

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONIAL DE GLICEROL SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS EM RIM DE RATOS JOVENS

ELENARA RIEGER

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre, 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONIAL DE GLICEROL SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS EM RIM DE RATOS JOVENS

ELENARA RIEGER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre, 2011.

Agradecimentos

Ao Prof. Clovis pela sua orientação, ensinamentos e paciência durante o mestrado e agora também no doutorado.

À minha família pelo apoio e incentivo de sempre.

Ao Vander, meu amor e companheiro para toda a vida.

Aos colegas do laboratório 34: Luciane, Maria Fernanda, Denise, Rodrigo, Tanise, Thales, Vivian, Eleonora e Sthefanie.

Ao Adriano M. de Assis, e à Dra. Lúcia Maria Klieman pela colaboração em meu trabalho.

Índice

Parte I

RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
INTRODUÇÃO.....	08
1. Glicerol.....	08
1.1 Metabolismo do Glicerol.....	08
1.2 Níveis plasmáticos de glicerol.....	10
1.3 Uso terapêutico do glicerol.....	11
1.4 Toxicidade aguda do glicerol.....	12
2. Fisiopatologia do Rim.....	14
3. Estresse Oxidativo.....	15
4. Insuficiência renal aguda.....	16
5. Rabdomiólise	18
6. Modelo experimental de insuficiência renal aguda produzida pela rabdomiólise.....	19
7. Insuficiência renal aguda sem rabdomiólise.....	20
OBJETIVOS	22

Parte II

CAPÍTULO I - Intraperitoneal administration of glycerol provokes renal failure in rats.....	23
CAPÍTULO II - Figuras não incluídas no artigo	44
Figura 1: Imagens das fatias de rim coradas com hematoxilina e eosina obtidas através de microscopia óptica.	44
Figura 2: Gráfico da curva de concentração de glicerol plasmático <i>versus</i> tempo de administração.....	45
Figura 3: Gráfico da porcentagem de ganho de peso dos animais após a administração prolongada de glicerol.....	46
Figura 4: Gráfico da porcentagem de peso dos rins dos animais tratados com administração prolongada de glicerol.....	46

Parte III

DISCUSSÃO	47
CONCLUSÕES	52
PERSPECTIVAS.....	54
Referências Bibliográficas.....	55

Resumo

O glicerol é um agente osmótico utilizado para o tratamento da hipertensão intracraniana, edema cerebral e glaucoma. O glicerol também é usado experimentalmente para induzir insuficiência renal aguda através da rabdomiólise. Neste modelo, a administração intramuscular de glicerol provoca injúria nos túbulos renais devido a uma combinação de fatores que incluem vasoconstrição renal, obstrução dos túbulos contorcidos distais por cilindros de mioglobina e estresse oxidativo mediado pelos grupos heme da mioglobina. No entanto, segundo a literatura, o mesmo dano renal também é causado após a administração intraperitoneal de glicerol, sugerindo que este composto possa provocar insuficiência renal aguda através de mecanismos que não envolvam a rabdomiólise. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da administração intraperitoneal de glicerol durante 14 dias sobre parâmetros histológicos e bioquímicos no rim de ratos jovens. Foram utilizados ratos Wistar de 23 dias de idade e administrado intraperitonealmente uma solução hipertônica de glicerol (50% vol/vol) na dose de 10 mL/Kg de peso corporal durante 14 dias e os ratos controle receberam igual volume de solução salina (NaCl 0,85 g%). O dano renal foi avaliado através dos níveis plasmáticos de creatinina, atividades da creatina cinase e da lactato desidrogenase, e no rim foi realizada histologia, e mensurados a taxa de consumo de glicose, atividades das enzimas creatina cinase, piruvato cinase e lactato desidrogenase e alguns parâmetros de estresse oxidativo. O glicerol não alterou a atividade da creatina cinase plasmática e aumentou os níveis de creatinina no plasma, sugerindo insuficiência renal aguda e ausência de rabdomiólise. Houve redução na taxa de oxidação da glicose pelo rim, e das atividades da creatina cinase citoplasmática e mitocondrial, sugerindo redução da homeostasia energética no rim. Houve aumento na formação de radicais livres, lipoperoxidação e carbonilação de proteínas, sugerindo estresse oxidativo. As alterações histológicas e a redução do peso do rim foram compatíveis com necrose tubular. Os resultados são similares e mais severos que os descritos após uma única administração intramuscular, de glicerol. Portanto, pode ser importante avaliar a função renal em pessoas que fazem uso a longo prazo de glicerol.

Abstract

Glycerol is osmotic agent used for the treatment of intracranial hypertension, cerebral oedema and glaucoma. Glycerol is also used experimentally to induce acute renal failure by rhabdomyolysis. In this model, intramuscular injection of glycerol causes renal tubular damage due to a combination of factors that include renal vasoconstriction, obstruction of distal convoluted tubules by myoglobin casts and oxidative stress mediated by heme groups of myoglobin. However, according to the literature, the same kidney damage occur after intraperitoneal administration of glycerol, suggesting that this compound may cause acute renal failure through mechanisms that do not involve rhabdomyolysis. The aim of this study was to investigate the effects of intraperitoneal glycerol for 14 days on histological and biochemical parameters in the kidney of young rats. Were used twenty-three-day-old Wistar rats its received an intraperitoneal injection of hypertonic glycerol (50% v/v) at a dose of 10 mL/kg body weight for 14 days and the control group received an equal volume of saline solution (NaCl 0.85g%). Renal damage was evaluated by plasma levels of creatinine, creatine kinase activity and lactate dehydrogenase, and kidney histology was performed, and measured the rate of glucose consumption, enzyme activities of creatine kinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase and some oxidative stress parameters. Glycerol did not alter creatine kinase activity and increased plasma levels of creatinine, suggesting acute renal failure and absence of rhabdomyolysis. There was a reduction in the rate of oxidation of glucose by the kidney and the activities of cytoplasmic and mitochondrial creatine kinase, suggesting reduction of energy homeostasis in the kidney. Increase in the formation of free radicals, lipid peroxidation and protein carbonylation, suggesting oxidative stress. Histological changes and reduction in kidney weight were consistent with tubular necrosis. The results are similar and more severe than those reported after a single intramuscular administration of glycerol. So it seems that it would be important to evaluate renal function in people on long-term use of glycerol.

Lista de Abreviaturas

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
AQP	aquaporina
CK	creatina cinase
DCF	diclorofluoresceína
DCFH	2,7-Dihidrodiclorofluoresceína
DGK	deficiência da glicerol cinase
DHAP	diidroxiacetona fosfato
EROs	espécies reativas de oxigênio
G3P	glicerol 3-fosfato
GK	glicerol cinase
GPDH	glicerol 3-fosfato desidrogenase
HNE	4-hidroxi 2-nonenal
HO[•]	radical hidroxila
IRA	insuficiência renal aguda
LDH	lactato desidrogenase
MDA	malondialdeído
O₂^{•-}	radical superóxido
ONOO-	peroxinitrito
PEP	fosfoenolpiruvato
PK	piruvato cinase
RO[•]	radical alcoxila
ROO[•]	radical peroxila
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFG	taxa de filtração glomerular

Introdução

1. Glicerol

O glicerol, também chamado de glicerina ou propan-1,2,3-triol, é um composto orgânico pertencente a função álcool com três hidroxilas. É líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O nome se origina da palavra grega *glykeros*, que significa doce. O termo glicerina refere-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95%, muito utilizado como aditivo na fabricação de alimentos e bebidas, e como emoliente em cosméticos e fármacos, também está presente no tabaco, tintas, resinas, filmes de celulose (CAS, 2009).

O glicerol é parte fundamental na estrutura dos triacilgliceróis (lipídios de armazenamento) e dos glicerofosfolipídios (lipídios de membrana) e está presente em bactérias, fungos, protozoários e mamíferos.

1.1 Metabolismo do glicerol

O glicerol é metabolizado no ser humano pela enzima glicerol cinase (GK), que catalisa a fosforilação do glicerol em L-glicerol 3-fosfato (G3P). Em seguida a enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPDH) catalisa a oxidação reversível do L-glicerol 3-fosfato em diidroxiacetona-fosfato (DHAP) que pela ação de uma triose 3-fosfato isomerase pode ser convertido em D-gliceraldeído 3-fosfato. O DHAP e seu isômero são substratos da glicólise e/ou gliconeogênese e precursores da síntese de triacilgliceróis.

A GK encontra-se principalmente no rim e no fígado e em menores níveis na mucosa intestinal, tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco, sendo o metabolismo

do glicerol nestes tecidos proporcional a atividade enzimática da GK nos mesmos (Lin, 1977).

Quando o glicerol é fosforilado em G3P, ele pode seguir por duas rotas metabólicas diferentes: glicólise/gliconeogênese e formação de triacilgliceróis. Na primeira rota, aproximadamente 70 a 90% do glicerol 3-fosfato é oxidado para produzir DHAP que é convertido em gliceraldeído 3-fosfato, que então será utilizado para produção de ATP na via da glicólise ou para produção de glicose pela gliconeogênese. Na segunda rota, de 10 a 30% do glicerol 3-fosfato é esterificado por três moléculas de ácidos graxos para formar um triacilglicerol (Nelson e Robergs, 2007). O aumento na atividade hepática da GK e GPDH durante o jejum é importante para aumentar a utilização do glicerol liberado pela lipólise para a produção de glicose (McCabe, 2001).

O glicerol 3-fosfato além da sua importância como intermediário metabólico, está envolvido em um sistema energético na mitocôndria da célula. Na membrana mitocondrial externa, a GK está associada à porinas que se unem a translocadores de nucleotídeo adenina na membrana interna. Este complexo promove o movimento de nucleotídeos adenina através da membrana e permite o acesso da GK ao ATP mitocondrial. Este sistema é importante para o controle e a comunicação entre a liberação e utilização de energia citoplasmática e mitocondrial e pode estar envolvido em alguns processos fisiopatológicos (Brisson et al., 2001).

.A metabolização do glicerol é feita principalmente pelo fígado e pelo rim, e outros tecidos como o cérebro, mucosa intestinal, pulmão, tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco, leucócitos, fibroblastos e espermatozóides também fazem o uso de glicerol, porém em menor quantidade. O rim é responsável por metabolizar cerca de 20% do glicerol total do organismo, e a utilização de glicerol pelo rim é proporcional a

sua concentração plasmática, no entanto, o rim é capaz de filtrar até 1 mM de glicerol plasmático (Lin, 1977).

O metabolismo renal de glicerol ocorre nos túbulos proximais, local onde a glicerol cinase está localizada, e os principais produtos do seu metabolismo são glicose e lactato. O metabolismo do glicerol em quantidades que excedem o consumo de glicose pelo rim fornece glicose para outros tecidos do corpo em situações que o glicerol é liberado do tecido adiposo (Wirthensohn, 1981).

Quando ingerido o glicerol é rapidamente absorvido pelo intestino, e mais lentamente pelo estômago e se distribui por todos os espaços extracelulares (Lin, 1977). O glicerol é transportado para dentro das células através de proteínas carreadoras, as aquaporinas (AQP), mais especificamente um subgrupo delas, as aquaporinas 3, 7 e 9, chamadas de aquagliceroporinas que fazem a difusão facilitada de glicerol pela membrana plasmática. Estas são expressas em diversos tecidos, a AQP3 é expressa na membrana basolateral das células epiteliais do ducto coletor na medula renal, nas vias aéreas, no intestino, estômago, epiderme, bexiga, conjuntiva, córnea e eritrócitos. A AQP7 é expressa no tecido adiposo, nos túbulos proximais do rim e no músculo esquelético e a AQP9 é expressa no fígado, cérebro, leucócitos, baço e epidídimo (Hara-Chikuma e Verkman, 2006; Roudier et al., 1998). Segundo Roudier e colaboradores (1998), a AQP3 é o principal poro para o transporte de glicerol em eritrócitos de humanos e de ratos. A presença deste poro pode fornecer a hemácia uma menor suscetibilidade ao estresse osmótico quando exposta a altas concentrações de glicerol.

1.2 Níveis plasmáticos de glicerol

Em humanos saudáveis a concentração de glicerol encontrada no plasma varia de 0,02 a 0,27 mM (McCabe, 2001). Em mamíferos, a concentração normal de glicerol

plasmático varia de 0,04 a 0,4 mM, e em ratos os níveis variam de 0,05 a 0,4 mM nos primeiros dias de vida, e reduzem gradualmente até 0,1 mM. Entre os fatores que podem alterar os níveis plasmáticos de glicerol estão, o jejum, a prática de exercícios físicos, a exposição ao frio, o hormônio insulina e a noradrenalina (Lin, 1977).

Altos níveis plasmáticos de glicerol podem ser encontrados em pessoas com deficiência enzimática para metabolizar o glicerol. Uma elevação de 1,8 a 8,3 mM de glicerol plasmático é detectada em uma doença chamada de hiperglicerolemia, ou deficiência da glicerol cinase (DGK). A DGK é um erro inato do metabolismo, cuja prevalência é rara na população e ocorre devido a deficiência da glicerol cinase, enzima responsável pela fosforilação da molécula de glicerol a glicerol 3-fosfato. A doença é caracterizada pela glicerolúria, hiperglicerolemia e pseudohipertrigliceridemia. Conforme o fenótipo, a DGK é dividida nas formas juvenil e adulta, a forma juvenil está associada com a deterioração do sistema nervoso central e a forma adulta é benigna e assintomática (McCabe, 2001).

1.3 Uso Terapêutico do glicerol

O glicerol possui propriedade osmótica, e tem capacidade para rapidamente contrabalancear a pressão hídrica. Devido a esta característica, o glicerol na concentração de 10% é administrado por via intravenosa para o tratamento de edemas cerebrais, glaucoma e hipertensão intracraniana. Para Sloviter (1958) a administração intravenosa de uma solução contendo glicerol 5%, glicose 5% e NaCl 0,9% pode ser seguramente administrada em humanos e animais, e uma dose de glicerol 20% tem efeito hemolítico. A concentração de glicerol 10% é bem tolerada pelo organismo, com exceção de algumas situações em que pode ocorrer hemoglobinúria após a primeira administração (Kumana, 1990). Os eritrócitos são altamente permeáveis ao glicerol e

podem sofrer lise (pelo menos 50% sofrem hemólise em solução de glicerol 0,3M), principalmente os eritrócitos de ratos, camundongos e de humanos que são menos resistentes ao glicerol que as células de outros mamíferos, como coelhos, cobaios cavalos e ovelhas (Lin, 1977). A permeabilidade ao glicerol é baixa no cérebro, fluído cerebrospinal e no humor aquoso dos olhos. O glicerol aumenta a osmolalidade do sangue, aumenta o fluxo sanguíneo no cérebro e reduz o edema e a pressão intracranial (Meyer, 1972; Brisson et al., 2001; Wang e Cheng, 1994).

Devido a sua propriedade osmótica, o glicerol também pode ser ingerido juntamente com água, para aumentar a absorção de líquido no néfron renal, e causar hiperhidratação (Nelson e Robergs, 2007). Essa ingestão é realizada principalmente por atletas que têm o objetivo de aumentar o volume corpóreo e manter-se hidratado por mais tempo, devido à redução da taxa de eliminação de água pelo rim. Resumindo, o glicerol atua com um termo-regulador em altas temperaturas, é um agente hidratante e melhora a resistência física (Brisson et al., 2001).

1.4 Toxicidade aguda do glicerol

Em 1953, Hine realizou um estudo de toxicidade em animais após a administração oral de glicerol. Em ratos a LD50 encontrada foi de 27.200 mg de glicerol/Kg de peso corpóreo, a LD50 em camundongos foi de 23.000 mg de glicerol/Kg e em porcos de 10.000 mg de glicerol/Kg. Neste estudo todos os animais apresentaram tremores, convulsões, hiperaemia do intestino delgado e piloro, congestão do pulmão e baço, e irritação gástrica.

Quando administrado por via intraperitoneal a LD50 do glicerol em ratos e camundongos variou de 4.420 a 10.100 mg de glicerol/Kg de peso corpóreo, e a LD50 do glicerol administrado por via intravenosa foi de 4.250 a 6.700 mg de glicerol/Kg. No

entanto, o glicerol apresenta mais toxicidade após administração subcutânea, cuja LD50 foi de 91 a 100 mg de glicerol/Kg de peso corpóreo e nestes animais foi observado a ocorrência de hemólise (CAS, 2009).

Segundo Finckh (1959), a administração de glicerol 50% por via subcutânea na dose de 4 a 8 mL/Kg causou hemólise, hemoglobinúria e necrose tubular 2 horas após a injeção de glicerol. Campbell (1959) administrou glicerol 50% (vol/vol) por via subcutânea e intravenosa nas doses de 0,6 a 4 mL/100g e percebeu hemorragia intracranial com bastante freqüência em camundongos e ocasionalmente em ratos. E segundo o autor, esta hemorragia pode ser a causa de sintomas cerebrais como espasmo muscular, convulsão, paralisia, coma e morte que não são descritos pela literatura como induzidas pelo glicerol.

Sloviter (1958) relata que a administração parenteral de glicerol em animais causa hemoglobinúria, hipotensão, distúrbios no sistema nervoso central e perda de peso, e que os efeitos tóxicos do glicerol são mais freqüentes e pronunciados após administração subcutânea.

A ingestão de glicerol também pode trazer problemas, segundo Lin (1977), ratos que ingeriram solução de glicerol 5% durante 6 meses apresentaram uma moderada injúria renal. E coelhos que ingeriram 20 mL de glicerol 50% durante duas semanas apresentaram altos níveis de colesterol e princípio de aterosclerose. No entanto, um estudo em humanos que ingeriram 30 mL de glicerol 95%, três vezes ao dia durante 50 dias, não apresentou efeitos nocivos.

Como se pode ver, os resultados de toxicidade do glicerol variam conforme o estudo e dependem de variáveis como a concentração do glicerol, a via e o tempo de administração. No entanto, a literatura não fornece dados sobre a toxicidade do glicerol

administrado intramuscularmente e também não se tem dados mais recentes sobre a toxicidade do glicerol em animais.

2. Fisiopatologia do Rim

O rim é composto por unidades funcionais chamadas néfrons. O néfron é formado por um glomérulo que faz a filtração, e por túbulos que reabsorvem e secretam água e solutos. Os rins têm como função eliminar catabólitos produzidos no organismo, regular a homeostase hidreletrolítica, manter o volume extracelular constante, regular a pressão arterial sistêmica, sintetizar hormônios e degradar peptídios circulantes – cerca de 40% da insulina é inativada pelos rins (Barros et al., 2006).

A redução do tecido renal funcional prejudica as tarefas metabólicas do rim. Uma lesão no rim pode causar redução na perfusão e nas funções glomerulares e/ou tubulares. A filtração glomerular defeituosa pode levar a perda de proteínas e a redução na reabsorção tubular pode resultar no aumento da excreção de compostos importantes, como aminoácidos, glicose, bicarbonato e eletrólitos. A redução da função excretória do rim afeta a regulação do metabolismo da água, de eletrólitos e minerais e o equilíbrio ácido-base, que são importantes mecanismos de regulação da pressão sanguínea a longo-prazo (Silbernagl e Lang, 2006).

A redução da filtração renal e da secreção tubular afeta a excreção de substâncias, alterando a concentração plasmática destas substâncias. Por exemplo, a creatinina possui uma taxa constante de produção e excreção, a quantidade excretada é idêntica a quantidade filtrada e independente da concentração plasmática. Como a produção de creatinina é constante, uma redução na taxa de filtração glomerular (TFG), leva a redução da excreção renal e aumento dos níveis plasmáticos de creatinina (Silbernagl e Lang, 2006).

3. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo está associado a diversos eventos patológicos, que incluem câncer, neurodegeneração, arteriosclerose, toxicidade associada a drogas, injúria por isquemia/reperfusão e idade. Contribui para mudanças estruturais em proteínas, lipídios e DNA, e é causado por um desequilíbrio na produção de espécies reativas e de moléculas antioxidantes. O radical livre possui um elétron desemparelhado, que o torna muito instável e reativo, com grande capacidade de se combinar inespecificamente com moléculas integrantes da estrutura celular. Podem reagir com metais, lipídios e com espécies reativas de oxigênio (EROs) podem gerar espécies extremamente danosas, que atacam proteínas, lipídios e DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo é responsável por gerar diversas espécies radicalares, tais como hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet), e espécies não radicalares, como o oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso e peroxinitrito (ONOO^-). O radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é citotóxico através da geração de outros radicais livres, quando sofre reação de dismutação, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ origina H_2O_2 que é pouco reativo a nível fisiológico, mas que pode atacar diretamente algumas enzimas, e o $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode reagir com H_2O_2 e formar o radical HO^\bullet . O radical HO^\bullet , é o mais danoso dos radicais livres, danifica proteínas, lipídios, membranas celulares do núcleo e da mitocôndria, RNA e DNA. No DNA, o HO^\bullet ataca as bases nitrogenadas e a desoxirribose levando à ruptura da molécula. (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode ser detectada através da oxidação do DCFH (2,7-dihidrodiclorofluoresceína) a DCF (2,7-diclorofluoresceína fluorescente), esta reação ocorre principalmente através de oxidantes derivados do $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ (LeBel, 1992).

Os lipídios de membrana sofrem oxidação pelas EROs e de nitrogênio. A peroxidação de lipídios é um processo de reação em cadeia iniciado geralmente por um radical hidroxila, que retira um átomo de hidrogênio da molécula de lipídio. Este ataque ocasiona a fragmentação de lipídios poliinsaturados e gera produtos secundários como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), que reagem com proteínas e fosfolipídios causando danos na célula (Barreiros et al., 2006). O malondialdeído pode ser quantificado através de sua reação com o ácido 2-tiobarbitúrico, que produz um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

Nos aminoácidos e nas proteínas, as espécies reativas podem reagir na cadeia lateral, atacando preferencialmente resíduos de cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina. Os grupos carbonilas são introduzidos nos aminoácidos através da oxidação, reações com produtos da lipoperoxidação (principalmente HNE), e por reações de glicação e glicoxidação. Esse ataque pode gerar danos, como a quebra de ligações que levam a perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através da membrana, lise e morte celular (Barreiros et al., 2006). O conteúdo de proteínas carboniladas pode ser detectado via espectrofotômetro, e são consideradas marcadores da oxidação protéica mediada por estresse oxidativo (Reznick e Packer, 1994).

4. Insuficiência Renal Aguda

A insuficiência renal aguda (IRA) é definida como a perda aguda da função renal, com o acúmulo de compostos nitrogenados (uréia e creatinina), acompanhada ou não da diminuição da diurese. A IRA é classificada conforme a sua causa em pré-renal, renal e pós-renal. A IRA pré-renal é desencadeada pela redução do fluxo sanguíneo

renal, devido a hipovolemia, baixo débito cardíaco e ocorre devido a infecções, doenças e fármacos que reduzem o fluxo sanguíneo efetivo do rim. A IRA renal é causada por um insulto agudo e grave ao parênquima renal, que leva a necrose tubular aguda, geralmente devido a hipoperfusão/isquemia, toxicidade de substâncias endógenas e exógenas, ou por uma combinação de ambos os fatores. As toxinas exógenas são drogas como anestésicos, analgésicos, antibióticos, contrastes radiológicos, solventes orgânicos, metais pesados, anfetaminas e heroína, e nessa situação a nefrotoxicidade é induzida pelos aminoglicosídeos. E as toxinas endógenas ocorrem de situações em que se têm destruição tecidual, são elas, a mioglobina, hemoglobina, ácido úrico, cálcio e oxalato. A IRA de causa pós-renal ocorre devido a uma obstrução do fluxo urinário por cálculos, coágulos, tumores, trauma direto e por corpos estranhos (Barros et al., 2006).

Na IRA o metabolismo da glicose fica deficiente e por isso, a IRA está associada a hiperglicemia, aumento da degradação de proteínas, déficit no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Costa et al., 2003).

Nos primeiros dias de IRA, pouca ou nenhuma urina é excretada, e ao longo dos dias ocorre o aumento gradual da TFG, enquanto que a reabsorção no néfron ainda está diminuída. Mas se a lesão ocorrer nos túbulos renais ocorre poliúria como resposta primária, e grandes volumes de urina são excretados apesar da redução da TFG. Portanto, o volume urinário não é um bom indicador da capacidade funcional dos rins, porque os processos de transporte urinário estão gravemente limitados e a reabsorção de líquido diminuída. Assim, a determinação dos níveis de creatinina no plasma e na urina, fornece informações sobre o verdadeiro estado funcional dos rins, em particular da taxa de filtração glomerular (Silbernagl e Lang, 2006).

5. Rabdomiólise

A rabdomiólise é definida como necrose das fibras do músculo esquelético com a conseqüente liberação de compostos intracelulares potencialmente tóxicos na corrente sanguínea e na urina. A rabdomiólise é considerada a principal causa de insuficiência renal aguda.

Os insultos ao músculo esquelético podem ocorrer devido a causas primárias, como doenças metabólicas e hereditárias, ou devido a causas secundárias, como miopatias inflamatórias, infecções, isquemia, drogas, toxinas e principalmente injúria através do exercício físico extenuante (Zager, 1996; Guis et al., 2005).

A insuficiência renal aguda induzida por rabdomiólise ocorre em conseqüência da liberação muscular de mioglobina, hemoglobina, proteínas heme e íons ferro para o sangue. Estes compostos são nefrotóxicos, prejudicam a filtração renal, causam vasoconstrição, estresse oxidativo e necrose tubular aguda. Em meio ácido, a mioglobina e/ou a hemoglobina se ligam a proteína Tamm-Horsfall e formam cilindros granuloso pigmentados (cilindros de hematina ácida), que causam a obstrução dos túbulos renais e toxicidade pela geração de EROs. A hemoglobinúria e a mioglobinúria também estão presente, conferindo a urina uma coloração escura tipo “coca-cola” (Zager, 1996; Rosenberger et al., 2008).

A necrose tubular aguda é uma das alterações estruturais mais comuns associada ao desenvolvimento da IRA. Uma das causas de necrose celular é a indução de estresse oxidativo, que ocorre quando a hemoglobina e/ou a mioglobina são expostas ao peróxido de hidrogênio, e ocorre a liberação de íons heme e íons ferro que estimulam a peroxidação lipídica e podem dar origem ao radical hidroxila, que é extremamente tóxico a célula (Halliwell e Gutteridge, 2007). As células dos túbulos proximais são ricas em mitocôndrias e possuem alto consumo metabólico, sendo, portanto mais

suscetíveis ao dano que as células glomerulares, que não sofrem necrose por serem estruturas conjuntivas e de baixo metabolismo energético (Silbernagl e Lang, 2006).

Além do trauma muscular, existem dois fatores que predispõem a IRA induzida pela rbdomiólise: hipovolemia/desidratação e acidúria. Estes fatores potencializam o efeito tóxico da proteína heme (Zager, 1996).

O diagnóstico de IRA induzida pela rbdomiólise é realizado através da dosagem dos níveis plasmáticos de creatina cinase (CK), e pela presença de mioglobina na urina, altos níveis de CK no plasma são indicativo de lesão muscular (Guis et al., 2005).

6. Modelo Experimental de Insuficiência Renal Aguda produzida pela Rbdomiólise

Além do uso do glicerol como agente osmótico, ele também é amplamente utilizado por pesquisadores para induzir insuficiência renal aguda em ratos através da rbdomiólise. Neste modelo, a lesão muscular é provocada pela administração de uma solução hipertônica de glicerol que resulta na liberação de mioglobina e proteínas heme no sangue, e que vão causar lesão renal e conseqüentemente IRA.

Neste modelo, os ratos recebem uma única injeção intramuscular de glicerol 50% (vol/vol) na dose de 8 a 10 mL/Kg de peso corpóreo. Esses animais são privados de beber água por 24 h para que a hipovolemia facilite a precipitação dos cilindros de pigmento de mioglobina nos túbulos renais e segundo Oken (1966) a taxa de filtração glomerular em ratos com privação de água é 40% menor que em ratos sem privação de água. E 24 h após a injeção intramuscular de glicerol, os animais são sacrificados por decapitação e a injúria renal é avaliada através da análise do sangue e dos rins do animal (Singh et al., 2004). Neste caso, a injúria renal é causada por uma combinação de

fatores como, vasoconstrição intrarenal severa, obstrução dos túbulos renais por cilindros de hematina ácida e dano oxidativo mediado pela proteína heme e íons ferro nas células tubulares (Lieberthal e Nigam, 2000; Zager, 1996). O radical hidroxila gerado pelo estresse oxidativo é um importante mediador da injúria renal neste modelo de IRA (Shah e Walker, 1988).

O dano renal é avaliado pelo aumento dos níveis de creatinina plasmática, uréia sanguínea e pela queda da depuração renal de creatinina ou de uréia. O estresse oxidativo pode ser mensurado por diversos parâmetros como, a elevação dos níveis de malondialdeído, diminuição dos níveis de glutathione reduzida e alteração das atividades enzimáticas da catalase, glutathione redutase e superóxido dismutase (Chander et al., 2003; Singh et al., 2004; Aydogdu et al., 2006; Chander e Chopra, 2006).

O sucesso deste modelo de IRA induzida pela rabdomiólise deve-se ao fato de que esse modelo reproduz algumas das características morfológicas da insuficiência renal aguda em humanos como, injúria tubular, isquemia, obstrução e toxicidade (Lieberthal e Nigam, 2000).

7. Insuficiência Renal Aguda sem rabdomiólise

Em busca de informações sobre a função exercida pelo glicerol no modelo de IRA induzido por rabdomiólise, realizamos um trabalho (Rieger et al., 2008) com o objetivo de investigar os efeitos do glicerol no rim sem a interferência dos metabólitos tóxicos derivados da rabdomiólise. Para isso, uma única dose de glicerol 50% foi administrada intraperitonealmente em ratos Wistar de 30 dias de vida, e foi utilizada a dose de 10 mL/Kg de peso corpóreo e mesma condição de privação de água do modelo descrito de IRA induzido por rabdomiólise. Vinte e quatro horas após a administração

intraperitoneal de uma única dose de glicerol, os animais foram sacrificados por decapitação, o plasma foi coletado e os rins retirados para a avaliação da injúria renal.

No plasma, foram determinados os níveis de creatinina, CK e lactato desidrogenase (LDH), e no rim foram dosadas as atividades das enzimas CK, piruvato cinase (PK) e LDH e determinados os parâmetros de estresse oxidativo, TBARS, DCFH e carbonilas. Com esse trabalho obtivemos os seguintes resultados: aumento dos níveis plasmáticos de creatinina e com isso redução da TFG; déficit energético no rim através da redução da atividade das enzimas CK e PK; aumento na formação de radicais livres, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no rim e inibição da atividade da LDH plasmática e da LDH renal devido ao ataque por radicais livres. Portanto, nossos resultados sugerem que uma única administração intraperitoneal de glicerol induziu a produção de radicais livres com alteração na homeostasia energética, injúria renal e IRA, ou seja, estes são os mesmos eventos que ocorrem após a administração intramuscular de glicerol na IRA induzida por rabdomiólise.

Objetivos

Objetivos Gerais

Considerando que o glicerol é utilizado para induzir IRA através da rabdomiólise e que uma única administração intraperitoneal de glicerol provocou IRA sem rabdomiólise, o objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos da administração intraperitoneal prolongada de glicerol sobre o rim de ratos jovens.

Objetivos Específicos

- 1- Avaliar o efeito da administração prolongada de glicerol sobre a função de filtração glomerular renal através da determinação dos níveis de creatinina plasmática.
- 2- Determinar o efeito da administração prolongada de glicerol sobre a atividade de importantes enzimas do metabolismo energético, creatina cinase e piruvato cinase;
- 3- Avaliar o efeito da administração prolongada de glicerol sobre parâmetros de estresse oxidativo: dano a lipídios, proteínas e a formação de radicais livres;
- 4- Determinar o efeito da administração prolongada de glicerol sobre a taxa de oxidação de glicose no rim;
- 5- Avaliar a injúria renal provocada pela administração prolongada de glicerol através da análise histológica do rim;

Capítulo I

Artigo Submetido à Revista “Journal of Clinical Pathology”

INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF GLYCEROL PROVOKES RENAL FAILURE IN RATS

Elenara Rieger, Vander Edier Ebling Samrslá, Adriano Martimbianco de Assis, Eleonora Araújo dos Reis, Sthefanie Souza de Souza, Marcos Luiz Santos Perry, Lúcia Maria Klieman¹, Luciane Rosa Feksa and Clovis Milton Duval Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, RS, Brazil

1-Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90.035-903, RS, Brazil.

Corresponding author: Clovis M. D. Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Telephone 55 51 33085576

Fax 55 51 33085535

E-mail. clovisdw@ufrgs.br

Key Words: acute renal failure, glycerol, kidney, oxidative stress

ABSTRACT

1. Glycerol has been used for the treatment of intracranial hypertension, cerebral edema and glaucoma. One intramuscular administration of hypertonic glycerol solution has been used to produce acute renal failure by rhabdomyolysis and myoglobinuria. However, the same doses of glycerol administered intraperitoneally causes the same effect on the kidneys. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of intraperitoneal glycerol administration for two weeks in young rats on histology and some biochemical parameters in the kidney.

2. Twenty three-day-old Wistar rats received 10 mL/kg of hypertonic glycerol solution (50% vol/vol) or saline (NaCl 0.85 g%) for two weeks followed by a 24 hours period of water deprivation. Twenty-four hours after glycerol administration, rats were sacrificed. Creatinine level, creatine kinase and lactate dehydrogenase activities were determined in plasma, whereas glucose oxidation, creatine kinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase activities and the oxidative stress parameters free radicals formation, lipoperoxidation and protein carbonylation were measured in the renal tissue.

3. Kidney weigh was reduced and histological alterations were compatible with tubular necrosis without myoglobin casts. Glycerol did not alter plasma creatine kinase activity and increased plasma creatinine levels, suggesting renal insufficiency and absence of rhabdomyolysis. Renal glucose oxidation and cytosolic and mitochondrial creatine kinase activities were decreased, suggesting diminution of energy homeostasis in the kidney. Free radicals formation, lipoperoxidation and protein carbonylation were increased, suggesting oxidative stress.

4. These results are similar and most severe than those described after one intramuscular or intraperitoneal glycerol administration. Therefore, it will be important to evaluate renal function in people under long-term use of glycerol.

INTRODUCTION

Glycerol or glycerin is a clear liquid, odorless, miscible in water, constituents of triacylglycerol molecules, and can also be converted to a glycolytic substrate for subsequent metabolism. Glycerol has hygroscopic nature and acts as tissue dehydrators. The metabolism of glycerol involves the enzymes glycerol kinase (GK) and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH). These enzymes are tissue specific, being found majority in the liver and kidney. The kidney filtrate contains glycerol, almost all of that is passively reabsorbed through the proximal and distal tubules at healthy physiological blood glycerol levels.[1] Twenty percent of total glycerol is metabolized by the kidney.[2]

The glycerol is an osmotic agent, so that infusion of glycerol has been used in the treatment of cerebral edema, glaucoma and intracranial hypertension. Moreover, glycerol may act as a free radical scavenger, antioxidant, and activator of plasma prostaglandin (PGI₂), causing vasodilatation.[3] The glycerol ingestion with added fluid has been used to increase fluid retention (glycerol hyperhydration), providing benefits of improved thermoregulation and endurance during exercise or exposure to hot environment.[1, 4]

Experimentally, the model more common for acute renal failure (ARF) formation following rhabdomyolysis is induced by intramuscular injection (i.m.) of hypertonic

glycerol solution in rats, following a 24 hour period of water deprivation,[5, 6] damaging skeletal muscle cells, leading to the release of myoglobin and creatine kinase into the blood circulation.[7] The tubular damage that results is thought to be caused by heme toxicity and is due to a combination of factors including severe intrarenal vasoconstriction, heme-mediated oxidant injury to tubular cells and obstruction of distal tubules by casts of acid haematin.[5] Twenty-four hours after glycerol injection, blood is collected and the kidneys harvested for assessment of renal injury. However, in a previous study, searching for further information on glycerol in experimental acute renal failure, we analyzed the direct effects of glycerol on the rat kidney through intraperitoneal administration of hypertonic glycerol solution. Our results in oxidative stress and acute renal failure, which are the same events that occur in the model of ARF after intramuscular administration of glycerol, have shown that it is possible that glycerol may provoke acute renal failure by rhabdomyolysis-independent mechanisms.[8] Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of long-term renal exposure to glycerol by intraperitoneal injection of a glycerol solution for two weeks in young rats.

METHODS

Subjects and reagents

Twenty three-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil. Rats were kept with dams during drugs treatment until they were sacrificed. Animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in an air-

conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room. Rats had free access to water and to standard commercial chow containing 20.5% protein, 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no 80-23, revised 1996) were followed in all experiments and our research protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. All chemicals were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), except thiobarbituric acid, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), and carbonyls content of proteins were measured with a spectrophotometer with controlled temperature (Hitachi U-2001). Oxidation of 2,7-dihydrodichlorofluorescein (DCFH) was measured with a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-2000). [^{14}C] glycerol (142 mCi/mmol) was purchased from Amersham International, Little Chalfont, Bucks, UK). Scintillation was counted in a Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2880TR purchased from Perkin Elmer, USA. Shandon electric microtome and Olympus microscope were used for histological examination of the kidneys.

Study design

For the determination of the kinetic parameters of glycerol, 20 rats were used, 5 for each time of plasma measurement (0, 30, 60 and 90 min after glycerol administration. For the other parameters determination, two sets of rats were divided into two groups, each set consisting of seven animals, controls (saline) and experimental (glycerol). The rats had free access to foods and water. The glycerol group received an intraperitoneal injection (i.p.) of 10 ml/kg hypertonic glycerol (50% vol/vol), and the control group received equivalent volumes of saline solution (NaCl 0.85 g%) during 14 days. The animals were

sacrificed in fifteenth day, blood was collected and the kidneys harvested for biochemistry and histological analysis.

Kidney and plasma preparation

Treated animals were sacrificed by decapitation. The blood was collected in heparinized tubes and the kidneys were rapidly removed, decapsulated, washed, and homogenized with a Teflon-glass homogenizer in 5 vol of ice-cold SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 800 x g for 10 min at 4 °C in a Sorval refrigerate centrifuge. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The supernatant solution of the second centrifugation, containing the cytosol and other cellular components, such as endoplasmic reticulum and lysosomes, was collected for determination of cytosolic CK, piruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) activities. The pellet, containing mitochondria, was washed twice with the same isotonic SET buffer and resuspended in 100 mM MgSO₄-Trizma buffer, pH 7.5, for determination of mitochondrial CK activity. The cytosolic and mitochondrial fractions were stored no longer than one week at -70 °C. The mitochondrial fraction was frozen and thawed three times immediately before the assay to break mitochondrial membranes, facilitating the interaction between CK and the substrates. Blood was centrifuged at 800 x g for 5 min for plasma separation and for determination of creatinine, glycerol, CK and LDH activities. Tissue samples for determination of the parameters of oxidative stress were homogenized in 5 volumes of ice-cold buffer (20mmol/L sodium phosphate/140mmol/L KCl, pH 7.4) and centrifuged at 800 x g for 10min at 4°C. The supernatant was collected for determination of TBARS, DCFH oxidation and carbonyls content of proteins.

Histological analysis

The kidneys were fixed in buffered formalin at 4% and cut lengthwise. One half was subjected to routine histological processing, and cut into Shandon electric microtome in slices of 4 micrometers thick. Slides were stained by the method of hematoxylin and eosin and observed in conventional optical microscope, Olympus brand by a pathologist blinded to the treatment to which the rats had been submitted.

Glucose Oxidation

For the measurement of glucose oxidation to CO₂, kidney was dissected, weighed (80-90 mg), and cut into 0.3-mm slices using a McIlwain tissue chopper. This was incubated in closed bottles in a medium containing Krebs Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) with 1 mM glucose and 0.5 μCi [U-¹⁴C] glucose (142 mCi/mmol). Incubations were carried out in flasks after contents were gassed with a 95% O₂:5% CO₂ mixture for 1 min. Flasks were subsequently sealed with rubber caps. The slices of kidney were incubated at 37°C for 1 h in a metabolic shaker (60 cycles/min), according to the method of Dolnikoff et al.[9] Incubation was stopped by adding 0.20 ml 50% TCA through the rubber cap. Subsequently, 0.1 ml of 2 M sodium hydroxide was injected into central wells. The flasks were shaken further for 30 min at 37°C to trap CO₂. Next, the contents of the central well were transferred to vials and assayed for CO₂ radioactivity in a liquid-scintillation counter. All results were expressed considering the initial specific activity of the incubation medium. The CO₂ production rate was constant during 30, 60 and 90 min of incubation.

Plasma creatinine determination

Plasma creatinine was measured using a standard diagnostic kit (Labtest Diagnostic, Lagoa Santa, Brazil). Results are expressed as μmol of creatinine/L.

Plasma Glycerol determination

Plasma Glycerol was measured using Free Glycerol Determination Kit (Sigma, St Louis, MO, USA). Results are expressed as mmol of glycerol/L.

Enzymes assays

Creatine kinase activity

The reaction mixture contained the following final concentrations: 60 mmol/L Tris-HCL buffer, pH 7.5, 7 mmol/L phosphocreatine, 9 mmol/L MgSO_4 , 0,3% Triton X-100 and 1 μg of sample protein. After 5 min preincubation at 37°C , the reaction was started by the addition of 3.2 mmol/L ADP. The reaction was stopped after 10 min by addition of 10 mmol/L p -hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes.[10] The colour was developed by the addition of α -naphthol and diacetyl in a final volume of 1 mL and absorbance read after 20 min at 540 nm. Glycerol did not interfere in spectrophotometer reading or color development. Results are expressed as μmol of creatine formed per min per mg of protein for kidney samples and as μmol of creatine formed per min per L for plasma samples.

Pyruvate kinase activity

Pyruvate kinase activity was assayed as described by Leong et al.[11] The incubation medium consisted of 0.1 mol/L Tris/HCl buffer, pH 7.5, 20 mmol/L MgCl_2 , 0.16

mmol/L NADH, 150 mmol/L KCl, 5.0 mmol/L ADP, 7 units of LDH, 0.2% (v/v) Triton X-100, and 10 μ l of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 ml. The reaction was started after 30 min of preincubation by the addition of 1.0 mmol/L phosphor(enol)pyruvate (PEP). All assays were performed in triplicate at 25°C. The concentration of the reagents and the incubation time (2 min) were chosen to ensure linearity of the reaction. Results are expressed as μ mol of pyruvate formed per min per mg of protein.

Lactate dehydrogenase activity

Lactate dehydrogenase activity was assayed as described by Kaplan et al.[12] The incubation medium consisted of Tris/HCl buffer, pH 7.5, 0.18 mmol/L NADH, 30 mmol/L sodium azide and 10 μ l mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 mL. After 5 min of preincubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 2 mmol/L sodium pyruvate. The concentration of the reagents and the incubation time (2 min) were chosen to ensure linearity of the reaction. Enzyme activity was determined at 340 nm. Results are expressed as nmol of lactate oxidized per min per mg of protein for kidney samples and as nmol of lactate oxidized per min per L for plasma samples.

Oxidative stress parameters

Thiobarbituric acid-reactive substances

Thiobarbituric acid-reactive substances were determined according to the method described by Ohkawa et al, 1979.[13] Measurements of TBARS are mainly of malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation caused primarily by hydroxyl free radicals. Hydroxyl free radicals are formed from H₂O₂ by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction. Briefly, 350 μ L of cold 10%

trichloroacetic acid were added to 350 μL of supernatants and the mixture was centrifuged at 800 x *g* for 10 min. The reaction mixture, containing 300 μL of supernatant and 300 μL of 0.67% thiobarbituric acid in 7.1% sodium dodecyl sulfate, was left in a boiling water bath for 25 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The resulting pink-stained TBARS was determined in a spectrophotometer at 532 nm. A calibration curve was constructed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and each curve point was subjected to the same treatment as the supernatants. Thiobarbituric acid-reactive substances were calculated as pmol MDA formed per mg of protein.

Oxidation of DCFH

The production of reactive oxygen and nitrogen species was assessed according to the methods of LeBel et al,[14] using 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). The $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ -derived oxidant is mainly responsible for the non enzymatic oxidation of DCFH. In addition, peroxidase alone and oxidants formed during the reduction of H_2O_2 by peroxidase oxidize DCFH.¹⁰ The DCF-DA was prepared in 20 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mmol/L KCl and the solution was incubated with 100 μL of supernatant for 30 min at 37°C. The DCF-DA is hydrolyzed enzymatically by intracellular esterases to form non-fluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of reactive species. The intensity of the DCF fluorescence parallels the amount of reactive species formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 and 535 nm, respectively. A calibration curve was constructed using standard DCF (0.25–10 μmol) and the levels of reactive species were calculated as pmol of DCF formed per mg of protein.

Carbonyl determination

The carbonyl content in protein was determined according to the method of Reznick and Packer.[15] Carbonyls are formed by the oxidation of amino acids in proteins, or adducts formed with the products of lipid peroxidation, mainly 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Briefly, 200 μ L supernatant from each sample and 400 μ L of 10 mmol/L 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) or 400 μ L of 2 mmol/L HCl were incubated at room temperature for 1 h in the dark. After incubation, 0.5 mL of 20% trichloroacetic acid was added to the mixture and the samples centrifuged at 10,000 \times g for 3 min. Next, the protein pellet was washed twice with 1 mL of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v), suspended in 0.6 mL of 6 mol/L guanidine and kept at 60°C for 15 min. After centrifugation at 10,000 \times g for 3 min, the absorbance of each sample was read at 370 nm and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of 22 000 L/mol per cm, as described by Levine.[16] Results are expressed as nmol of carbonyl formed per mg of protein.

Protein determination

The protein content of the samples was determined by the method of Lowry et al,[17] using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Data of biochemical determinations were analyzed by Student's *t*-test for independent samples using SPSS software (version 12.0 for Windows; SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Plasma levels of glycerol in controls were 0.08 ± 0.01 mmol/L. After glycerol administration, plasma levels achieved: 49 ± 1.1 (30 min); 37 ± 0.8 (60 min) and 26 ± 1.1 (90 min) mmol/L. Plasma half-life was 60 min and control levels were achieved after 240 min.

Percent body weight gain after treatment was significantly higher ($t_{(10)} = 9.65$; $p < 0.001$) in rats receiving saline solution (137 ± 10 g) than in rats treated with glycerol (75 ± 13 g). Kidney weight was significantly reduced ($t_{(10)} = 2.44$; $p < 0.05$) in rats receiving glycerol (1 ± 0.1 g) compared with those receiving saline solution (1.2 ± 0.1 g). Creatinine plasma levels (Fig 1) were significantly higher in the animals receiving glycerol than in animals receiving saline solution ($t_{(10)} = 4.32$; $p < 0.01$), suggesting a decrease in glomerular filtration rate. Optical microscope analysis identified suffering in proximal tubules, predominantly in the peripheral portion (two to three layers of tubules). The changes consisted of hydropic degeneration, cytoplasmic vacuolation and acute tubular necrosis. In some samples, these changes were observed in diffuse cortical layer. The changes were graded from mild (10-20%) to moderate (80-90%). The glomeruli showed no histological changes apart from mild congestion (100%). Data from body and kidney weight, plasma creatinine levels, and from histologic changes are compatible with chronic renal damage. On the other hand, chronic glycerol administration did not alter plasma levels of CK activity ($t_{(10)} = 0.6$; $p > 0.5$) (Fig 1). These data, together with the absence of myoglobin casts in renal tubules indicate that rhabdomyolysis did not occur and was not responsible for the kidney damage.

Biochemical parameters of energy homeostasis in the kidneys were determined. Glucose oxidation rate (Fig 2) was significantly reduced in the kidney of rats receiving

glycerol compared to those receiving saline solution ($t_{(10)} = 2.49$; $p < 0.05$). Pyruvate kinase activity was increased ($t_{(10)} = 4.34$; $p < 0.01$), whereas cytosolic CK activity ($t_{(10)} = 3.11$; $p < 0.05$) and mitochondrial CK activity ($t_{(10)} = 4.28$; $p < 0.01$) were reduced in the kidney of the animals treated with glycerol (Fig 2).

Data from biochemical parameters of oxidative stress indicated increased lipoperoxidation (TBARS) ($t_{(10)} = 8.97$; $p < 0.01$), protein carbonylation ($t_{(10)} = 2.32$; $p < 0.05$), and free radical formation ($t_{(10)} = 2.49$; $p < 0.05$) in the kidneys of glycerol-treated rats (Fig 3). Reduced plasma LDH activity ($t_{(10)} = 2.65$; $p < 0.05$) (Fig 1) was probably caused by free radicals.[18]

DISCUSSION

Intramuscular hypertonic glycerol solution administration has been used for provoke acute renal insufficiency through rhabdomyolysis in rats.[19-22] In this model, renal insufficiency has been thought to be caused by myoglobinuria and myoglobin and acid hematin casts formation,[5] and to occur a proximal tubular transport defect associated with histologic and enzymatic alterations.[20] Similar results were obtained by intravenous glycerol administration, provoking hemolysis and hemoglobinuria.[3]

In a previous study carried out by our research group,[8] the direct effect of glycerol on kidney was investigated through i.p. administration of hypertonic glycerol in thirty day-old Wistar rats during one day, at the same doses administered i.m, and it results in formation of free radicals, decreased glomerular filtration and renal injury. In the present study, the animals were subjected to intraperitoneal administration of glycerol during 14 days. Glycerol achieved high plasma level after 30 min (49 mmol/L) and returned to normal levels (0.08 mmol/L) after 4 h. Renal histology was compatible with

moderate tubular injury. The increase of plasma creatinine level (20% above controls) was in agreement with the decrease of kidney weigh (20 %), indicating that prolonged glycerol administration may lead to a chronic renal insufficiency.

The diminution of glucose oxidation (30%), cytosolic CK activity (20%) and mitochondrial CK activity (50%) indicates a strong reduction of renal energy homeostasis, suggesting that energy deficit may be an important mechanism of renal injury. The increase of pyruvate kinase activity in kidneys is possibly a mechanism of compensation, since after one administration of glycerol, pyruvate kinase activity was decreased.[8] However, this enzyme activity increase was not sufficient to normalize energy liberation from glycolysis, since its oxidation was reduced. Rhabdomyolysis was not responsible for renal injury, because plasma creatine kinase activity, a known marker of muscle injury was normal, and myoglobin casts were absent in renal tubules.

Plasma lactate dehydrogenase was reduced in rats glycerol-treated, suggesting free radical induction.[18] Creatine kinase, a thiol-containing enzyme, is susceptible to free radicals that modify critical thiol groups for its activity.[23] So, the decrease of creatine kinase activity could be due to oxidative stress induced by glycerol. Glycerol enhances the sensitivity of endotoxins,[21] but has been considered as a free radical scavenger and antioxidant, indicated for brain infarct treatment.[3] However, glycerol acting as a scavenger molecule produces secondary scavenger-derived free radicals capable of damaging DNA.[24, 25] Besides, prevention of glycerol-induced acute renal failure by antioxidants like naringin[19] and L-carnitine,[22] reinforces the hypothesis that glycerol induces oxidative stress in vivo.

In an attempt to investigate oxidative stress in the kidney of rats treated with glycerol, some parameters were determined. Glycerol induced free radicals formation,

lipoperoxidation and carbonylation of proteins in the kidney, pointing to oxidative stress induction. These parameters of oxidative stress were altered after one single intraperitoneal administration of glycerol.[8]

Therefore, one possible sequence of events leading to the renal injury by prolonged glycerol administration could be: stress oxidative induction, inhibition of thiol-containing enzymes and others enzymes and proteins sensitives to free radicals, impairment of energy homeostasis, tubular cells damage by necrosis and apoptosis, progressive renal atrophy and chronic renal failure. In case this may occur in people under glycerol use, it will be important that glycerol might be used cautiously and renal function would be monitored.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS-Brazil) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-CNPq /FAPERGS –Brazil).

Figures and Legends

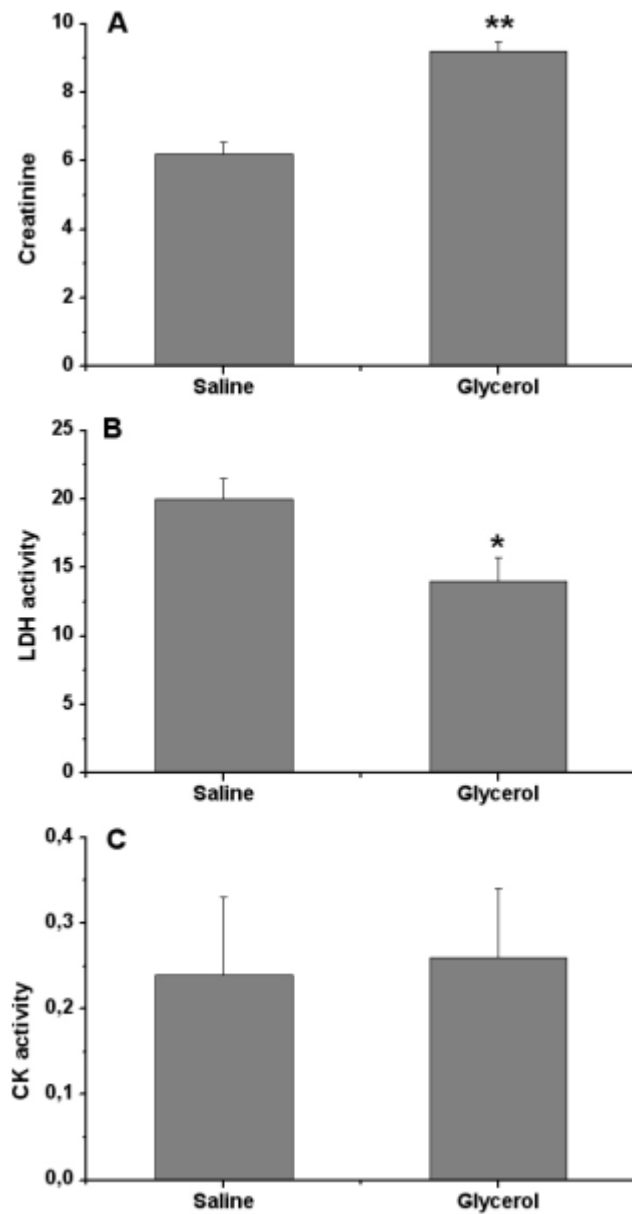


Fig 1. Effect of glycerol administration on plasma levels of creatinine (A), lactate dehydrogenase (B) and creatine kinase (C).

Data are mean \pm SD for six animals in each group. Determinations were performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared with control (Student's *t*-test for independent samples).

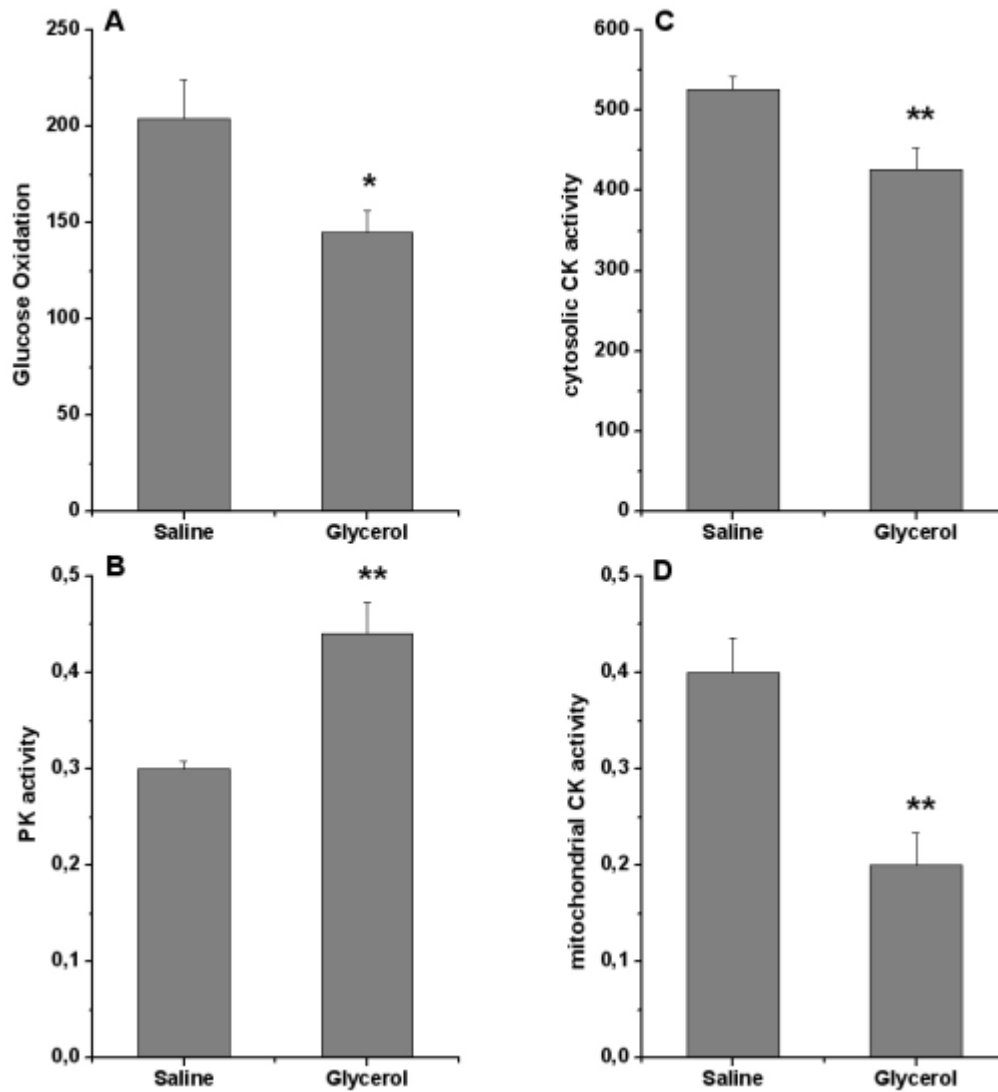


Fig 2. . Effect of glycerol administration on glucose oxidation (A) and pyruvate kinase (B), cytosolic cratine kinase (C) and mitochondrial creatine kinase (D) activities in the kidney of rats.

Data are mean \pm SD for six animals in each group. Determinations were performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; compared with control (Student's *t*-test for independent samples).

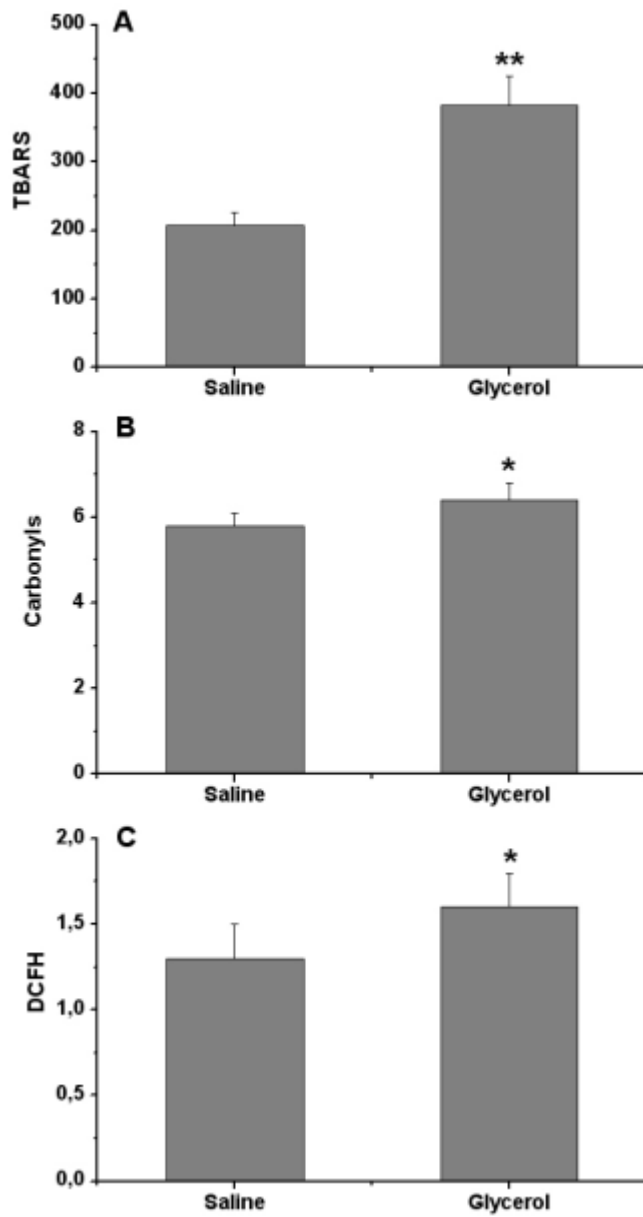


Fig 3. Effect of glycerol administration on TBARS (A), protein carbonylation (B) and DCFH oxidation (C) in the kidney of rats.

Data are mean \pm SD for six animals in each group. Determinations were performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; compared with control (Student's *t*-test for independent samples).

References

1. Robergs RA & Griffin SE. *Glycerol Biochemistry, Pharmacokinetics and Clinical and Practical Applications*. Sports Med. 1998; 26:145-67.
2. Lin ECC. *Glycerol utilization and its regulation in mammals*. Annu. Rev. Biochem. 1977; 46:765-95.
3. Winter R, Nau R, Hacke W. *Treatment of ischemic cerebral infarct with glycerine*. Nervenarzt. 1995; 8:596-602.
4. Brisson D, Vohl MC St-Pierre J, Hudson TJ, et al. *Glycerol: a neglected variable in metabolic processes?* BioEssays. 2001; 23:534-42.
5. Lieberthal W, Nigam SK. *Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable*. Am. J. Physiol. Ren. Physiol. 2000; 278:1-12.
6. Zurovsky Y. *Models of glycerol-induced acute renal failure in rats*. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 1993; 4:213-28.
7. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. *The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis*. Eur. J. Int. Med. 2007; 18:90-100.
8. Rieger E, Rech VC, Feksa LR, et al. *Intraperitoneal glycerol induces oxidative stress in rat kidney*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2008; 35:928-33.
9. Dolnikoff M, Martin-Hidalgo A, Machado UF et al. *Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats*. Int J Obes Rel Metab Dis. 2001; 25:426-433.

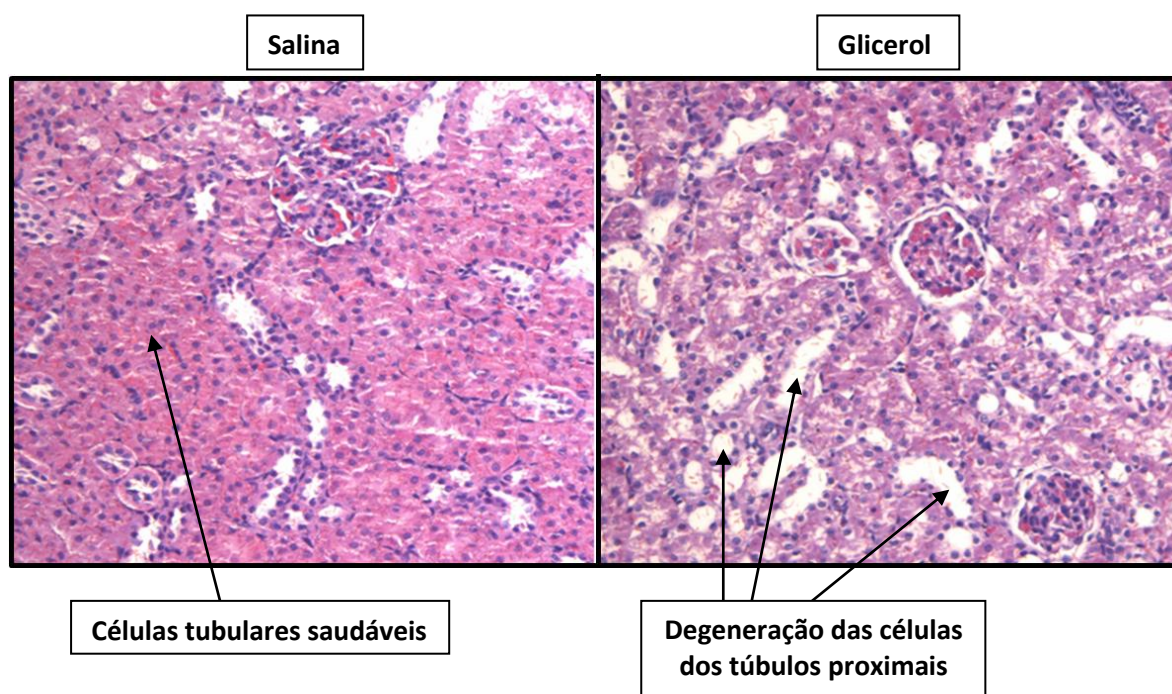
10. Hughes BP. *A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera.* Clin. Chim. Acta 1962; 7:597–603.
11. Leong SF, Lai JC, Lim L et al. *Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats.* J. Neurochem. 1981; 37:1548–56.
12. Kaplan A, Szabo LL, Opheim KE. *Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques.* Lea & Febiger, Philadelphia. 1988.
13. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.* Anal Biochem. 1979; 95:351–358.
14. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.* Chem. Res. Toxicol. 1992; 5:227-31.
15. Reznick AZ, Packer L. *Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay.* Methods Enzymol. 1990; 186:464-78.
16. Levine RL, Garland D, Oliver CN et al. *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.* Methods Enzymol. 1990; 186:464-78.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. 1951; 193:265–75.
18. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, 2007, Ch. 2.
19. Singh D, Chander V, Chopra K. *Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney.* Toxicol. 2004; 201:143-151.
20. Westenfelder C, Arevalo GJ, Crawford PW, et al. *Renal tubular function in glycerol-induced acute renal failure.* Kidney Int 1980; 18:432-444.

21. Zurovky Y, Eligal Z, Grossman S, et al. *Glycerol-induced augmentation of sensitivity to endotoxin in rats*. *Toxicol.* 1994; 32:17-26.
22. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, et al. *Protective effects of L-carnitine on myoglobinuric acute renal failure in rats*. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33:119-124.
23. Koufen P, Stark G. *Free radical induced inactivation of creatine kinase: sites of interaction, protection, and recovery*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1501:44–50.
24. Jones GD, Boswell TV, Lee J, et al. *A comparison of DNA damages produced under conditions of direct and indirect action of radiation*. *Int. J. Radiat. Biol.* 1994; 66:441-5.
25. Milligan JR, Ward JF. *Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals*. *Radiat. Res.* 1994; 137:295-9.

Capítulo II

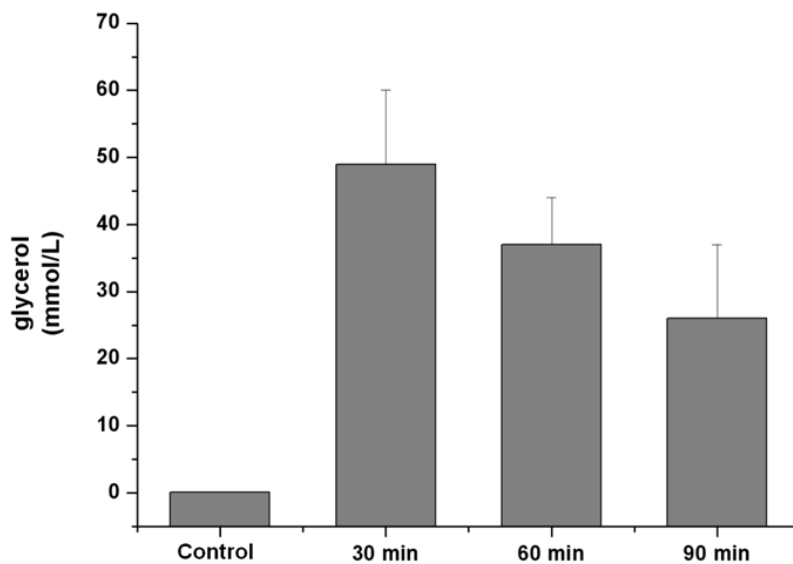
Figuras não incluídas no artigo

Figura 1: Histologia Renal. Fatias de rim coradas com hematoxilina e eosina. Imagens obtidas através de microscopia óptica comum, em aumento óptico de 200 vezes.



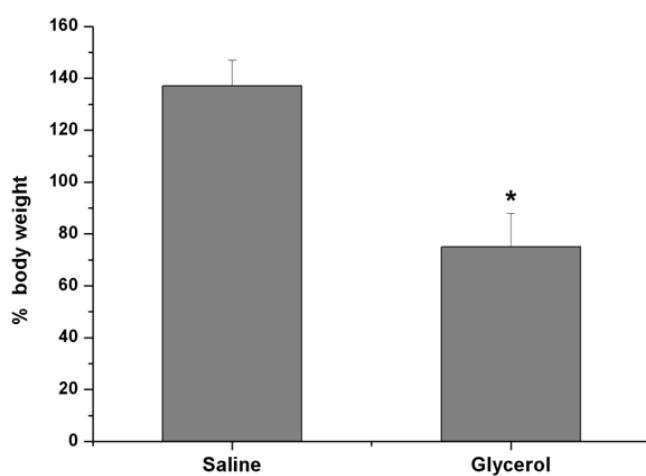
Conforme a figura acima, a administração prolongada de glicerol provocou dano renal principalmente nos túbulos proximais. Os túbulos renais apresentam degeneração hidrópica, vacuolização citoplasmática e necrose tubular aguda, sugerindo insuficiência renal.

Figura 2: Gráfico da curva de concentração de glicerol plasmático *versus* tempo de administração.



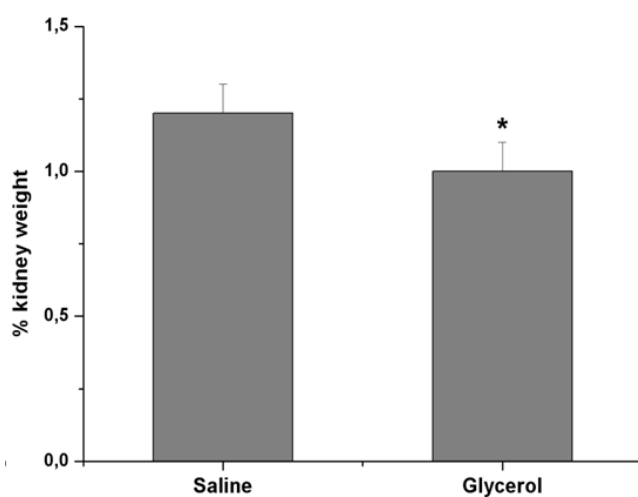
Os níveis plasmáticos de glicerol no grupo controle foram $0,08 \pm 0,01$ mmol/L. E após a administração de glicerol, os níveis plasmáticos encontrados foram: $49 \pm 1,1$ (30 min); $37 \pm 0,8$ (60 min) e $26 \pm 1,1$ (90 min) mmol/L. A meia-vida plasmática do glicerol foi em 60 min e os níveis retornaram ao normal após 240 min.

Figura 3: Gráfico da porcentagem de ganho de peso dos animais após a administração prolongada de glicerol.



A porcentagem de ganho de peso após o tratamento foi significativamente menor ($t_{(10)} = 9,65$; $p < 0,001$) no grupo glicerol (75 ± 13) do que no grupo salina (137 ± 10).

Figura 4: Gráfico da porcentagem de peso dos rins dos animais tratados com administração prolongada de glicerol.



O peso do rim foi significativamente menor ($t_{(10)} = 2,44$; $p < 0,05$) no grupo glicerol ($1 \pm 0,1$ g) comparado ao grupo salina ($1,2 \pm 0,1$ g).

Discussão

A determinação dos níveis plasmáticos de creatinina é um bom indicativo da integridade funcional do rim. Neste trabalho, os níveis de creatinina no plasma aumentaram significativamente após a administração prolongada de glicerol, isto indica que houve redução na taxa de filtração glomerular, sugerindo dano renal e insuficiência renal aguda.

A este achado soma-se o resultado da análise histológica dos rins, esta análise evidenciou uma lesão de grau moderado predominantemente na porção periférica dos túbulos proximais, esta lesão consiste em degeneração hidrópica, vacuolização do citoplasma e necrose tubular. E os glomérulos renais não apresentaram alteração, apenas uma leve congestão capilar. Este achado corrobora com Silbernagl e Lang (2006), no qual as células dos túbulos renais são muito mais suscetíveis ao dano devido a seu alto metabolismo. E o que caracteriza a insuficiência renal é a presença de necrose tubular, geralmente ocasionada por hipoperfusão renal, nefrotoxinas endógenas e exógenas e por estresse oxidativo; a mioglobina é uma dessas nefrotoxinas e uma das responsáveis pela IRA induzida por rabdomiólise. No entanto, este trabalho não teve a participação da mioglobina, resultado este, que foi confirmado através da detecção dos níveis normais da atividade da CK plasmática (indicadora de lesão muscular), e da ausência de cristais de hemoglobina na histologia renal, sugerindo então que o glicerol possa ser um agente tóxico ao rim.

O peso dos rins e o peso dos animais tratados com glicerol foram significativamente menores que o peso dos animais controle e de seus rins, essa redução no tecido renal funcional é um indicativo de insuficiência renal crônica (destruição de néfrons), que prejudica as tarefas metabólicas e funcionais do rim.

Os túbulos renais são um importante local de produção de glicose, e fornecimento de energia para outras células e tecidos (Silbernagl e Lang, 2006) e um dano sofrido por estas células pode prejudicar o metabolismo da glicose e a produção de ATP. Essa alteração no metabolismo foi evidenciada através da redução na taxa de oxidação da glicose e por alterações nas atividades das enzimas creatina cinase e piruvato cinase, que são importantes enzimas do metabolismo energético.

A CK encontra-se em tecidos com alto consumo energético e catalisa a transferência reversível de um grupo fosfato da fosfocreatina ao ADP regenerando o ATP e formando creatina. A CK está compartimentalizada em locais onde a energia é produzida (mitocôndria) ou utilizada (citossol). A atividade da enzima CK no citossol e na mitocôndria reduziu significativamente nos ratos que receberam administração prolongada de glicerol. Isto ocorreu possivelmente devido à suscetibilidade da CK a oxidação por radicais livres. Os radicais livres atacam o grupamento sulfidril da enzima, e dentre eles, o radical ONOO⁻ é bastante reativo, e leva a inativação da atividade da CK com mais eficiência que o radical superóxido (Wallimann et al., 1992; Halliwell e Gutteridge, 2007).

A PK exerce uma função crucial no metabolismo da glicose, e no rim é a principal via que fornece energia através da fosforilação de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) ao ADP, gerando ATP e piruvato (Hall e Cottam, 1978). A atividade da PK, ao contrário da CK, aumentou nos ratos tratados com glicerol. No entanto, este resultado diverge dos nossos achados anteriores, nos quais as atividades das duas enzimas, CK e PK, foram reduzidas pela administração de uma única dose de glicerol (Rieger et al., 2008). Portanto, este aumento na atividade da PK pode ter ocorrido em resposta ao déficit prolongado de energia sofrido pelas células renais, como um mecanismo de compensação para elevar os níveis de ATP na célula. Contudo, este

mecanismo não conseguiu normalizar a liberação de energia a partir da glicólise, pois o consumo de glicose pelo rim também foi reduzido.

O déficit de energia no rim pode culminar na morte das células tubulares, pois causa a inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, redução na reabsorção de eletrólitos e edema celular. Isso leva a desestruturação do citoesqueleto, perda da polaridade celular, produção de radicais livres, alterações no pH intracelular e vasoconstrição pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular e pela liberação de adenosina do ATP (Silbernagl e Lang, 2006).

As atividades da LDH plasmática e renal também foram determinadas. A LDH é uma enzima que catalisa a interconversão de piruvato/NADH e lactato/ NAD^+ , está localizada no citosol da célula, sendo assim, a dosagem de seu nível plasmático é usada como marcador de dano à membrana plasmática da célula. Porém, a LDH também pode ser usada para detectar ânions superóxidos, o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode interagir com o NADH ligado ao sítio ativo da enzima e formar um radical NAD^{\cdot} , levando à inibição da enzima (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nos animais tratados com o glicerol durante 14 dias consecutivos, a atividade da LDH plasmática reduziu significativamente, e a atividade da LDH no rim não sofreu alteração, desse modo é possível que a diminuição na atividade plasmática da enzima seja devido à formação de radicais livres, principalmente pelo radical superóxido.

A presença de radicais livres que podem causar efeitos diretos e indiretos na atividade de enzimas, na concentração celular de ATP e às células dos túbulos renais, foi detectada através da oxidação do DCFH, níveis de malondialdeído e pela carbonilação de proteínas. Os resultados evidenciaram que a administração prolongada de glicerol, assim como uma única administração de glicerol (Rieger et al., 2008), levou ao aumento na geração de radicais livres e provocou danos em lipídios e proteínas.

O radical HO[•] é o maior responsável pelos efeitos indiretos a molécula de DNA e os “scavengers”, por sua vez, protegem o DNA ao reagirem com o radical HO[•]. Essa reação produz radicais secundários, que são não-reativos ou que reagem rapidamente com o oxigênio formando radicais peroxila não reativos; no entanto, na ausência de oxigênio alguns radicais secundários podem produzir dano ao DNA (Milligan e Ward, 1994). Assim, a molécula de glicerol pode atuar como um “scavenger” de radicais hidroxila, podendo produzir um radical secundário derivado de radicais livres que vai provocar a quebra na fita dupla do DNA, danificando a molécula e provocando a morte celular (Ayene et al., 1995; Jones, 1994).

O glicerol também pode interferir no metabolismo da glicose. Segundo Wapnir e Stiel (1985) o glicerol e seus intermediários, G3P e DHAP, inibem a gliconeogênese hepática *in vitro*. O G3P e a DHAP inibem a frutose 1,6-bisfosfatase (FBPase), a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a glicose 6-fosfatase (G6Pase) e o glicerol inibe a FBPase e a PEPCK. Portanto, sendo os túbulos renais o segundo maior produtor de gliconeogênese, é possível que este efeito do glicerol também ocorra no rim, reduzindo a disponibilidade de glicose para suas funções metabólicas.

A administração intraperitoneal de glicerol em ratos, seja em uma única dose (Rieger et al., 2008) ou em doses diárias durante 14 dias, resultou em injúria renal e IRA sem a ocorrência de rabdomiólise. Mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo de toxicidade do glicerol, porém alguns autores fizeram suas teorias, segundo Finckh (1959), o glicerol por si mesmo não é tóxico ao epitélio tubular e a hemoglobinúria per se também não causa insuficiência renal aguda em ratos, então Finckh sugere que o agente causador do dano renal é produzido ou liberado pela ação local do glicerol no tecido conjuntivo ou em outros tecidos. Para Carrol et al (1965), o glicerol predispõem o desenvolvimento de necrose tubular aguda pela combinação de

hemoglobinúria e isquemia renal, mas estes fatores não foram percebidos em nosso trabalho. Deichmann (1940) sugeriu que os efeitos nocivos do glicerol ocorrem provavelmente devido a distúrbios osmóticos e severa desidratação, que pela toxicidade da molécula de glicerol.

Portanto, através dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a administração intraperitoneal de glicerol provoca injúria renal, lesionando principalmente as células dos túbulos proximais. E segundo a literatura, as administrações subcutânea e intravenosa de glicerol também causam injúria renal. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual o glicerol administrado intraperitonealmente provoca injúria e insuficiência renal.

Conclusões

O glicerol é um composto orgânico e possui propriedade osmótica; devido a esta característica ele é utilizado para o tratamento da hipertensão intracraniana, glaucoma e edema cerebral, sendo também ingerido por atletas que querem manter a hidratação corpórea durante o exercício. O glicerol também é usado experimentalmente para induzir insuficiência renal aguda através da rabdomiólise.

Em um trabalho anterior, demonstramos que uma única administração intraperitoneal de glicerol provocou insuficiência renal aguda por mecanismos independentes da rabdomiólise. No presente trabalho investigamos o efeito da administração prolongada de glicerol sobre o rim de ratos jovens e de acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- 1- Houve o aumento dos níveis de creatinina plasmática ocasionada pela redução da taxa de filtração glomerular no rim, sugerindo dano renal e insuficiência renal aguda;
- 2- Ocorreu déficit energético devido a redução na atividade da creatina cinase, uma enzima importante para o fornecimento de energia na célula;
- 3- Houve a indução de estresse oxidativo com a produção de radicais livres, peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas;
- 4- Ocorreu redução do consumo de glicose pelo rim, contribuindo para o déficit energético e morte celular;
- 5- E a exposição prolongada do rim ao glicerol provocou dano estrutural aos túbulos renais, que apresentaram degeneração hidrópica, vacuolização do citoplasma e necrose.

O estresse oxidativo, a alteração na homeostasia energética e no metabolismo da glicose são fatores implicados na injúria renal provocada pela administração intraperitoneal de glicerol. Os resultados indicam que o glicerol é um agente tóxico ao rim, porém os mecanismos responsáveis pela injúria renal não estão completamente elucidados. Portanto, sugere-se o monitoramento da função renal e cautela para as pessoas que fazem o uso prolongado de glicerol.

Perspectivas

1. Investigar os efeitos da administração de glicerol sobre outros parâmetros de estresse oxidativo no rim, como a capacidade antioxidante total do tecido (TRAP), reatividade antioxidante total (TAR), quimiluminescência e conteúdo de GSH/GSSG.
2. Investigar os efeitos da administração de glicerol sobre a atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e glutathione peroxidase (GPx).
3. Investigar os efeitos da administração de glicerol sobre a atividade da Na^+/K^+ -ATPase em rim de ratos tratados.
4. Investigar os efeitos da administração de glicerol sobre parâmetros estruturais e bioquímicos em cérebro de ratos.

Referências Bibliográficas

Ayene IS, Koch CJ, Krisch RE. Role of scavenger-derived radicals in the induction of double-strand and single-strand breaks in irradiated DNA. *Radiat Res.* 1995, 142:133-43.

Aydogdu N, et al. Protective effects of L-carnitine on myoglobinuric acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 119-124.

Barreiros ALB; David JR; David JP. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim. Nova* 2006; 29:113-123.

Barros, et al. *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento*. 3 edição Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.

Berllet BS, and Stadtman ER. Minireview: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Am Soc Biochem Mol Biol* 1997; 272: 20313-20316.

Brisson D, et al. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *BioEssays* 2001; 23: 534-542

Campbell JAH. Intracranial hemorrhage in mice receiving injections of glycerol. *J Path Bact* 1959, 77:123-130.

Carrol R, Kovacs K and Tapp E. The pathogenesis of glycerol-induced renal tubular necrosis. *J Path Bact* 1965, 89:573.

CAS (Chemical Abstracts Service). Glycerol, CAS number: 56-81-5
<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/56815.pdf> acessado em junho de 2009.

Chander V and Chopra K. Protective effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. *Ren Fail* 2006; 28: 161-169.

Chander V, Singh D, Chopra K. Attenuation of glycerol-induced acute renal failure in rats by trimetazidine and deferoxamine. *Pharmacology* 2003; 67: 41-48.

Deichmann W. Glycerol. *Industr Med* 1940, 1:60

Finckh ES. The indirect action of subcutaneous injections of glycerol in the renal tubules in the rats. *J Path Bact* 1959, 78:197-202. Guis S., et al. Pathophysiology and clinical presentations of rhabdomyolysis. *Joint Bone Spine* 2005, 72:382-391.

Hall ER and Cottam GL. Isoenzymes of pyruvate kinase in vertebrates: Their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int J Biochem* 1978, 9:785-793.

Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

Hara-Chikuma M and Verkman AS. Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63:1386-1392.

Hine C. Comparative toxicity of synthetic and natural glycerin. *Arch Ind Hyg Occup Med* 1953, 7:282-291.

Jones GD, et al. A comparison of DNA damages produced under conditions of direct and indirect action of radiation. *Int J Radiat Biol* 1994, 66:441-445.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992, 5:227-231.

Lieberthal W and Nigam SK. Acute renal failure II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Ren Physiol* 2000; 278:1-12.

Lin ECC. Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Ann Rev Biochem* 1977; 46: 765-795.

Kumana CR, et al. Investigation of intravascular haemolysis during treatment of acute stroke with intravenous glycerol. *Br J Clin Pharmacol* 1990, 29:347-353.

Meyer JS, et al. Effect of Intravenous Infusion of Glycerol on Hemispheric Blood Flow and Metabolism in Patients with Acute Cerebral Infarction. *Stroke* 1972, 3:168-180.

McCabe ERB. Disorders of Glycerol Metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D, ed. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed, McGraw-Hill, Inc., New York; 2001. pp. 2217-2237.

Milligan JR and Ward JF. Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiat Res* 1994; 137:295-299.

Nelson JL and Robergs RA. Exploring the potential ergogenic effects of glycerol hyperhydration. *Sports Med* 2007, 37:981-1000.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95:351–358.

Oken DE, et al. Glycerol induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat. I. Micropuncture study of the development of oliguria. *Journal of Clinical Investigation* 1966, 45:724-735.

Reznick AZ and Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994, 233: 357–363.

Rieger E, et al. Intraperitoneal glycerol induces oxidative stress in rat kidney. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2008; 35:928-33.

Rosenberger C, et al. Evidence for sustained renal hypoxia and transient hypoxia adaptation in experimental rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2008, 23:1135-1143.

Roudier N, et al. Evidence for the Presence of Aquaporin-3 in Human Red Blood Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 14:8407-8412.

Shah SV and Walker PD. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 1988; 255:438-443.

Sloviter HA. Effects of the intravenous administration of glycerol solutions to animals and man. *J Clin Invest* 1958, 37:619.

Silbernagl S and Lang F. *Fisiopatologia - Texto e Atlas*. Tradução Edison Capp, Ilma SB da Silva Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.

Singh D, Chander V, Chopra K. Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. *Toxicology* 2004, 201:143-151.

Wallimann T, et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 1992, 281:21-40.

Wang JY and Cheng JL. Glycerol dehydrates oedematous as well as normal brain in dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994, 21:263-270.

Wapnir RA and Stiel L. Regulation of gluconeogenesis by glycerol and its phosphorylated derivatives. *Biochem Med* 1985, 33:141-148.

Wirthensohn G, Vandewallet A. and Guder W.G. Renal glycerol metabolism and the distribution of glycerol kinase in rabbit Nephron *Biochem J* 1981, 198, 543-549.

Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney International* 1996, 49:314-326.