a ureia é hidrolisada pela enzima urease para íons amônio e gás carbônico. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra.

Para isso, em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 µL de plasma livre de hemólise, seguidos de 1 mL de urease tamponada (para o teste da reação). Para o branco utilizou-se apenas urease tamponada e, para o controle da reação foram utilizados 10 µL do padrão fornecido pelo kit. Cada amostra foi analisada em duplicata. As amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Após esse período foi adicionado em todas as amostras 1 mL de oxidante.

Após 5 minutos de incubação a 37°C as amostras foram levadas a um leitor de microplacas e as absorbâncias foram determinadas em 595 nm. O zero foi acertado com o branco da reação.

### 3.8 DETECÇÃO DE CYS E CYSS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO DESEMPENHO E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA (HPLC-EC)

#### 3.8.1 PREPARO DAS AMOSTRAS.

As amostras foram preparadas misturando-se em microtubos 100 µL de plasma a 200µL de isopropanol, os quais eram misturados em agitador vórtex por 1 minuto. Em seguida, a reação era incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada (13000 g, 4°C, 20 minutos). Aos 100 µL de sobrenadante coletado foi adicionado o mesmo volume de fase móvel (octanossulfonato de sódio 1 mM, ácido fosfórico 26 mM, pH 2,7).

Imediatamente a amostra foi filtrada em membrana PVDF (Millipore blue) (0.22 µm) e o volume de 50 µL dessa solução foi injetado no cromatógrafo. A identificação e a quantificação dos níveis plasmáticos foram feitas baseadas em curvas de calibração dos padrões de cisteína e cistina (10, 20, 30, 40 e 50 µM) (Sigma®) preparados a partir de soluções estoque contendo, respectivamente, 1 mM e 0,2 mM.

### 3.9 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.

A análise do estado redox plasmático extracelular foi determinada por detecção eletroquímica em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC Shimadzu Prominence) utilizando uma bomba LC-20AD, injetor Rheodyne e forno para coluna Coulochem a 40°C e desgaseificador Shimadzu DGU-20A. Estes módulos são controlados pelo programa LC Solution (Shimadzu).

A separação cromatográfica foi obtida por uma coluna de fase-reversa Phenomenex Gemini 5 µm C18 com 250 x4,6 mm, eluída com 99% de fase móvel (octanossulfonato de sódio 1 mM, pH 2,7) e metanol 1% (CarloErba®), num fluxo contínuo de 0,5 mL/min e pressão de aproximadamente 55kgf/cm<sup>3</sup>. Para a detecção, foi utilizado um detector eletroquímico ESA Coulochem III com uma cela ESA 5010 contendo dois eletrodos em série, operando em 630 e 860 mV.

O estresse oxidativo plasmático foi mensurado pelo potencial redox do par cistina / cisteína, determinado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e detecção coulométrica. As amostras de plasma dos grupos *sham*, *sham+LA*, DRC e DRC+LA foram analisadas quanto aos níveis de cistina e cisteína, e estes valores foram então convertidos em potencial redox baseado no par CySS/CyS, através da equação de Nernst apresentada a seguir:

$$E_h = E_0 + (RT/nF) \times (\ln([espécie oxidada]/[espécie reduzida]^n))$$

Na qual E= potencial redox, E<sub>0</sub>= potencial redox padrão, R= constante universal dos gases perfeitos (8,31 J/mol.K), T= temperatura em K, n= número de elétrons envolvidos na reação redox, F= constante de Faraday (96,406 J/V), sendo a concentração de cistina equivalente à espécie oxidada e a concentração de cisteína à espécie reduzida.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0, utilizando o teste ANOVA com correção de Bonferroni's e, os gráficos foram feitos utilizando o programa OriginPro 6.0.

## 4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS GERAIS DO LA EM RATOS COM NEFRECTOMIA DE 5/6

Utilizamos o processo cirúrgico de redução da massa renal, conhecido por ablação renal ou nefrectomia em 5/6, pois para o nosso estudo foi o modelo que melhor mimetizaria os efeitos observados no desenvolvimento da DRC, criando a possibilidade de testes terapêuticos com o antioxidante ácido alfa lipóico em nosso laboratório.

De modo geral os animais controle *sham* ao final do período experimental apresentaram sinais de envelhecimento como, ganho de peso, pelagem mais grossa e amarelada. Os animais nefrectomizados sem tratamento tiveram esses sinais mais acentuados quando comparados ao grupo DRC tratados com LA, a massa renal encontrada no grupo controle DRC foi ligeiramente maior, mas o ganho de peso foi menor em relação a todos os outros grupos, sendo que nesse grupo foi observada uma taxa de 20% de mortalidade.

A figura 3 demonstra ao final do período experimental a morfologia renal de um grupo *sham* (A) e, de um grupo DRC (B), ambos sem a interferência de tratamento antioxidante. O tipo de lesão observada na imagem B da figura 3 foi encontrada em todos os grupos DRC, mesmo em animais que receberam tratamento com antioxidante.

Ao final do experimento, os animais *sham* tratados ou não tratados com LA mantiveram as estruturas renais intactas, livres de lesão glomerular. Esses animais tiveram os pedículos renais manipulados durante a cirurgia de laparotomia, para que os grupos controles fossem submetidos aos mesmos estresses causados pela cirurgia que os animais nefrectomizados passariam.

Após 60 dias da nefrectomia unilateral, todos os ratos apresentaram o rim remanescente significativamente maior do que o ipsilateral do grupo controle, mesmo naqueles animais que receberam o tratamento com o antioxidante. Observamos na figura 3, a isquemia causada pela falta de irrigação sanguínea, consequência da interrupção do sangue pela ligação de dois ramos da artéria renal utilizando o modelo de ablação descrito em materiais e métodos. Esse evento desencadeia um processo necrótico, o qual lesiona as estruturas teciduais diminuindo a área renal e levando a

uma hipertrofia compensatória, conforme apresentado nos dados de massa renal na tabela 2.

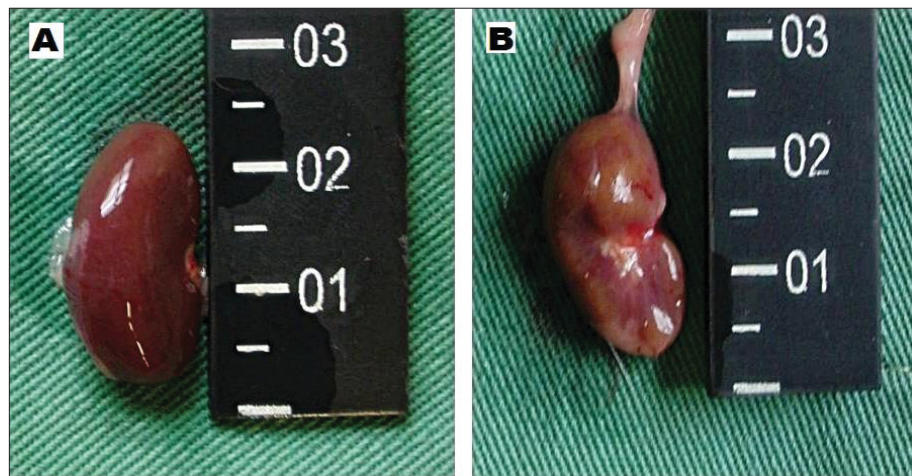


FIGURA 3 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA HISTOLOGIA RENAL. Na imagem A, rim esquerdo de um animal controle (*sham*), sem alterações morfológicas macroscópicas, evidenciando um rim de aspecto saudável, com bordos preservados. Em B, rim esquerdo remanescente de um animal nefrectomizado (DRC), área com perda de tecido renal, alterações nos bordos do rim, morfologia macroscópica com alterações graves.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 2. MASSAS RENAIIS DE RATOS *WISTAR*, CONTROLE E NEFRECTOMIZADOS.

<i>Sham</i>	<i>Sham + LA</i>	DRC	DRC+LA
1.697	1.603	1.85	1.905
1.63	1.594	2.31	2.114
1.4	1.453	1.53	2.364
1.75	1.979	1.96	1.6798
1.453	1.577	1.77	1.525
1.31		2.27	1.629

MASSA RENAL PESADA APÓS TÉRMINO DO PERÍODO EXPERIMENTAL, onde sham+LA representa grupo controle tratado com antioxidante e DRC+LA representa grupo nefrectomizados tratado com antioxidante.

FONTE: O AUTOR (2012).

Embora a relação massa renal / massa corpórea de animais DRC tratados com LA e animais controle não tratados, não tenha apresentado diferença estatística significativa, como mostra a figura 4, observamos que a massa renal do rim

remanescente de animais nefrectomizados é mais elevada (DRC sem tratamento:  $1,95 \text{ g} \pm 0,29$  e DRC tratado com LA:  $2,05 \text{ g} \pm 0,37$ ) em relação a massa renal, rim esquerdo, de animais *sham* (*sham* sem tratamento:  $1,55 \text{ g} \pm 0,17$  e *sham* tratado com LA:  $1,65 \text{ g} \pm 0,19$ ). De fato, nesse modelo ocorre uma medida compensatória da função renal e, como nossos dados demonstram há uma hipertrofia do rim remanescente, uma vez que a massa corpórea desses animais se mantém equivalente à massa corpórea dos animais controles *sham*, contudo como mostrado na tabela 2, a massa final renal no grupo nefrectomizado é superior a massa renal encontrada para animais *sham*.

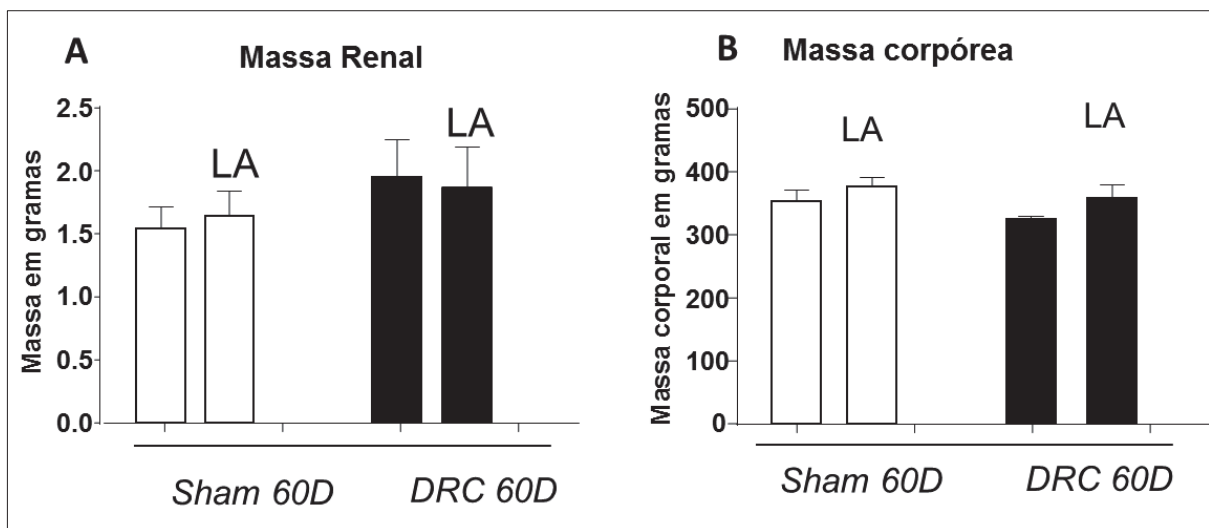


FIGURA 4- MASSA RENAL E CORPÓREA. Gráficos representam a média dos valores encontrados para massas renais e corpóreas de animais *sham* e DRC que foram submetidos a laparotomia e nefrectomia, tratados ou não tratados com antioxidante. Não houve diferença significativa entre as amostras avaliadas. Em A observa-se média de valores encontrados para massa renal, em B observa-se a média de valores encontrados para massa corporal de ratos *Wistar*.

FONTE: O autor (2012).

#### 4.2 GLOMERULOESCLEROSE

A coloração diferencial PAS cora polissacarídeos, como observado nas figuras abaixo. A parte amorfa da matriz é composta por macromoléculas de proteoglicanas. As proteoglicanas consistem em uma parte central, protéica, de onde saem moléculas de glicosaminoglicanas.

Uma vez tratados com ácido periódico os glicóis presentes nos tecidos são oxidados em aldeídos. A solução desse reagente contém pararrosanilina que por adução é liberada corando em rosa. Polissacarídeos encontrados comumente no lúmen dos túbulos contorcidos proximais (representados pelo algarismo número 2, nas figuras) e ausentes em túbulos contorcidos distais (representados pelo algarismo número 4, nas figuras).

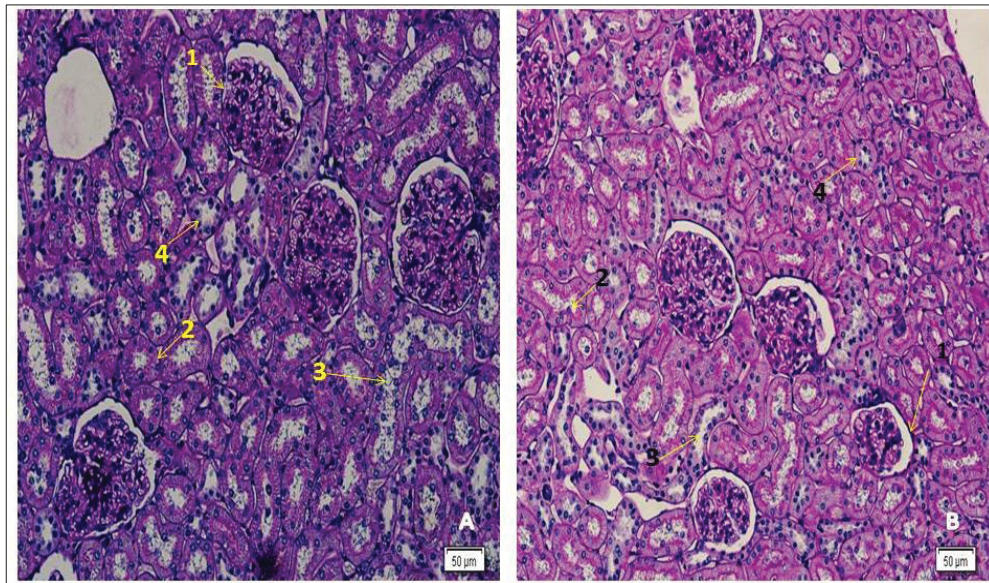


FIGURA 5- FOTOMICROGRAFIA REPRESENTATIVA DE TECIDO RENAL, POR COLORAÇÃO DIFERENCIAL PAS (ÁCIDO PERIÓDICO - SCHIFF), AUMENTO DE 200X. A=*sham* E B= *sham* +LA. Onde os algarismos de 1 a 4 indicam, respectivamente, glomérulo, túbulo contorcido proximal, tubo coletor e túbulo distal. FONTE: O autor (2012).

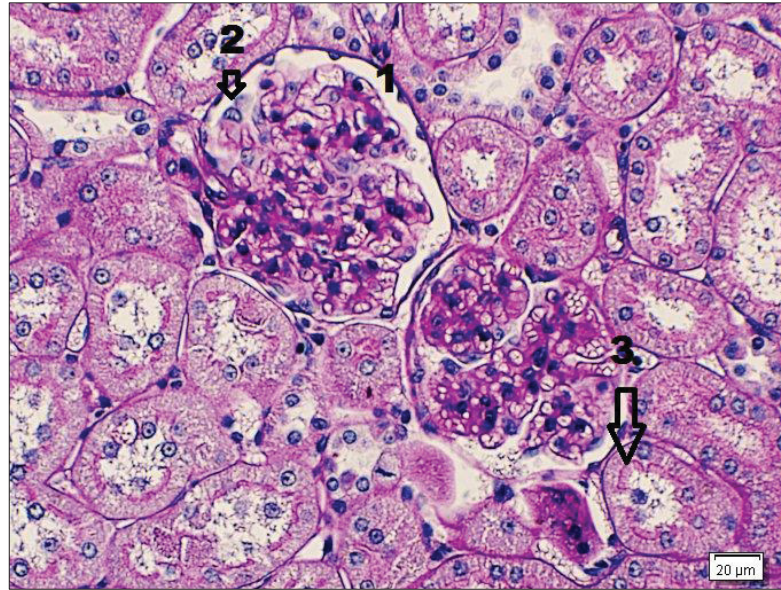


FIGURA 6- FOTOMICROGRAFIA EM AUMENTO DE 400x, TECIDO RENAL DE UM ANIMAL SHAM. Os algarismos de 1 a 3 representam respectivamente, glomérulo, célula podocitária e borda em escova.

FONTE: O autor (2012)

Nas imagens A, controle *sham* não tratado e B, controle *sham* tratado com LA da figura 5, os túbulos proximais são compostos por um epitélio cúbico simples e esse tecido encontra-se bem preservado, mostrado em maior aumento pela figura 6. Nota-se a presença de microvilos, corados em rosa, na superfície das células formando uma “borda em escova”, esses microvilos aumentam significativamente a superfície basal, sendo especializações comuns de células relacionadas à absorção. Espera-se que em animais que não possuam alterações renais essa especialização esteja presente e conservada, pois, são nos túbulos contorcidos proximais, que se inicia a transformação do filtrado glomerular em urina e onde é secretada a creatinina para o fluido tubular.

Nessas imagens observamos a integridade da camada parietal da cápsula de Bowman nos glomérulos (representado pelo algarismo 1). Os núcleos que compõe as células endoteliais no interior do néfrons, chamadas de podócitos, estão bem preservados (figura 6). Alterações nessas estruturas podem causar o acúmulo de substâncias urêmicas no organismo. A concentração de ureia encontrada no plasma dos animais *sham* sem tratamento e animais *sham* tratados com LA corroboram com nossos dados histológicos, uma vez que, nesses grupos a ureia plasmática não ultrapassou 45 mg/dL.

Como esperado, todas essas características demonstram que o tecido renal, nesses grupos controles *sham*, não sofreu lesões que pudessem diminuir a capacidade de filtração glomerular, indicando que esses animais estão livres de processos de insuficiência renal, agudos ou crônicos, oriundos de distúrbios na taxa de filtração sanguínea.

Diferentemente das lâminas observadas de animais controle, animais que sofreram ablação renal de 5/6, apresentam alterações importantes em seu tecido remanescente para a evolução da patologia renal.

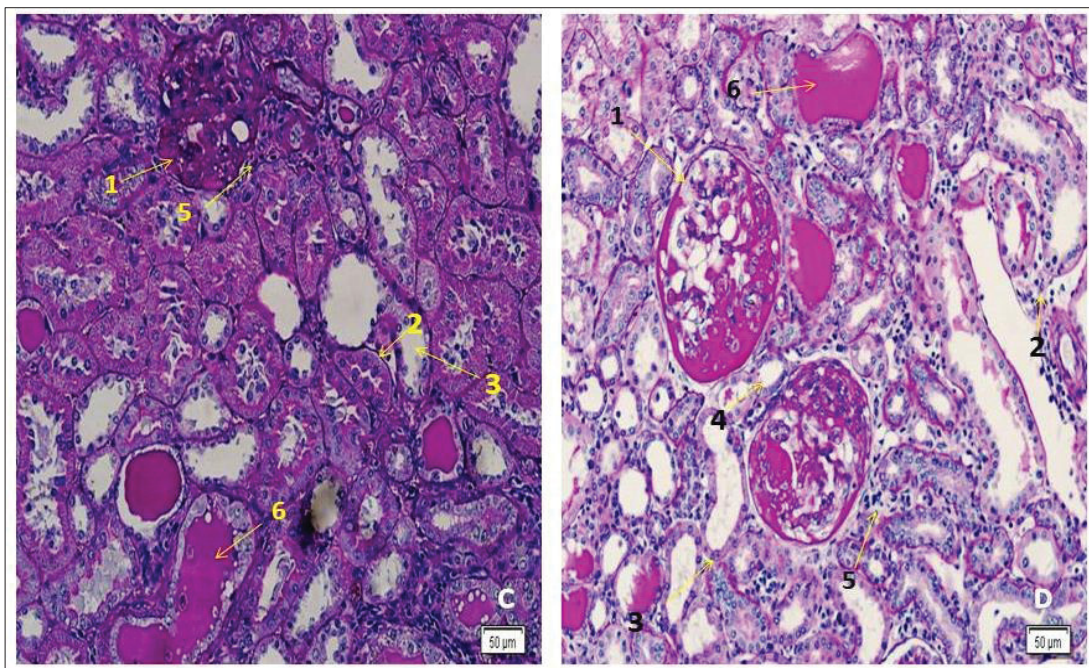


FIGURA 7- FOTOMICROGRAFIA REPRESENTATIVA DE TECIDO RENAL, POR COLORAÇÃO DIFERENCIAL PAS (ÁCIDO PERIÓDICO - SCHIFF), AUMENTO DE 400X. C= DRC E D= DRC+LA. Onde os algarismos de 1 a 6 indicam respectivamente, glomérulo, tubo coletor, túbulo contorcido distal, infiltrado celular e cilindro hialino. FONTE: O AUTOR (2012).

De acordo com a figura 7 podemos observar um acúmulo glomerular de material hialino na camada parietal da cápsula de Bowman. A matriz da cartilagem hialina contém fibrilas de colágeno tipo II imersas em substância amorfa, presentes no lúmen dos túbulos contorcidos proximais, na lâmina basal dos capilares, na cápsula de Bowman e nos túbulos renais.

A figura revela que os animais nefrectomizados tratados com LA tiveram suas estruturais renais melhor conservadas, podemos observar quem em A, na figura 7, o epitélio cúbico dos túbulos proximais e distais estão fortemente marcados com PAS, e que a espessura dessa camada celular está diminuída comparada a imagem B dessa mesma figura.

Na área, propriamente dita, onde houve o processo de cicatriz foi observado um número expressivo de glomérulos esclerosados, no entanto nossa análise avaliou apenas o tecido remanescente funcional e a contagem de glomérulos foi realizada somente na região livre de necrose.

Observamos na extensão das lâminas nos grupos DRC sem tratamento a presença de necrose tubular difusa, reabsorção de material protéico goticular. Nota-se também a presença de cilindros hialinos nos túbulos renais e em algumas arteríolas é possível identificar o início de aterosclerose e calcificação vascular. Contudo, em animais do grupo DRC que receberam o tratamento com antioxidante todos esses achados histológicos foram significativamente reduzidos quando comparados ao grupo DRC não tratado. Algumas características mais evidentes estão em destaque como mostra o aumento de 400x representados na figura 8, abaixo.

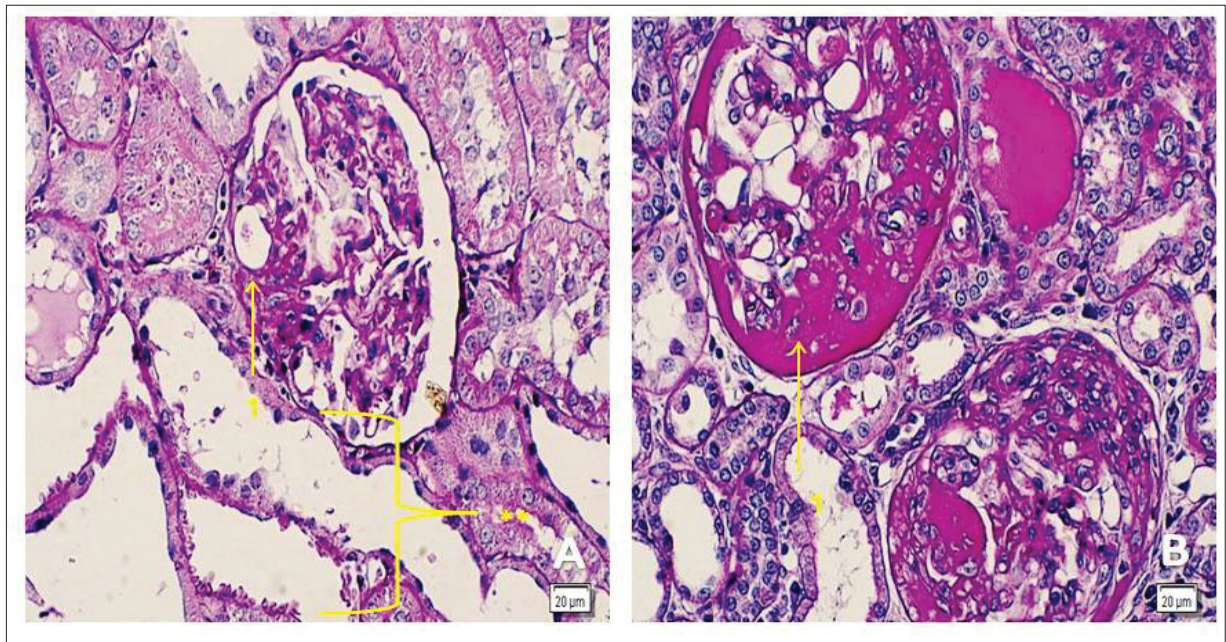


FIGURA 8. GLOMÉRULO VISTO POR MICROSCOPIA ÓPTICA EM AUMENTO DE 400X. O algarismo 1 representa, tanto em A (DRC controle) quanto em B (DRC+LA) a esclerose glomerular.

FONTE: O AUTOR (2012).

Esses dados corroboram os dados morfológicos encontrados nas mesmas lâminas e representados na tabela 3, percebemos pela figura acima que a área de perda de massa renal é mais proeminente em animais DRC sem tratamento, o epitélio cúbico e a borda em escova estão danificados reduzindo a capacidade de filtração do rim remanescente.

Os dados da tabela 3 demonstram ainda que animais *sham* apresentam lesão glomerular, quando comparados aos demais grupos, não observamos alterações tubulares, nem alterações na taxa de ureia plasmática, nem mesmo no potencial redox desse grupo avaliado.

Como era esperada, no panorama do nosso estudo, a quantia de glomérulos encontrada para os grupos *sham* foi significativamente maior que aquela encontrada para os grupos DRC. Observamos também que o tratamento com LA parece ter um efeito renoprotetor pois o número de glomérulos que estavam completamente esclerosados no grupo DRC sem tratamento foi mais que o dobro encontrado no grupo DRC tratado com LA.

Observamos ainda que a taxa de infiltração leucocitária em animais com insuficiência renal crônica que foram submetidos ao tratamento com LA foi 25% a menos comparada aquela encontrada para animais controle DRC sem tratamento.

TABELA 3. DADOS HISTOPATOLÓGICOS EM LÂMINA DE TECIDO RENAL.

	Sham	DRC	Sham+ LA	DRC+ LA
Número de glomérulos *	170	115	170	125
Número de glomérulos parcialmente esclerosados*	0	66	0	37
Número de glomérulos totalmente esclerosados*	0	18	0	8
Presença de infiltrado celular (%)*	0	30%	0	5%

DADOS HISTOPATOLÓGICOS DE ANIMAIS SHAM, SHAM+LA, DRC. DRC+LA.

\*Soma de 10 campos observados em microscópio óptico com aumento de 100x.

FONTE: O AUTOR (2012).

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE UREIA PLASMÁTICA

O efeito de ácido alfa lipóico sobre a função renal foi analisado em períodos experimentais distintos após redução da massa renal em 5/6 em animais DRC ou laparotomia nos controles *Sham*.

Como controle positivo e negativo da reação utilizou-se amostras de pacientes em tratamento de hemodiálise (n=3) e voluntários saudáveis (n=3), as médias dos valores encontrados foram, respectivamente,  $90,26 \pm 22,82$  mg/dL e  $38,52 \pm 8,53$  mg/dL.

No grupo controle sem tratamento e tratado com LA a média dos níveis plasmáticos de ureia permaneceu dentro da normalidade. Contudo, este marcador da função renal apresentou-se significativamente elevado nos grupos que sofreram nefrectomia, dado esperado pelo modelo escolhido para o nosso estudo.

Nossos dados demonstram que o grupo nefrectomizado que recebeu o composto antioxidante apresentou uma redução nos níveis de ureia plasmáticos estatisticamente significativos quando comparados ao grupo nefrectomizado controle sem tratamento, como mostra a figura 8.

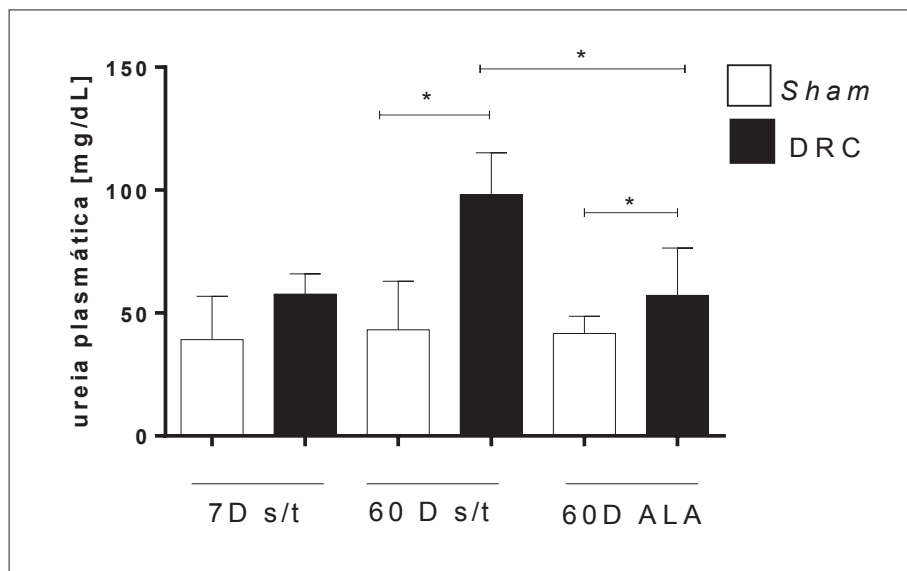


FIGURA 8 ANÁLISE DE UREIA PLASMÁTICA. Os valores de ureia plasmática foram determinados em 7 e 60 dias após o processo de ablação renal de 5/6. Grupo controle sem tratamento representado por (s/t), grupo tratado com antioxidante (LA). *Sham*: 7D s/t (n=6), 60D s/t (n=6) e 60D +LA (n=6), DRC: 7D s/t (n=5), 60D s/t (N=5), 60D LA (n=5). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP. Diferença significativa  $p < 0,0001$ .

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DO POTENCIAL REDOX PLASMÁTICO

Foi empregada para análise do potencial redox a cromatografia de fase reversa utilizando par iônico (Melnik, Pogribna *et al.*, 1999) para separação de, cisteína e cistina, como descrito em material e métodos.

A detecção foi determinada de acordo com a medida da área dos picos equivalentes a cisteína e cistina no plasma de ratos comparados com o padrão misto (Cys+Cyss), figura 8. Em todos os dias em que as amostras foram analisadas foi feita uma curva de calibração do aparelho, utilizando o padrão misto com concentrações de 10 $\mu$ M até 50 $\mu$ M.

A figura 9, representa um cromatograma de amostras utilizando o plasma de dois animais, em A observamos o plasma de um animal *sham* e em B observamos o plasma de um animal DRC, ambas amostras foram coletadas em 60 dias e os respectivos animais não receberam tratamento com antioxidante. Em nosso laboratório o tempo de retenção dos analitos à coluna de separação foram de 3,9 minutos e 4,1 minutos, respectivamente, para as amostras de cistina e cisteína.

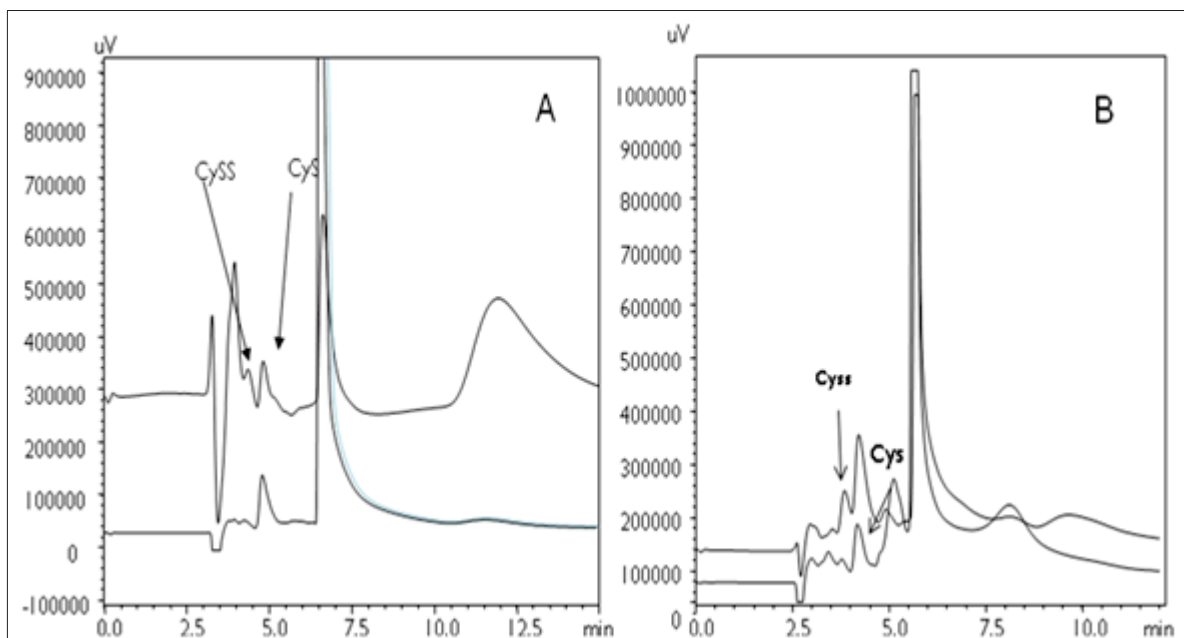


FIGURA 9. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO. Em A, *sham* (60 dias) e em B, DRC (60 dias). Ambas as amostras foram analisadas em detecção simultânea, sendo que cisteína foi detectada em ESA 1 (633 mV) e cistina foi detectada em ESA 2 (866 mV).

A partir da análise das concentrações plasmáticas de cistina e cisteína, esses dados então foram plotados e quantificados na equação de Nernst.

A seguir, estão apresentados os resultados do potencial redução plasmáticos correspondentes a cada grupo analisado.

Verificou-se então que há uma tendência de aumento desse potencial principalmente em 53 dias após o procedimento de nefrectomia em 5/6, em que a uremia e o estresse oxidativo estão mais evidentes, e que o tratamento com ácido alfa-lipóico diminui significativamente o potencial de oxidação plasmático, reduzindo a níveis quase basais o potencial redox de animais nefrectomizados tratados com LA quando comparados a animais controle DRC.

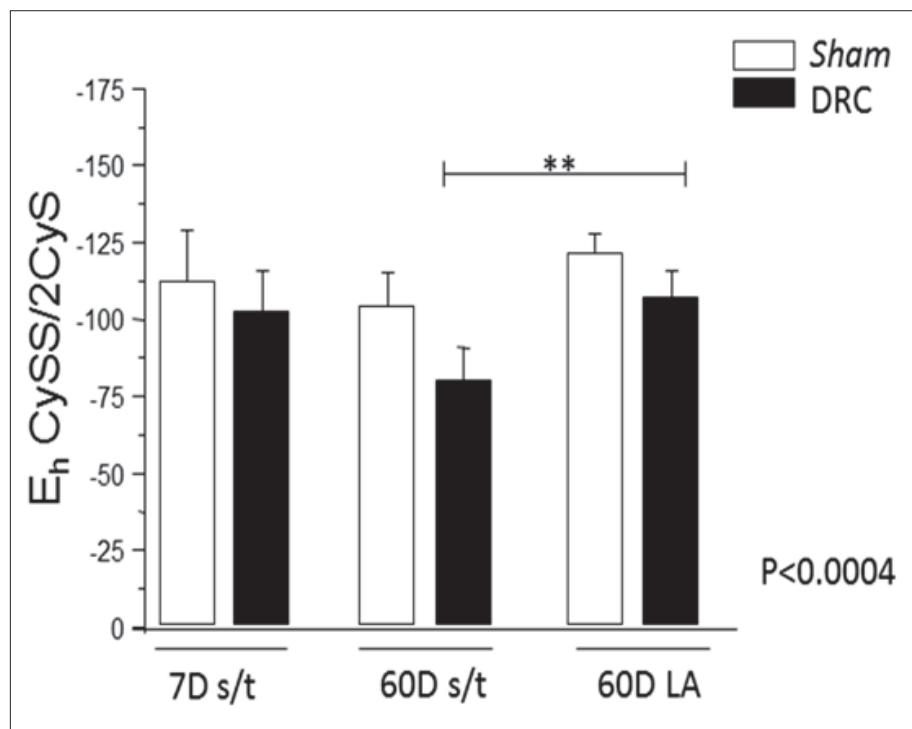


FIGURA 10. ANÁLISE DO POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO. O potencial de redução plasmático dos grupos nefrectomizados tratados com antioxidante em 60 dias foi diferentemente significativo quando comparado ao grupo nefrectomizados controle. ANOVA  $p < 0.0004$

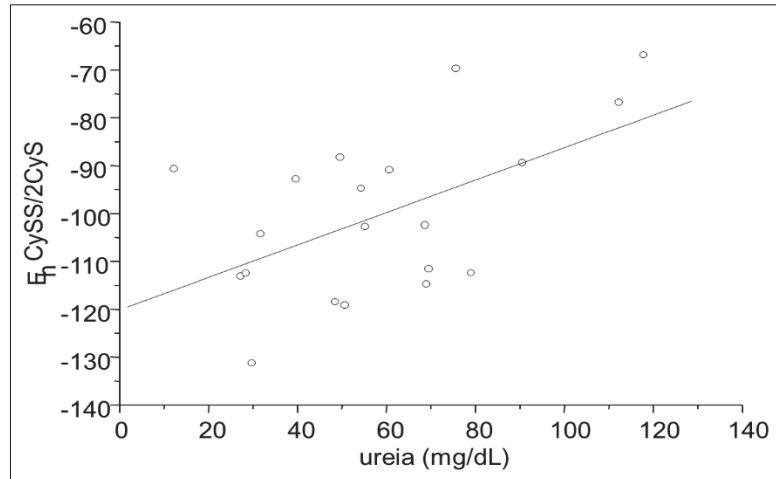


FIGURA 11- CORRELAÇÃO DOS DADOS DE POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO E UREIA PLASMÁTICA.

FONTE: O AUTOR (2012).

Houve correlação diretamente proporcional entre o potencial de redução plasmático e os dados de ureia obtidos no nosso estudo, como mostra a figura 12, essa análise reforça a hipótese de que o estresse oxidativo plasmático influencia de alguma forma a progressão dos estágios da doença renal crônica e de que o tratamento com antioxidante promove um efeito renoprotetor, uma vez que a administração de ácido alfa lipóico melhora o potencial de redução e diminui o acúmulo de ureia plasmático.

## 5 DISCUSSÃO

Os ratos utilizados em nosso estudo sofreram a ablação do rim direito e ligação de troncos da artéria renal do rim esquerdo. Em órgãos duplos, como nos rins, há pequenas diferenças em relação ao tamanho, mas tais variações não chegam a ser consideradas significativas. Em ratos, o rim direito é um pouco maior que o rim esquerdo, diferentemente do que ocorre em humanos, onde o rim direito é ligeiramente menor que o rim esquerdo (Brenner, 2008).

O modelo da nefrectomia de 5/6 consiste na produção de isquemia provocada pela interrupção do fluxo sanguíneo nos vasos que irrigam o rim, através da ligação dos troncos da artéria renal (Shimizu, Coimbra *et al.*, 2005), esse processo provoca necrose tecidual facilitando o surgimento de uma síndrome urêmica sistêmica, hipertensão glomerular e progressiva glomeuloesclerose, já que pacientes com doença renal apresentam a taxa de filtração glomerular criticamente reduzida levando ao acúmulo de líquidos e à retenção de excretas como a uréia (Riella, 2003; Lippi e Cervellin, 2012), a taxa de filtração glomerular varia de acordo com a diversidade de grupos étnicos. Dados recentes mostraram que a fórmula utilizada para quantificação da TGF para pacientes japoneses está subestimada em 23% e superestimada em 12% para a população chinesa, isso porque o cálculo de TGF leva em conta dados antropomórficos (Praditpornsilpa, Townamchai *et al.*, 2012).

Pelo processo de necrose há uma diminuição no número de néfrons presentes no rim remanescente ocasionando hipertrofia compensatória, em que cada néfron aumenta sua capacidade de filtração em até 50%, chegando ao triplo da sua função e tamanho quando comparado ao estado normal (Cruz, 1995; Zatz e Baylis, 1998).

Tais mecanismos compensatórios podem manter a funcionalidade renal nos estágios iniciais da doença, contudo, em estágios mais avançados a hipertrofia compensatória favorece a progressão da DRC.

Além disso, os dados de massa renal indicam que de fato, nos animais DRC há uma hipertrofia cardíaca (dados não mostrados) e renal (rim remanescente) quando comparados aos animais controle *sham*, a literatura demonstra que tanto o estresse oxidativo quanto a inflamação são fatores constantes no processo de progressão da DRC e de eventos cardiovasculares (Kim e Vaziri, 2010), mediados pela infiltração de células inflamatórias como observado na figura 7.

Nossos dados demonstram (tabela 3) que essas alterações acontecem nos grupos nefrectomizados, sendo mais acentuado no grupo sem tratamento. A utilização de ácido alfa lipóico no tratamento de ratos nefrectomizados mostrou-se renoprotetora.

Embora haja uma diminuição característica no número de glomérulos na superfície cortical do rim em animais com redução da massa renal, ratos nefrectomizados sem tratamento apresentaram uma diminuição mais acentuada de glomérulos, aproximadamente 35% de glomérulos a menos quando comparado com animais controle *sham* tratados ou não com LA e aproximadamente 5% de glomérulos a menos quando comparado com animais nefrectomizados tratados com LA (tabela 3).

A esclerose no glomérulo é um processo crônico que ocorre a partir da deposição de hialina nas estruturas nefrônicas, esse processo impede a filtração glomerular, mesmo glomérulos parcialmente esclerosados são incapazes de realizar a filtração dos fluidos corporais.

Dessa forma, podemos dizer que a atuação de LA pode estar atenuando o efeito da glomeruloesclerose desacelerando a deposição de hialina no interior dos glomérulos, contudo como observamos nas lâminas que existe uma deposição de cilindros hialinos, bem importante, no tecido renal remanescente de ambos os grupos. Melhem em seus estudos observou que ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipóico tem a porção mesangial diminuída quando comparada a animais insulino dependentes (Melhem, Craven *et al.*, 2002).

Essa diferença, presente na quantidade de glomérulos esclerosados ao final do período experimental entre os grupos nefrectomizados controle e tratados com ácido alfa lipóico, é refletida na taxa de retenção de excretas nitrogenados, como mostram nossos dados de ureia.

Quando os níveis de ureia foram determinados, observamos que os ratos tratados com LA apresentaram um acúmulo de ureia menor que os animais não tratados. A ureia é sintetizada no fígado a partir de CO<sub>2</sub> e amônia, sendo um dos principais produtos proteicos do metabolismo, circula livremente no sangue e é filtrada nos rins, a maior parte da concentração da ureia é excretada na urina, mesmo não sendo tão específica para avaliação renal quanto à análise de creatinina, a ureia é utilizada para diagnose de alterações na filtração, pois é mais sensível a alterações primárias das condições renais, o que coube a análise como um bom marcador uma vez que nosso estudo enquadra-se nessa condição de perda primária da filtração por necrose causada por isquemia renal.

Os valores de referência utilizados para a ureia conforme instruções no kit Katal® indicaram níveis normais para humanos entre 10 e 40 mg/dL de ureia plasmática.

De acordo com os dados encontrados observa-se que o processo de redução da massa renal em 5/6 induziu o aparecimento de síndrome urêmica, caracterizando a doença renal crônica pela redução da taxa de filtração glomerular, pelo acúmulo de líquidos (observado na pesagem da massa corpórea que apesar de se manter em animais nefrectomizados equivalentes a taxa de massa pesada em animais sham a estrutura corpórea dos animais nefrectomizados na ocasião da eutanásia encontrava-se relativamente alterada, com massa muscular muito inferior quando comparadas ao controle sham) e, contribuindo para a retenção de compostos nitrogenados como a ureia, além disso, a diminuição da filtração glomerular provoca alterações hidroeletrólíticas acidobásicas e hormonais.

A partir da determinação dos níveis plasmáticos de ureia observamos que animais nefrectomizados tratados com o antioxidante ácido alfa-lipóico, na dose de 25 mg/kg/dia, apresentaram uma melhora significativa em relação aos animais nefrectomizados controle. Kang, 2009 observou em seu estudo com indução de lesão renal por cisplatina, em camundongos, o efeito protetor de ácido alfa lipóico, animais tratados com cisplatina na presença de LA tiveram reduzidos os níveis de creatinina e ureia séricas (Kang, Kim *et al.*, 2009).

A atuação de ácido alfa lipóico pode estar sendo realizada através da regulação de genes que ativam uma via antioxidante, pois nossos dados obtidos a partir da concentração da ureia plasmática corroboram os dados encontrados para o potencial de redução.

De acordo com um estudo realizado em nosso laboratório para determinação dos níveis plasmáticos do par redox cisteína / cistina, pacientes renais em estágios avançados apresentam um perfil plasmático com potencial mais oxidado quando

comparados a voluntários saudáveis (Rodrigues, Batista *et al.*, 2012). Esse dado corrobora os dados encontrados para potencial plasmático de ratos no nosso estudo.

A análise realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) demonstrou que animais tratados com LA tiveram seus níveis plasmáticos de Cys / CysS reduzidos quando comparados a animais nefrectomizados controle sem tratamento, apresentando um perfil próximo a normalidade quando comparados aos animais *sham*.

No nosso trabalho o tratamento com ácido alfa lipóico pode estar diretamente direcionando a ativação de vias enzimáticas antioxidantes, pois animais DRC-60d tratados com LA apresentaram uma melhora significativa nos níveis plasmáticos para o potencial de redução quando comparados a animais DRC-60d não tratados, uma vez que ácido alfa lipóico possa atenuar a progressão da doença renal, tanto a glomeruloesclerose quanto o acúmulo de ureia são diminuídos a níveis quase comparáveis a normalidade, justificando dessa forma o dado encontrado para a melhora geral do quadro fisiopatológico da DRC em animais tratados com o antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- Amom, Z., Z. Zakaria, et al. **Lipid lowering effect of antioxidant alpha-lipoic Acid in experimental atherosclerosis**. J Clin Biochem Nutr, v.43, n.2, Sep, p.88-94. 2008.
- Augusto, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos. 2006
- Aveles, P. R., C. R. Criminacio, et al. **Association between Biomarkers of Carbonyl Stress with Increased Systemic Inflammatory Response in Different Stages of Chronic Kidney Disease and after Renal Transplantation**. Nephron Clin Pract, v.116, n.4, Jul 16, p.c294-c299. 2010.
- Bae, E. H., K. S. Lee, et al. **Effects of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats**. Am J Physiol Renal Physiol, v.294, n.1, Jan, p.F272-80. 2008.
- Batista, G. B. **Padronização de metodologia baseada em HPLC e detecção eletroquímica para determinação do potencial de redução plasmático de doentes renais. (Dissertação)**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná., Curitiba, 2010. 38 p.
- Beltowski, J. **Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling**. J Pharmacol Exp Ther, v.334, n.2, Aug, p.358-63. 2010.
- Berkson, B. M., D. M. Rubin, et al. **Revisiting the ALA/N (alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone) protocol for people with metastatic and nonmetastatic pancreatic cancer: a report of 3 new cases**. Integr Cancer Ther, v.8, n.4, Dec, p.416-22. 2009.
- Billack, B., D. E. Heck, et al. **Induction of cyclooxygenase-2 by heat shock protein 60 in macrophages and endothelial cells**. Am J Physiol Cell Physiol, v.283, n.4, Oct, p.C1267-77. 2002.
- Bilska, A. e L. Wlodek. **Lipoic acid - the drug of the future?** Pharmacol Rep, v.57, n.5, Sep-Oct, p.570-7. 2005.
- Borza, C. M. e A. Pozzi. **The role of cell-extracellular matrix interactions in glomerular injury**. Exp Cell Res, v.318, n.9, May 15, p.1001-10. 2012.
- Brenner, B. M. **Brenner and Rector's The Kidney**. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc. 2008
- Brezis, M. e S. Rosen. **Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease**. N Engl J Med, v.332, n.10, Mar 9, p.647-55. 1995.
- Bruchfeld, A., J. J. Carrero, et al. **Elevated serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) concentrations in chronic kidney disease (CKD) are associated with markers of oxidative stress and endothelial activation**. Mol Med, v.15, n.3-4, Mar-Apr, p.70-5. 2009.

Budisavljevic, M. N., L. Hodge, et al. **Oxidative stress in the pathogenesis of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis.** Am J Physiol Renal Physiol, v.285, n.6, Dec, p.F1138-48. 2003.

Caylak, E., M. Aytakin, et al. **Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats.** Exp Toxicol Pathol, v.60, n.4-5, Aug, p.289-94. 2008.

Clermont, G., S. Lecour, et al. **Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients.** Cardiovasc Res, v.47, n.3, Aug 18, p.618-23. 2000.

Coll-De-Tuero, G., M. Mata-Cases, et al. **Chronic kidney disease in the type 2 diabetic patients: prevalence and associated variables in a random sample of 2642 patients of a Mediterranean area.** BMC Nephrol, v.13, n.1, Aug 20, p.87. 2012.

Cruz, J. P., J.N.; Cruz, H..M.M. . **Nefrologia.** São Paulo: Sarvier. 1995

Dean, R. H., R. Englund, et al. **Retrieval of renal function by revascularization. Study of preoperative outcome predictors.** Ann Surg, v.202, n.3, Sep, p.367-75. 1985.

Descamps-Latscha, B., T. Drueke, et al. **Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy.** Semin Dial, v.14, n.3, May-Jun, p.193-9. 2001.

Dixon, F. J., J. D. Feldman, et al. **Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis.** J Exp Med, v.113, May 1, p.899-920. 1961.

Douglas, C. R. **Patofisiologia de sistemas: renal.** São Paulo: Robe. 2001

Dummer, C. D., F. S. Thome, et al. **[Chronic renal disease, inflammation and atherosclerosis: new concepts about an old problem].** Rev Assoc Med Bras, v.53, n.5, Sep-Oct, p.446-50. 2007.

Elangovan, S. e T. C. Hsieh. **Control of cellular redox status and upregulation of quinone reductase NQO1 via Nrf2 activation by alpha-lipoic acid in human leukemia HL-60 cells.** Int J Oncol, v.33, n.4, Oct, p.833-8. 2008.

Fernandez-Galilea, M., P. Perez-Matute, et al. **Effects of lipoic acid on lipolysis in 3T3-L1 adipocytes.** J Lipid Res, Aug 31. 2012.

Fujihara, C. K., G. R. Antunes, et al. **Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model.** Am J Physiol Renal Physiol, v.292, n.1, Jan, p.F92-9. 2007.

Fujihara, C. K., G. De Nucci, et al. **Chronic nitric oxide synthase inhibition aggravates glomerular injury in rats with subtotal nephrectomy.** *J Am Soc Nephrol*, v.5, n.7, Jan, p.1498-507. 1995.

Gao, X., L. Huang, et al. **Low-protein diet supplemented with ketoacids reduces the severity of renal disease in 5/6 nephrectomized rats: a role for KLF15.** *Kidney Int*, v.79, n.9, May, p.987-96. 2011.

Ghezzi, P. **Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung.** *Int J Gen Med*, v.4, p.105-13. 2011.

Goraca, A., H. Huk-Kolega, et al. **Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential.** *Pharmacol Rep*, v.63, n.4, Jul, p.849-58. 2011.

Goraca, A. e G. Jozefowicz-Okonkwo. **Protective effects of early treatment with lipoic acid in LPS-induced lung injury in rats.** *J Physiol Pharmacol*, v.58, n.3, Sep, p.541-9. 2007.

Guyton, A. C. e J. E. Hall. **Tratado de fisiologia médica.** Rio de Janeiro: Elsevier. 2006. 1264 p.

Hager, K., M. Kenklies, et al. **Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer's disease--a 48 months follow-up analysis.** *J Neural Transm Suppl*, n.72, p.189-93. 2007.

Han, D., G. Handelman, et al. **Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization.** *Biofactors*, v.6, n.3, p.321-38. 1997.

Hawkins, R. **New biomarkers of acute kidney injury and the cardio-renal syndrome.** *Korean J Lab Med*, v.31, n.2, Apr, p.72-80. 2011.

Himmelfarb, J. **Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy.** *Semin Dial*, v.22, n.6, Nov-Dec, p.636-43. 2009.

Himmelfarb, J., P. Stenvinkel, et al. **The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia.** *Kidney Int*, v.62, n.5, Nov, p.1524-38. 2002.

Johnsen-Soriano, S., M. Garcia-Pous, et al. **Early lipoic acid intake protects retina of diabetic mice.** *Free Radic Res*, v.42, n.7, Jul, p.613-7. 2008.

Jomova, K., D. Vondrakova, et al. **Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders.** *Mol Cell Biochem*, v.345, n.1-2, Dec, p.91-104. 2010.

Jones, D. P. **Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging.** *Rejuvenation Res*, v.9, n.2, Summer, p.169-81. 2006a.

Jones, D. P. **Redefining oxidative stress.** *Antioxid Redox Signal*, v.8, n.9-10, Sep-Oct, p.1865-79. 2006b.

Jones, D. P., J. L. Carlson, et al. **Redox state of glutathione in human plasma.** Free Radic Biol Med, v.28, n.4, Feb 15, p.625-35. 2000.

Jones, D. P., Y. Park, et al. **Dietary sulfur amino acid effects on fasting plasma cysteine/cystine redox potential in humans.** Nutrition, May 13. 2010.

Kai-Ming Chow, Zun-Chang Liu, et al. **Animal Remnant Kidney Model of Chronic Renal Failure Revisited.** Hong Kong J Nephrol, v.5, p.57-64. 2003.

Kang, K. P., D. H. Kim, et al. **Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation.** Nephrol Dial Transplant, v.24, n.10, Oct, p.3012-20. 2009.

Karamouzis, I., P. A. Sarafidis, et al. **Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease.** Am J Nephrol, v.28, n.3, p.397-404. 2008.

Kim, H. J. e N. D. Vaziri. **Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure.** Am J Physiol Renal Physiol, v.298, n.3, Mar, p.F662-71. 2010.

Koya, D., K. Hayashi, et al. **Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats.** J Am Soc Nephrol, v.14, n.8 Suppl 3, Aug, p.S250-3. 2003.

Kunt, T., T. Forst, et al. **Alpha-lipoic acid reduces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelial adhesion of human monocytes after stimulation with advanced glycation end products.** Clin Sci (Lond), v.96, n.1, Jan, p.75-82. 1999.

Lee, D. M., K. W. Jackson, et al. **Oxidative stress and inflammation in renal patients and healthy subjects.** PLoS One, v.6, n.7, p.e22360. 2011.

Levey, A. S. e G. Eknoyan. **Cardiovascular disease in chronic renal disease.** Nephrol Dial Transplant, v.14, n.4, Apr, p.828-33. 1999.

Lin, J., F. B. Hu, et al. **The association of serum lipids and inflammatory biomarkers with renal function in men with type II diabetes mellitus.** Kidney Int, v.69, n.2, Jan, p.336-42. 2006.

Lippi, G. e G. Cervellin. **Estimation of glomerular filtration rate in acute kidney injury.** Clin Chim Acta, v.414C, Aug 16, p.34-35. 2012.

Locatelli, F., B. Canaud, et al. **Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome.** Nephrol Dial Transplant, v.18, n.7, Jul, p.1272-80. 2003.

Magesh, S., Y. Chen, et al. **Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents.** *Med Res Rev*, v.32, n.4, Jul, p.687-726. 2012.

Marangon, K., S. Devaraj, et al. **Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress.** *Free Radic Biol Med*, v.27, n.9-10, Nov, p.1114-21. 1999.

Melhem, M. F., P. A. Craven, et al. **Alpha-lipoic acid attenuates hyperglycemia and prevents glomerular mesangial matrix expansion in diabetes.** *J Am Soc Nephrol*, v.13, n.1, Jan, p.108-16. 2002.

Melnyk, S., M. Pogribna, et al. **A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminosulfhydryls using coulometric electrochemical detection.** *J Nutr Biochem*, v.10, n.8, Aug, p.490-7. 1999.

Mittermayer, F., J. Pleiner, et al. **Treatment with alpha-lipoic acid reduces asymmetric dimethylarginine in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Transl Res*, v.155, n.1, Jan, p.6-9. 2010.

Miyata, T., K. Kurokawa, et al. **Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications.** *Kidney Int Suppl*, v.76, Aug, p.S120-5. 2000.

Mombouli, J. V. e P. M. Vanhoutte. **Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.35, p.679-705. 1995.

Moritz, A. R. e J. M. Hayman. **The Disappearance of Glomeruli in Chronic Kidney Disease.** *Am J Pathol*, v.10, n.4, Jul, p.505-518 3. 1934.

Naito, K., T. Anzai, et al. **Impact of chronic kidney disease on postinfarction inflammation, oxidative stress, and left ventricular remodeling.** *J Card Fail*, v.14, n.10, Dec, p.831-8. 2008.

Nitta, K. **Clinical assessment and management of dyslipidemia in patients with chronic kidney disease.** *Clin Exp Nephrol*, v.16, n.4, Aug, p.522-9. 2012.

Packer, L., E. H. Witt, et al. **alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant.** *Free Radic Biol Med*, v.19, n.2, Aug, p.227-50. 1995.

Park, Y., T. R. Ziegler, et al. **Postprandial cysteine/cystine redox potential in human plasma varies with meal content of sulfur amino acids.** *J Nutr*, v.140, n.4, Apr, p.760-5. 2010.

Pereira, L. V., M. H. Shimizu, et al. **N-acetylcysteine protects rats with chronic renal failure from gadolinium-chelate nephrotoxicity.** *PLoS One*, v.7, n.7, p.e39528. 2012.

Pozzi, A., P. A. Voziyan, et al. **Regulation of matrix synthesis, remodeling and accumulation in glomerulosclerosis.** *Curr Pharm Des*, v.15, n.12, p.1318-33. 2009.

Praditpornsilpa, K., N. Townamchai, et al. **The need for robust validation for MDRD-based glomerular filtration rate estimation in various CKD populations.** Nephrol Dial Transplant, v.26, n.9, Sep, p.2780-5. 2012.

Ramos, L. F., J. Kane, et al. **Effects of combination tocopherols and alpha lipoic acid therapy on oxidative stress and inflammatory biomarkers in chronic kidney disease.** J Ren Nutr, v.21, n.3, May, p.211-8. 2011.

Ribeiro, D. A., R. R. Campos, et al. **Chronic renal failure induces genetic instability in multiple organs of Wistar rats.** Eur J Clin Invest, v.39, n.4, Apr, p.289-95. 2009.

Riella, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos.** . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003

Rodrigues, S. D., B. G. Batista, et al. **Plasma cysteine/cystine reduction potential correlates with plasma creatinine levels in chronic kidney disease.** Blood Purification Journal. 2012.

Romão-Jr., J. E. . **Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação.** Jornal Brasileiro de Nefrologia, v.26. 2004.

Rose, S., S. Melnyk, et al. **Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain.** Transl Psychiatry, v.2, p.e134. 2012.

Rozo, A. V., R. Vijayvargia, et al. **Silencing Jnk1 and Jnk2 accelerates basal lipolysis and promotes fatty acid re-esterification in mouse adipocytes.** Diabetologia, v.51, n.8, Aug, p.1493-504. 2008.

Salinthon, S., R. V. Schillace, et al. **Lipoic acid stimulates cAMP production via the EP2 and EP4 prostanoid receptors and inhibits IFN gamma synthesis and cellular cytotoxicity in NK cells.** J Neuroimmunol, v.199, n.1-2, Aug 13, p.46-55. 2008.

Shay, K. P., R. F. Moreau, et al. **Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential.** Biochim Biophys Acta, v.1790, n.10, Oct, p.1149-60. 2009.

Sheldon, R. A., S. Christen, et al. **Genetic and pharmacologic manipulation of oxidative stress after neonatal hypoxia-ischemia.** Int J Dev Neurosci, v.26, n.1, Feb, p.87-92. 2008.

Shimizu, M. H., T. M. Coimbra, et al. **N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure.** Kidney Int, v.68, n.5, Nov, p.2208-17. 2005.

Sies, H. **Oxidative stress: introductory remarks.** Londres: Academic Press v.311. 1985. 617-31 p.

Spence, A. P. **Anatomia humana básica.** São Paulo: Manole. 1991. 713 p.

Stenvinkel, P., J. J. Carrero, et al. **Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle?** Clin J Am Soc Nephrol, v.3, n.2, Mar, p.505-21. 2008.

Sviglerova, J., J. Kuncova, et al. **Cardiovascular parameters in rat model of chronic renal failure induced by subtotal nephrectomy.** Physiol Res, v.59 Suppl 1, p.S81-8. 2010.

Tankova, T., D. Koev, et al. **Alpha-lipoic acid in the treatment of autonomic diabetic neuropathy (controlled, randomized, open-label study).** Rom J Intern Med, v.42, n.2, p.457-64. 2004.

Taulan, M., F. Paquet, et al. **Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice.** Environ Health Perspect, v.112, n.16, Nov, p.1628-35. 2004.

Teichert, J., R. Hermann, et al. **Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers.** J Clin Pharmacol, v.43, n.11, Nov, p.1257-67. 2003.

Teichert, J., T. Tuemmers, et al. **Pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease.** J Clin Pharmacol, v.45, n.3, Mar, p.313-28. 2005.

Testagrossa, L., R. Azevedo Neto, et al. **Immunohistochemical expression of podocyte markers in the variants of focal segmental glomerulosclerosis.** Nephrol Dial Transplant, Aug 1. 2012.

Urbschat, A., N. Obermuller, et al. **Biomarkers of kidney injury.** Biomarkers, v.16 Suppl 1, Jul, p.S22-30. 2011.

Valko, M., C. J. Rhodes, et al. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** Chem Biol Interact, v.160, n.1, Mar 10, p.1-40. 2006.

Van Buren, P. N. e R. Toto. **Hypertension in diabetic nephropathy: epidemiology, mechanisms, and management.** Adv Chronic Kidney Dis, v.18, n.1, Jan, p.28-41. 2011.

Van, T. V., E. Watari, et al. **Dietary phosphate restriction ameliorates endothelial dysfunction in adenine-induced kidney disease rats.** J Clin Biochem Nutr, v.51, n.1, Jul, p.27-32. 2012.

Vanasco, V., M. C. Cimolai, et al. **The oxidative stress and the mitochondrial dysfunction caused by endotoxemia are prevented by alpha-lipoic acid.** Free Radic Res, v.42, n.9, Sep, p.815-23. 2008.

Vanholder, R., U. Baurmeister, et al. **A bench to bedside view of uremic toxins.** J Am Soc Nephrol, v.19, n.5, May, p.863-70. 2008.

Vaziri, N. D., M. Dicus, et al. **Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency.** *Kidney Int*, v.63, n.1, Jan, p.179-85. 2003.

Vianna, H. R., C. M. Soares, et al. **[Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines].** *J Bras Nefrol*, v.33, n.3, Sep, p.351-64. 2011.

Weller, R. O. e B. Nester. **Histological reassessment of three kidneys originally described by Richard Bright in 1827-36.** *Br Med J*, v.2, n.5816, Jun 24, p.761-3. 1972.

Winiarska, K., D. Malinska, et al. **Lipoic acid ameliorates oxidative stress and renal injury in alloxan diabetic rabbits.** *Biochimie*, v.90, n.3, Mar, p.450-9. 2008.

Wolz, P. e J. Krieglstein. **Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid and its enantiomers demonstrated in rodent models of focal cerebral ischemia.** *Neuropharmacology*, v.35, n.3, Mar, p.369-75. 1996.

Yi, X. e N. Maeda. **alpha-Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E-deficient mice fed high-fat/low-cholesterol diet.** *Diabetes*, v.55, n.8, Aug, p.2238-44. 2006.

Yu, X., H. Liu, et al. **Oxidative stress in 5/6 nephrectomized rat model: effect of alpha-lipoic acid.** *Ren Fail*, v.34, n.7, p.907-14. 2012.

Yuen, L. K., W. M. Lai, et al. **Ten-year review of disease pattern from percutaneous renal biopsy: an experience from a paediatric tertiary renal centre in Hong Kong.** *Hong Kong Med J*, v.14, n.5, Oct, p.348-55. 2008.

Zafarullah, M., W. Q. Li, et al. **Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions.** *Cell Mol Life Sci*, v.60, n.1, Jan, p.6-20. 2003.

Zalba, G., A. Fortuno, et al. **Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease.** *Nephrol Dial Transplant*, v.21, n.10, Oct, p.2686-90. 2006.

Zatz, R. **Insuficiência renal crônica.** In: Atheneu (Ed.). *Fisiopatologia renal*. São Paulo, 2000. *Insuficiência renal crônica*, p.341-358

Zatz, R. e C. Baylis. **Chronic nitric oxide inhibition model six years on.** *Hypertension*, v.32, n.6, Dec, p.958-64. 1998.

Zatz, R. e C. K. Fujihara. **Mechanisms of progressive renal disease: role of angiotensin II, cyclooxygenase products and nitric oxide.** *J Hypertens Suppl*, v.20, n.3, Jun, p.S37-44. 2002.

Ziegler, D. **Thioctic acid for patients with symptomatic diabetic polyneuropathy: a critical review.** *Treat Endocrinol*, v.3, n.3, p.173-89. 2004.