

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES
DA ENTRECASCA DE *Schinus terebinthifolius*

JONES HENRIQUE DE MELO PIMENTEL

RECIFE
2016

JONES HENRIQUE DE MELO PIMENTEL

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES DA
ENTRECASCA DE *Schinus terebinthifolius*

ORIENTADORA: Profa. Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

RECIFE
2016

JONES HENRIQUE DE MELO PIMENTEL

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES DA
ENTRECASCA DE *Schinus terebinthifolius*

Dissertação apresentada para
o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (Titular Interno)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Titular Interno)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof. Dr. Roberto Araújo Sá (Titular Externo)
(Centro Acadêmico do Agreste/Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Suplente Interno)
(Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFPE)

Dra. Nataly Diniz de Lima Santos (Suplente Externo)
(Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFPE)

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

PIMENTEL, JONES HENRIQUE DE MELO.

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES DA
ENTRECASCA DE *Schinus terebinthifolius* / JONES HENRIQUE DE MELO
PIMENTEL. - Recife, 2016.

50 : il., tab.

Orientador(a): PATRICIA MARIA GUEDES PAIVA

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2016.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
MOLÉCULAS BIOATIVAS E NANOTECNOLOGIA.. I. PAIVA, PATRICIA
MARIA GUEDES. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

DEDICATÓRIA

A minha mãe MARIA HENRIQUE DE MELO
PIMENTEL por ter me dado força e ter
acreditado em mim mais do que a mim mesmo.
Em tudo dedico, única e exclusivamente a ela,
o amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a **PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA**, minha orientadora, por ter acreditado em mim e me auxiliado na construção e conclusão deste trabalho e em todos momentos difíceis com conduta ética.

A Prof.^a Dr.^a Ana Durce Oliveira da Paixão, pelo papel de educadora e pessoa inspiradora dotada de conhecimento.

Ao Prof.^o Dr.^o Leucio Duarte Filho pelo acolhimento no laboratório e pela ajuda na elaboração deste trabalho.

A todos os integrantes do laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Renal, que contribuíram de todas as formas.

A Regina Souza Aires pela sua competência e por ter sido essencial no meu desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos Fabia Daniele, Stephany Metódio e Wedna Juliane por me instigarem e por terem me dado asas para chegar onde estou.

A minha família, pela forma de mostrar a seguir o caminho certo.

A Alex Jose da Silva, por trazer paz e por ser um rapaz de ouro.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de Mestrado

RESUMO

As plantas contêm metabólitos secundários capazes de induzir respostas biológicas em células de plantas e animais. *Schinus terebinthifolius* Raddi. é uma árvore que está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, sendo a sua casca, folhas e frutos utilizados na medicina popular como anti-inflamatório, antitérmico, analgésico, cicatrizante e como reparador tecidual de feridas cutâneas. A doença renal crônica (DRC) é uma condição clínica comum, relacionada com insuficiência renal e complicações cardiovasculares. A dissertação relata o efeito de metabólitos secundários da entrecasca de *S. terebinthifolius* em modelo de estresse oxidativo renal. Extrato metanólico da entrecasca e ratos Wistar machos de aproximadamente 90 dias pesando entre 250-300g foram utilizados no estudo e a indução da lesão renal foi realizada pelo modelo de obstrução ureteral unilateral (OUU). Os quatro grupos experimentais analisados foram 1) Sham, animais com ureter esquerdo exposto, sem realização da OUU e sacrificados 14 dias após a cirurgia; 2) OUU, animais foram submetidos à OUU sem tratamento e sacrificados após 14 dias; 3) OUU + Extrato, animais submetidos à OUU e após 24 h receberam dose diária do extrato (100mg/kg, v.o.) por gavagem durante 14 dias e em seguida sacrificados; 4) OUU + Enalapril, animais submetidos à OUU e após 24 horas receberam doses diárias de enalapril (10mg/kg, v.o.) por via oral durante 14 dias e em seguida sacrificados. Antes do procedimento cirúrgico (dia 0) foram determinados consumo hídrico, dietético, diurese e cálculo do *clearance* de creatinina. A dosagem dos marcadores de função renal, pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foram determinadas no dia 0 e 14 dias após a OUU. Após 14 dias os animais foram eutanasiados e os tecidos renal e hepático coletados para determinação de marcadores de estresse oxidativo (TBARS e GSH). Durante o período experimental sobrevida de 100% foi detectada em todos os grupos e o *clearance* de creatinina, creatinina sérica, ureia, PAS e FC antes da cirurgia foram similares entre os grupos. Insuficiência renal aguda foi detectada após 7 dias da cirurgia pela diminuição da filtração glomerular e o quadro foi revertido após 14 dias. Após 7 dias, os níveis de creatinina sérica e ureia aumentou nos grupos submetidos a obstrução ureteral. Após 14 dias, os animais do grupo OUU mostraram níveis normais de creatinina sérica e ureia e PAS e FC elevados, os do grupo OUU + Extrato mostraram níveis normais de ureia e PAS e FC elevados, enquanto que naqueles do grupo OUU + Enalapril, a creatinina sérica e ureia estavam elevadas e PAS e FC normais. Os animais submetidos à OUU apresentaram uma elevação da peroxidação lipídica, paralelamente a uma diminuição dos níveis de glutathione reduzida (GSH) comparados ao grupo Sham. A peroxidação lipídica hepática não foi afetada pela OUU, contudo, o procedimento induziu uma diminuição dos níveis de GSH. O tratamento dos animais com o extrato preveniu todas as alterações nos níveis de peroxidação lipídica e GSH induzidas pela OUU. O efeito do extrato foi semelhante ao induzido pelo tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina, o enalapril. O tratamento com enalapril elevou a peroxidação lipídica hepática o que pode ser uma consequência do metabolismo hepático da droga, fato não observado com os animais tratados com o extrato.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, função renal, obstrução ureteral unilateral.

ABSTRACT

Plants contain secondary metabolites capable of inducing biological responses in both plant and animal cells. *Schinus terebinthifolius* Raddi is a tree included in the National List of Medicinal Plants of Interest to the Brazilian Unified Health System (SUS), and its bark, leaves, and fruits are traditionally used in folk medicine as anti-inflammatory, antipyretic, analgesic, healing, and tissue-repairing agents for skin wounds. Chronic kidney disease (CKD) is a common clinical condition related to renal failure and cardiovascular complications. This dissertation reports the effect of secondary metabolites from the inner bark of *S. terebinthifolius* in a renal oxidative stress model. A methanolic extract of the inner bark and male Wistar rats, approximately 90 days old and weighing between 250–300 g, were used in the study, and renal injury was induced by the unilateral ureteral obstruction (UUO) model. The four experimental groups analyzed were: (1) Sham, animals with the left ureter exposed but without UUO, sacrificed 14 days after surgery; (2) UUO, animals subjected to UUO without treatment, sacrificed after 14 days; (3) UUO + Extract, animals subjected to UUO and, after 24 hours, treated daily with the extract (100 mg/kg, orally) for 14 days; and (4) UUO + Enalapril, animals subjected to UUO and, after 24 hours, treated daily with enalapril (10 mg/kg, orally) for 14 days. Before surgery (day 0), water and food intake, diuresis, and creatinine clearance were determined. Renal function markers, systolic blood pressure (SBP), and heart rate (HR) were measured on day 0 and 14 days after UUO. After 14 days, the animals were euthanized, and renal and hepatic tissues were collected to determine oxidative stress markers (TBARS and GSH). During the experimental period, 100% survival was observed in all groups, and creatinine clearance, serum creatinine, urea, SBP, and HR before surgery were similar among groups. Acute renal failure was detected seven days after surgery due to decreased glomerular filtration, which was reversed after 14 days. After seven days, serum creatinine and urea levels increased in the groups subjected to ureteral obstruction. After 14 days, animals in the UUO group showed normal serum creatinine and urea levels but elevated SBP and HR; animals in the UUO + Extract group showed normal urea levels and elevated SBP and HR, while those in the UUO + Enalapril group had elevated serum creatinine and urea but normal SBP and HR. Animals subjected to UUO exhibited increased lipid peroxidation and decreased reduced glutathione (GSH) levels compared to the Sham group. Hepatic lipid peroxidation was not affected by UUO, although the procedure induced a decrease in hepatic GSH levels. Treatment with the extract prevented all changes in lipid peroxidation and GSH levels induced by UUO. The extract's effect was similar to that of enalapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor. However, enalapril treatment increased hepatic lipid peroxidation, likely due to hepatic metabolism of the drug, a fact not observed in animals treated with the extract.

Keywords: Secondary metabolites, renal function, unilateral ureteral obstruction.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

FIGURA 1. FLUXOGRAMA DAS ETIOLOGIAS NA LESÃO RENAL AGUDA.

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DAS VIAS URINÁRIAS COM OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL E DESFECHOS RENAIIS.

FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DA OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL PERMANENTE EM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL.

FIGURA 4. DESEQUILÍBRIO ENTRE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.

FIGURA 5. VIA DE SINALIZAÇÃO DA ANGIOTENSINA II NA FORMAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.

ARTIGO

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA SEGUNDO O CRITÉRIO DE RIFLE.

1. INTRODUÇÃO

A doença renal é uma condição de saúde pública muito mais frequente do que se esperava e seu desfecho clínico está associado a altas taxas de mortalidade (DOQI, 2002). No Brasil, o prognóstico de falência funcional renal ainda é ruim, sua incidência vem aumentando de forma alarmante acompanhada pelo aumento na expectativa de vida e a prevalências de outras doenças crônico-degenerativas de base, acarretando em altos gastos com o tratamento da doença (SESSO, 2008).

Espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo normal celular como o anion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, com importância fundamental na sinalização celular (SIMON *et al.*, 1998; UTTARA *et al.*, 2009). Contudo, a lesão renal estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) de forma exacerbada e causa estresse oxidativo renal, inflamação, elevação da peroxidação lipídica e redução na atividade das enzimas antioxidantes, caracterizado pelo desequilíbrio REDOX (YAMAN & BALIKCI, 2010; BAE *et al.*, 2014). A fibrose renal é comumente acompanhada de perda irreversível do parênquima e a longo prazo leva ao estágio final da falha renal através do acúmulo de matrix extracelular, proliferação de fibroblastos, infiltração de células inflamatórias e consequente atrofia, seguido de apoptose e necrose (NIELSON, 2006; PSIHOGIOS, 2008).

A obstrução ureteral unilateral (OUU) é um modelo experimental bem caracterizado pelo quadro de dilatação tubular acompanhado por hidronefrose e fibrose tubulointersticial (MEI *et al.*, 2016), além de distúrbios hidreletrolíticos que se torna o maior fator na fisiopatologia da progressão de nefropatias obstrutivas crônicas (LI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012).

A aplicação de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças tem sido demonstrada em diversos estudos nas últimas décadas no Brasil, tendo em vista a sua larga diversidade de reserva florestal (COUTINHO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). Porém, muitas espécies são usadas para fins medicinais com baixa ou nenhuma evidência terapêutica (VEIGA, 2005). O interesse na descoberta de novas moléculas bioativas encoraja os cientistas a

procurar compostos com propriedades medicinais na flora normalmente usada pela população (MALAFAIA, 2006). Estudos com a planta *Schinus terebinthifolius* têm comprovado efeito mutagênico, antibiótico, antioxidante, antiulceroso e fungicida (NUNES *et al.*, 2006; CARNILI *et al.*, 2010). Este estudo investigou o efeito do extrato metanólico da entrecasca de *Schinus terebinthifolius* no tecido renal em modelo animal de lesão renal. Adicionalmente, a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico foi determinada.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Insuficiência renal e obstrução ureteral unilateral (OUU)

A alta taxa de mortalidade e aumento na incidência de evolução de lesão renal para cronicidade vem alarmando a comunidade científica nas últimas décadas (BASTOS *et al.*, 2004). No Brasil, estes níveis vêm aumentando a cada ano e o aumento na expectativa de vida bem como o grande crescimento no número de casos de doenças crônico-degenerativas como a hipertensão e o diabetes pode explicar, em parte, tal desfecho (MATHEW; CORSO, 2009).

Os rins constituem um sistema responsável por filtrar o sangue do organismo, eliminando metabólitos e o excesso de líquido, além do papel de regular o balanço eletrolítico e a produção de alguns hormônios como a eritropoietina e a forma ativa da vitamina D (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2016). Quando os rins perdem a sua função como órgão regulatório e endócrino, caracteriza-se a insuficiência renal, a qual pode ser aguda ou crônica. A insuficiência renal aguda (IRA) é delimitada por perda da função de forma abrupta no decorrer de horas a dias, provocando acúmulo de substâncias nitrogenadas (principalmente uréia e creatinina) marcado pelo quadro de azotemia, acompanhada ou não pela diminuição da diurese (COSTA *et al.*, 2003). Apesar de súbita, a IRA, se diagnosticada e tratada a tempo, é reversível, com chances de recuperação sem alterações drásticas em outros órgãos (SBN, 2016).

Tabela 1: Classificação da IRA segundo o critério de RIFLE:

Estágios	Creatinina sérica	Diurese
Estágio 1	Aumento de 150-200% o valor basal	< 0,5mL/kg/h por 6 horas
Estágio 2	Aumento de 200-300% o valor basal	< 0,5mL/kg/h por mais de 12 horas
Estágio 3	Aumento acima de 300% o valor basal	< 0,3 mL/kg/h por 24 horas ou anúria por 12 horas

TABELA 1: A inclusão de um dos critérios pode ser utilizada na categorização do estágio da IRA. Pacientes em programa de diálise, independente dos níveis de creatinina sérica ou diurese, são considerados pacientes de estágio 3.

A figura 1 demonstra as etiologias da lesão renal aguda segundo Hugh *et al.* (2002).

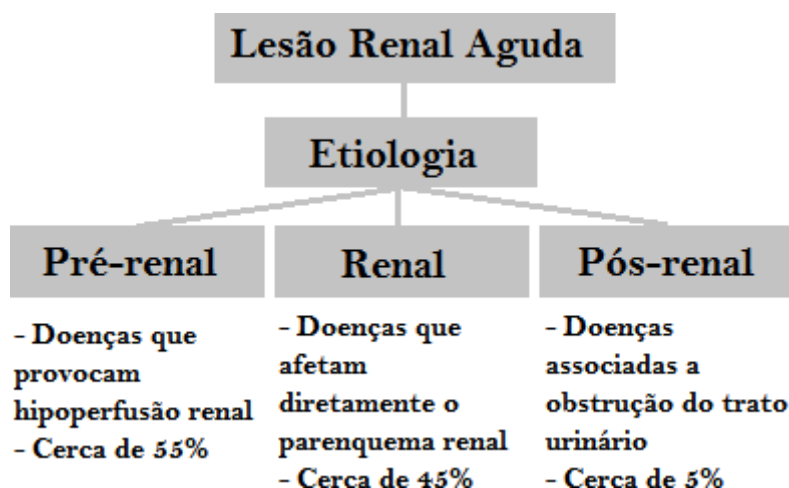


FIGURA 1: Fluxograma das etiologias na lesão renal aguda – LRA.

Em paralelo, a insuficiência renal crônica é definida por perda progressiva e lenta da função renal, irreversível, com consequente desequilíbrio eletrolítico e hemodinâmico permanente (MARQUES *et al.*, 2005; CHERCHIGLIA *et al.*, 2006; ROMÃO Jr, 2007; PERES *et al.*, 2010).

A doença renal está intimamente relacionada à hipertensão. Contudo, é sabido que a doença renal leva a hipertensão (FRANCO, 2002; RITZ *et al.*, 2003). Portanto, a hipertensão associada a dano renal pode assumir tanto a causa de doença de base quanto ser complicação desta. No Brasil, estudos apontam que nefropatias hipertensivas é a principal causa em pacientes que entraram em programas de diálise (CHERCHIGLIA *et al.*, 2010). Uma vez instalada a doença renal progressiva, um conjunto de complicações e morbidade contribuem para deterioração do tecido renal como proteinúria persistente, dislipidemia, anemia, doença cardiovascular, entre outros (EL NAHAS & BELLO, 2005; WARADY & CHADHA, 2009). Kirsztajn e Bastos (2007) corroboram ao reconhecer que o portador de doença renal crônica não possui apenas desfechos renais, este possui uma chance aumentada de

necessitar de uma terapia renal substitutiva, como também apresentam alto risco para mortalidade decorrente de eventos cardiovasculares.

A obstrução urinária (Figura 2) tem por definição a interrupção do fluxo urinário, podendo ocorrer em qualquer porção do trato urinário acarretando parada da filtração glomerular (COWGILL, 2003).

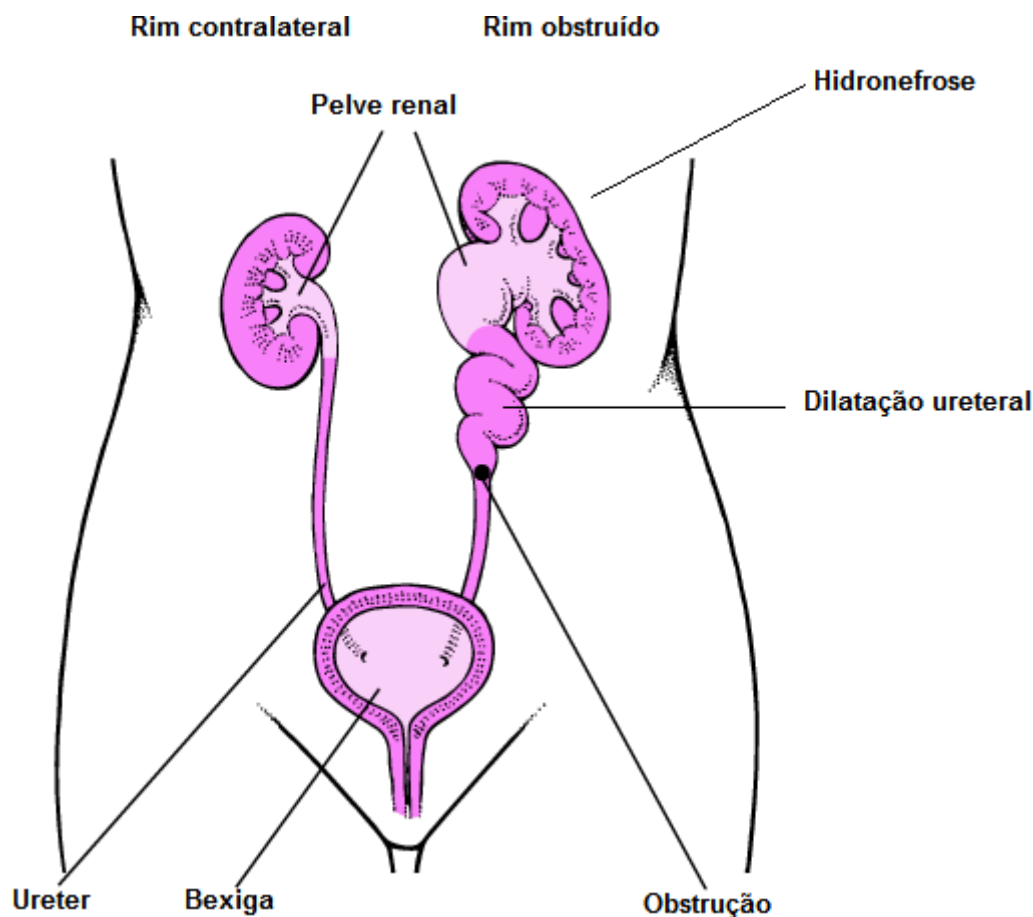


FIGURA 2: Perturbações do rim e das vias urinárias representado pela obstrução ureteral unilateral (OUU) levando a hidronefrose. Imagem modificada por www.manuaismsd.pt.

Nefropatia obstrutiva é a maior causa de falha renal que envolve obstrução no trato urinário e dilatação tubular, acarretando ativação intra-renal do sistema renina-angiotensina, apoptose tubular e infiltração de macrófagos (PAN *et al.*, 2015) e induzindo excesso de deposição de matriz extracelular em resposta a citocinas (MA *et al.*, 2003; HWANG *et al.*, 2006).

Na literatura, o modelo de obstrução ureteral unilateral (OUU) em ratos (Figura 3) tem sido largamente utilizado para estudar mecanismos moleculares

e alvos terapêuticos na doença renal (BASCANDS & SCHANSTRA, 2005; NAGAE *et al.*, 2008; CHEVALIER *et al.*, 2009).

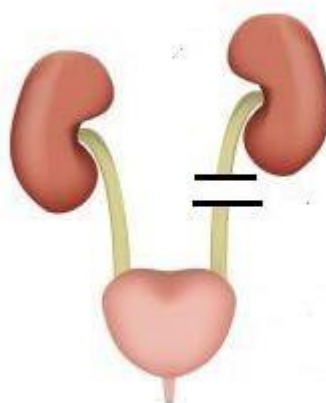


FIGURA 3: Representação da obstrução ureteral unilateral permanente em modelo animal pela ligadura da porção média do ureter com uma distância de aproximadamente 2 cm entre os nós. Imagem modificada por <http://www.tuasauade.com/rim-inchado/>.

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) constitui uma importante via de sinalização na progressão da doença renal (LIU, 2010) que representa uma perda no epitélio celular e moléculas de adesão como E-caderina, e aumento nos marcadores de células mesenquimais como α -smooth de músculo liso (ZEISBERG & DUFFIELD, 2010). A fibrose renal pode ser decorrente de vários fatores patológicos que incluem toxicidade, isquemia, infecções por microrganismos, doenças imunológicas ou endócrinas e, principalmente, obstrução (EDDY, 2014). Muitos estudos têm mostrado que a ativação desregulada do sistema renina-angiotensina está envolvido na fibrose renal em várias condições de doenças renais (WOLF, 2006; LUI *et al.*, 2012).

2.2 Marcadores de estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ROS) normalmente são produzidas pelo metabolismo celular aeróbico e o seu excesso pode acabar lesionando diversas estruturas teciduais (JONES, 2006). A concentração de ROS e a limitação da peroxidação lipídica é mantida em equilíbrio por meio de defesas antioxidantes incluindo a superóxido dismutase (SOD) e catalase que bloqueiam a peroxidação (BROWN, 2008). A peroxidação de lipídios induzida por radicais livres é uma das mais causas de lesão celular, danificando as suas

membranas de forma irreversível (KAROWICK-BILINSKA *et al.*, 2002), além de induzir mecanismos isquemia-reperfusão, ativação de neutrófilos e macrófagos, metabolismo das prostaglandinas, entre outros (SHOJI & KOLETZKO, 2007).

Nos rins, os radicais mais importantes quando há um desequilíbrio entre produção, principalmente através da NADPH oxidase (HÜIMIN *et al.*, 2000), e degradação são o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) (HASANOGLU *et al.*, 1994). A lesão renal está relacionada à produção de ROS decorrente do estresse oxidativo, o que confere um desequilíbrio (Figura 4) entre as concentrações de substâncias pró e antioxidantes (PEREIRA, 2006). Rysz *et al.* (2004) defendem que a uremia decorrente da lesão renal favorece a produção leucocitária de H_2O_2 via NADPH oxidase nos neutrófilos e diminui a atividade da enzima glutatona, exacerbando o estresse oxidativo. Pesquisas comprovam que drogas com atividade antioxidante contribuem para redução significativa de doenças crônico-degenerativas (PAULA JR *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007; LIMA, 2008; GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010).

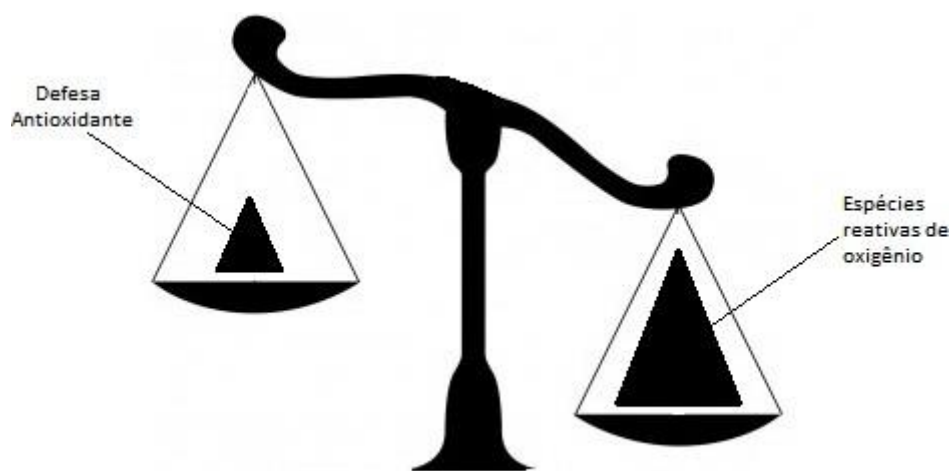


FIGURA 4: O desequilíbrio entre produção e defesa antioxidante caracterizado no estresse oxidativo leva ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio que reage com DNA, proteínas e principalmente lipídios, induzindo alterações funcionais e estruturais na célula.

A angiotensina II através da via clássica de sinalização do receptor da angiotensina do tipo 1 – AT1R (Figura 5) mediada pela proteína Gq que desencadeia a liberação de Ca^{2+} e estimulação dos sistemas mediados pela

proteína kinase C – PCK (BOOZ *et al.*, 1994) leva a ativação da NADPH oxidase, produzindo mais espécies reativas de oxigênio (MEHTA & GRIENDLING, 2007).

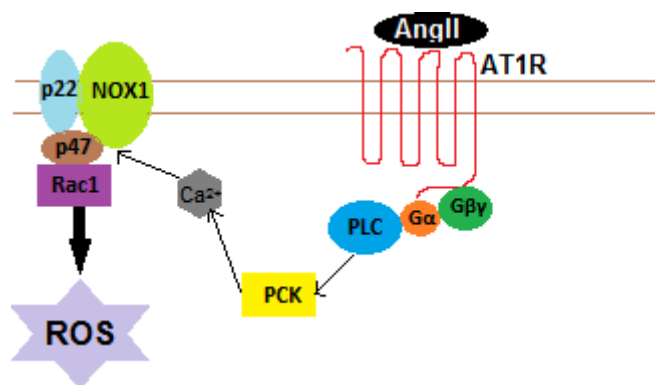


FIGURA 5: Representação esquemática da via de sinalização da formação de espécies reativas de oxigênio relacionada a angiotensina II – AngII.

Diversos autores defendem que o estresse oxidativo é uma causa potencialmente presente no aumento dos riscos de mortalidade em pacientes com lesão renal, o que predispõe a múltiplas complicações como as cardiovasculares, pois está envolvido na fisiopatologia da hipertensão arterial, disfunção endotelial e inflamação (ZAFARULLAH *et al.*, 2003; BERNABEU *et al.*, 2004; SHIMIZU, 2005; SCOTT, 2008).

A atividade antioxidante de compostos bioativos pode ser determinada *in vivo* e *in vitro*, avaliando o seu potencial antioxidante e determinando seus efeitos biológicos (ROGINSKY & LISSI, 2004). Dentro os métodos espectrofotométricos *in vitro* mais utilizados estão o ensaio do DPPH radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e o método ABTS (2-2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfurônico) (ROBARDS, 2003).

O ensaio por DPPH é simples, prático e possui boa confiabilidade nos resultados (ARNAO, 2000; LLESUY *et al.*, 2001). No ensaio por ABTS, na presença de oxidantes capazes de doarem oxigênio, a mensuração da redução pode ser quantificada através da absorbância deste radical (CAMPOS, ESCOBAR e LISSI, 1996; SILVA, 1999).

2.3 *Schinus terebinthifolius*

As plantas medicinais, prática milenar integrante da medicina tradicional, permanece como principal recurso terapêutico de muitas comunidades para o tratamento das mais diversas doenças que acomete o homem. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 60% a 85% da população dos países em desenvolvimento utilizavam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde (VEIGA Jr. *et al.*, 2005).

Em 2009 o Ministério da Saúde divulgou uma relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS – RENISUS, contemplada com 71 espécies com potencial alvo fitoterápico, entre elas a *Schinus terebinthifolius* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Segundo a Legislação Sanitária Brasileira, fitoterápico é aquele medicamento obtido exclusivamente a partir de matérias-primas bioativas vegetais (ANVISA, 2016).

Ao longo dos anos, as observações populares através da etnofarmacologia, somaram informações pertinentes para posteriores estudos acerca da eficácia das plantas medicinais, sendo válido até os dias atuais para estimular o uso dos vegetais como terapêutica validada, além de estimular a identificação de substâncias naturais bioativas (YUNES *et al.*, 2001).

Schinus terebinthifolius é uma espécie nativa, encontrada desde o Nordeste até o Sul (LORENZI, 2008) e conhecida por todo o Brasil popularmente como aroeira (CORRÊA, 1984). Entre as propriedades terapêuticas atribuídas a medicina popular da *Schinus* encontra-se a antioxidante e que corroboram com estudos *in vivo* e *in vitro* demonstrados por Alves, Pizzolatti e Brighente (2003) e Degáspari, Waszczynty e Santos (2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Determinar o efeito do extrato metanólico de entrecasca de *Schinus terebinthifolius* em ratos Wistar machos com obstrução ureteral unilateral bem como a atividade antioxidante *in vitro* do extrato.

3.2. Específicos

- Produzir extrato metanólico de entrecasca de *Schinus terebinthifolius*.
- Induzir lesão renal utilizando o modelo de obstrução ureteral unilateral (OUU).
- Determinar antes do procedimento cirúrgico (dia 0) o consumo hídrico, dietético, diurese e cálculo do *clearance* de creatinina.
- Dosar marcadores de função renal, pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) no dia 0 e 14 dias após a OUU.
- Determinar nos tecidos renal e hepático coletados os marcadores de estresse oxidativo TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e GSH - Glutathione.
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato.

4. REFERÊNCIAS

ALVES, L.O; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Efeito antioxidante de extratos e frações da *Schinus*. XI Encontro de Química da Região Sul QO-18 Pelotas, RS Nov/2003.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 16 ago 2016.

BAE, E.H., KIM, I.J., JOO, S.Y., et al. Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2014;15:348-61.

BASCANDS JL, SCHANTRA JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. Kidney Int 2005; 68:925–37 PMID: 16105023

BASTOS, M.G.; CASTRO, W.B.; ABRITA, R.R.; ALMEIDA, E.C.; MAFRA, D.; COSTA, D.M.N.; GONÇALVES, J.A.; OLIVEIRA, L.A.; SANTOS, F.R.; PAULA, R.B.. Doença Renal Crônica: Problemas e Soluções.. J. Bras. Nefrol.. 2004;26(4):202-215.

BELLOMO R, RONCO C, KELUM JA, MEHTA RL, PALEVSKY P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care 2004;8:R204-12.

BERNABEU, A.S.; TRIANA, B.E.T.; CASANOVA, A.E. et al. El Estrés Oxidativo en La Insuficiencia Renal Crônica. Revista Cubana Invest Biomed, v.23, n.2, p.118-120, 2004.

BROWN, S. A. Oxidative stress and chronic renal failure. Veterinary. Clinics. Small. Animal Practice, v. 38, p.157-166, 2008.

CARNILI, E.A., DUARTE-ALMEIDA, J.M., TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Shinus terebinthifolius* raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-dosertão). *Braz J Pharmacogn.* 2010.

CHERCHIGLIA M.L.; ANDRADE, E.I.G; ACÚRCIO, F.A.; BELISÁRIO, S.A.; MURICI, F.A.L.; GUERRA JÚNIOR, A.A.; FALEIROS, D.R.; SZUSTER, D.A.C.; RODRIGUES, C.L.; RODRIGUES, C.L.; JANONES, F.; SILVA, G.D.; TAVEIRA, T.S.. Gênese de uma política pública de ações de alto custo e complexidade: as terapias renais substitutivas no Brasil:. *Revista da Associação Médica de Minas Gerais, Belo Horizonte*, v. 16, p. S83-S89, 2006.

CHERCHIGLIA M L. ; MACHADO, E.L.; SZUSTER, D.A.C.; ANDRADE,E.I.G.; ACÚRCIO, F.A.; CAIAFFA, W.T.; SESSO, R. ; GUERRA JÚNIOR, A.A.; QUEIROZ, O.V.; GOMES, I.C.. Perfil epidemiológico dos pacientes em terapia renal substitutiva no Brasil, 2000-2004. *Revista de Saúde Pública (USP. Impresso)*, v. 44, p. 639-649, 2010.

CHEVALIER RL, FORBES MS, THORNHILL BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 75:1145–52 doi: 10.1038/ki.2009.86 PMID: 19340094

CORRÊA, M.P. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas* 6v. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.170-171, 1984.

COSTA J.A.C.; VIEIRA NETO O.M.; MOYSÉS NETO M. Insuficiência renal aguda. *Medicina, Ribeirão Preto*, 36: 307-324, abr./dez.2003.

COUTINHO, I.H., TORRES, O.J., MATIAS, J.E., COELHO, J.C., STAHLKE, JUNIOR, H.J., AGULHMA, M.A., BACHLE, E., CAMARGO, .PA., PIMENTEL, S.K., FREITAS, A.C. *Schinus terebinthifolius* Raddi and it's influence in the

healing process of colonic anastomosis: experimental study in rats Acta Cir Bras. 2006.

COWGILL, L. D. Acute renal failure: causes and outcomes. Proceedings International Veterinary Emergency and Critical Care ;symposium, v.9, p.383-387, 2003.

DEGÁSPARI, C.H.; WASCZYNZKY, J.N.; SANTOS, R.J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*). Visão Acadêmica ISSN: 1518-5192 Curitiba v.5, n.2, p.83-90, 2004.

DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Am J Kidney Dis. 2002;39(Suppl 2):S1-S246.

EDDY, A.A. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. Kidney Int. Suppl. 2014, 4, 2–8.

EL NAHAS, A.M.; BELLO, A.K.. Chronic kidney disease: the global challenge. Lancet 2005; 365: 331–40.

FERREIRA, A.L.A. et al. Effect of lycopene on doxorubicininduced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological and morphometrical assessment. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v.101, n.1, p.16-24, 2007.

FRANCO, R.J.S.. Hipertensão secundária à nefropatia – diagnóstico e tratamento. Rev Bras Hipertens vol 9(2):141-147. abril/junho de 2002.

GRANADOS-PRINCIPAL, S. et al. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. Food and Chemical Toxicology, v.48, p.1425-1438, 2010.

HASANOGLU, E., ALTAN, N., SINDEL, S., ONGUN, C.O, BALI, M., ALTINTAS, E. The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and

plasma levels of some trace elements (Al, Cu, Zn) of dialysis patients. *General Pharmacology*, v.25, n.1, p.107-110,1994.

HUIMIN,J., QINJUN, X., PEIJUN, Z., YANDE, D., ZHENG, Z., PEIQING, Y. Impaired GP-91PHOX gene expression and dysfunction of peripheral blood neutrophils in patients maintaining hemodialysis. *Chinese medical Journal*, v.113, n.2, p.120-123, 2000.

HWANG, M. et al. TGF-beta1 siRNA suppresses the tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction. *Exp Mol Pathol* 81, 48–54, doi: 10.1016/j.yexmp.2005.11.005 (2006).

JONES, D.P., Disruption of mitochondrial redo circuitry in oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1):38-53, 2006.

KAROWICZ-BILINSKA, A.; SUZIN, J.; SIEROSZEWSKI, P.: Evaluation of oxidative stress and índices during treatament in pregnant woman with intrauterine growth retardation. *Med Sci Monit* 2002.

KIRSZTAJN, G. M.; BASTOS, M. G. Proposta de padronização de um programa de rastreamento da doença renal crônica. *Jornal brasileiro de nefrologia*, São Paulo, v.29, n.1, p.18-22, mar. 2007.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). 2008. 219f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, SP.

LIU Y: New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21: 212-222, 2010.

LUI, Z.; HUANG, X.R.; LAN, H.Y. Smad3 mediates ANG II-induced hypertensive kidney disease in mice. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2012, 302, F986–F997.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa, Plantarum, 2008.

MA, L. J. et al. Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice. *Am J Pathol* 163, 1261–1273 (2003).

MALAFIA, O., CAMPOS, A.C.L., TORRES, O., GOLDENBERG, S. Os fitoterápicos e seu potencial na cicatrização em cirurgia. *Acta Cir Bras*. 2006.

MARQUES, A.B.; PEREIRA, D.C.; RIBEIRO, R.C.H.M. Motivos e frequência de internação dos pacientes com IRC em tratamento hemodialítico. *Arq. Ciênc. Saúde*., São José do Rio Preto, v.12, n.2, p.67-72, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal Saúde. Disponível em: www.saude.gov.br . Acesso em: 16 ago 2016.

MATHEW, T.; CORSO, O. Early detection of chronic kidney disease in Australia: which way to go? *Nephrology*, Carlton, v.14, n.4, p.367-373, June 2009.

MEI, Y., YANGYANG, Z.h., SHUAI, L., HAO, J., YIRONG, Y., YOGN, C., PENG, X., BICHENG, C., YAN Zh. Breviscapine prevents downregulation of renal water and sodium transport proteins in response to unilateral ureteral obstruction. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19:573-578.

NAGAE T, Mori K, MUKOYAMA M, et al. Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. *Kidney Int*. 2008;74:70–80

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. Sobre Insuficiência Renal Crônica. Guia para pacientes e familiares. Disponível em <http://www.kidney.org/atoZ/pdf/international/portuguese/11-50->

[1201_KAI_PatBro_AboutCKD_Pharmanet_Portuguese_Nov08.pdf](#). Acesso em 14 ago 2016.

NEILSON, E. Mechanisms of disease: fibroblasts-a new look at an old problem. *Nat Clin Pract Nephrol* 2, 101–108 2006.

NUNES, J.A. Jr., RIBAS-FILHO, J.M., MALAFAIA, O., CZECZKO, N.G., INACIO, C.M., NEGRAO, A.W., LUCENA, P.L., MOREIRA, H., WAGENFUHR, J. Jr., CRUZ, J.J. Evaluation of the hydro-alcoholic *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) extract in the healing process of the alba linea in rats. *Acta Cir Bras*. 2006.

PAULA-JÚNIOR, W. et al. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.16, p.625-630, 2006.

PAN, B., LIU, G., JIANG, Z. & ZHENG, D. Regulation of renal fibrosis by macrophage polarization. *Cell Physiol Biochem* 35, 1062–1069, doi: 10.1159/000373932 (2015).

PEREIRA, F.E.L. Etiopatogênese geral das lesões. In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo patologia*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap.3, p.24-26.

PERES, L.A.B et al. Estudo epidemiológico da doença renal crônica terminal no oeste do Paraná: uma experiência de 878 casos atendidos em 25 anos. *J. Bras. Nefrol.* [online]. 2010, vol.32, n.1, pp. 51-56.

PSIHOGIOS, N. G., GAZI, I. F., ELIAF, M. S., SEFERIADIS, K. I. & BAIRAKTARI, E. T. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics. *NMR Biomed* 21, 195–207 2008.

RITZ, E.; ADAMCZAK, M.; ZEIER, M.. Kidney and Hypertension – Causes. Herz 2003;28:663–7.

ROMÃO JR. A Doença Renal Crônica: do Diagnóstico ao tratamento. Prática Hospitalar. Ano IX. N. 52. Jul-Ago 2007.

RYSZ, J, KASIELSKI, M., APANASIEWICZ, J, KRÓL, M., WOZNICKI, A, LUCIAK, M, NOWAK, D. Increased hydrogen peroxide in the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. Nephrology Dialysis Transplantation, v.19, p.158-163, 2004.

SANTOS, O.J., RIBAS, JM, CZECHKO, NG, CASTELO BRANCO NETO, ML, NAUFEL, C Jr, FERREIRA, LM, CAMPOS, RP, MOREIRA, H, PORCIDES, RD, DOBROWOLSK, S. Evaluation of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) extract on the healing process of gastroraphy in rats. Acta Cir Bras. 2006.

SCOTT, A.N.D. Oxidative stress and chronic kidney disease. Veterinary Clinical Small Animal, v.38, n.1, p.157-166, 2008.

SESSO, R.C.C.; GORDAN, P.. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. Jornal Brasileiro de Nefrologia, v. 29, p. 9-12, 2007.

SESSO, R., LOPES, A.A., THOMÉ, A.S., BEVILACQUA, J.L., ROMÃO JUNIOR, J.E., LUGON, J. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2008 Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2008 J Bras Nefrol. 2008;30:233-8.

SHIMIZU, M.H.M.A. N-acetilcisteína atenua a progressão da doença renal crônica. 2005. Ribeirão Preto, 105f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo USP.

SHOJI, H.; KOLETZKO, B.: Oxidative stress and antioxidante protection in the perinatal period. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care; 10:324-328; 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). Disponível em <http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?insuficienciaRenal&menu=24>. Acesso em 14 ago 2016.

VEIGA Jr., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

YAMAN I, BALIKCI E. Protective effects of nigella sativa against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62:183-90.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; Pharmaceutics and phytotherapies: the need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapies in Brazil. **Química Nova** v. 24, n.1, p.147-152. ISSN 0010-4042. Jan./Fev. 2001.

WARADY, B.A.; CHADHA, V.. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol* (2007) 22:1999 – 2009.

WOLF, G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor- β pathway. *Kidney Int*. 2006, 70, 1914–1919.

ZAFARULLAH, M.; LI, W.Q; SYLVESTER J. et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.60, n.1, p.6-20, 2003.

ZEISBERG M., DUFFIELD J.S.,: Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 21: 1247-1253, 2010.

Effect of methanolic extract from bark of *Schinus terebinthifolius* medicinal plant in Wistar albino rats submitted to unilateral ureteral obstruction

Jones Henrique de Melo Pimentel, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo, Alana Carolina Costa Veras, Ana Durce Oliveira da Paixão, Thiago Henrique Napoleão, Leucio Duarte Vieira-Filho, Patrícia Maria Guedes Paiva.

Abstract

Schinus terebinthifolius Raddi, included in the National List of Medicinal Plants of Interest to the Brazilian Unified Health System (RENISUS), has bark, leaves, and fruits traditionally used as anti-inflammatory, analgesic, and wound-healing agents. Chronic kidney disease (CKD) is a prevalent condition associated with renal failure and cardiovascular complications. This study evaluated the effect of secondary metabolites from the inner bark of *S. terebinthifolius* on a renal oxidative stress model induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) in male Wistar rats. Animals were divided into four groups: Sham, UUO, UUO treated with the methanolic extract (100 mg/kg/day, orally), and UUO treated with enalapril (10 mg/kg/day, orally) for 14 days. Renal function, systolic blood pressure, heart rate, and oxidative stress markers (TBARS and GSH) were analyzed. UUO induced renal dysfunction and oxidative stress, evidenced by increased lipid peroxidation and reduced glutathione levels. Treatment with the extract prevented these alterations, showing effects comparable to enalapril. Unlike enalapril, the extract did not increase hepatic lipid peroxidation, suggesting a potential protective effect without hepatic toxicity. The results indicate that *S. terebinthifolius* inner bark extract exhibits nephroprotective and antioxidant properties in renal injury induced by UUO.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*, secondary metabolites, oxidative stress, renal function, unilateral ureteral obstruction

1. Introduction

Kidney disease is a frequent health condition and its clinical outcomes are associated with high mortality rates (Doqi, 2002). In Brazil, the functional renal failure prognosis is still poor and its incidence has alarmingly increased accompanied by an increase in life expectancy and the prevalence of other basal chronic diseases (Sesso, 2008). The unilateral ureteral obstruction (UUO) is a well-characterized experimental model involving a tubular dilatation framework accompanied by hydronephrosis and tubulointerstitial fibrosis (Mei et al., 2016) as well as hidroelectrolytic disorders, which become a major factor in the pathophysiology of obstructive nephropathies chronic progression (Li et al., 2007; Wang et al., 2012).

Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical, are products of cellular metabolism with fundamental importance in cell signaling (Simon et al., 1998; Uttara et al., 2009). However, renal injury stimulates the production of ROS in an exacerbated form and cause renal oxidative stress, inflammation, increased lipid peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity, characterizing a redox imbalance (Yaman & Balikci, 2010; Bae et al., 2014). Renal fibrosis is usually accompanied by irreversible loss of parenchymal and, in a long term, it leads to end-stage renal failure through extracellular matrix accumulation, fibroblast proliferation, inflammatory cell infiltration and consequent atrophy, followed by apoptosis and necrosis (Nielson, 2006; Psihogios, 2008).

The use of medicinal plants for the treatment of diseases has been demonstrated in several studies. However, many species are also used for medicinal purposes even with little or no scientific evidence (Veiga, 2005). This increases the interest of researchers in proving the population use and in the discovery of new bioactive

molecules in the medicinal flora (Malafaia, 2006). Many studies with *Schinus terebinthifolius* have proven mutagenic, antibiotic, antioxidant, antiulcerogenic and fungicidal effects (Nunes et al., 2006; Carnili et al., 2010).

This study proposed to investigate the effects of methanolic extract from *Schinus terebinthifolius* bark on animals submitted to UUO procedure by evaluating hemodynamic balance, reestablishment of glomerular filtration, clearance of nitrogenous compounds, water balance and oxidative imbalance. Additionally, the methanolic extract was evaluated for antioxidant activity by *in vitro* assays.

2. Materials and methods

3. Results and discussion

No death was observed in the 4 groups during the 14 days of the experiment. The obstructed kidneys in the animals from UUO, UUO+ENA, and UUO+EXT groups showed increased weights ($p < 0.05$) in comparison with Sham group (Figure 1A), which reflects a hydronephrosis framework. For the contralateral kidneys, the weight of the organ was not significantly different ($p > 0.05$) between the groups (Figure 1B). The ratio between the obstructed kidney weight and the body weight in the animals from UUO groups was significantly higher than in Sham group (Figure 1C).

The values of urinary flow before and 7 days after the UUO were not significantly different ($p > 0.05$) between the groups that went through this procedure. However, at the 14th day the animals treated with enalapril (UUO+ENA) and with the extract (UUO+EXT) showed increased urinary flow in comparison with the UUO group that received no treatment (Figure 2A). This increase of diuresis in UUO+ENA group

reflects the polydipsia, since this was the single group that showed an increase in water consumption (Figure 2B). However, this explanation cannot be used to explain the increase of urinary flow in the group treated with the extract, suggesting a possible diuretic action similarly to that reported by Al-Saikhani and Ansari (2016) for methanolic extract from *Peganum harmala* seeds when it was administered to Wistar albino rats. Novaes et al. (2014) also demonstrated the diuretic action of ethanolic extract of plant used in Brazilian folk medicine and the authors suggested that phenolic compounds can be related to this action.

The basal creatinine clearance decreased in the animals with ureteral obstruction in comparison with Sham group (Table 1), confirming a decreased glomerular filtration rate and the occurrence of acute renal failure at this moment. However, the basal creatinine clearance did not differ ($p > 0.05$) among the groups at the 14th day (Table 1). This result may be due to adaptive mechanisms of the contralateral kidney, such as hypertrophy, which were then able to compensate the impact of the UUO procedure on the creatinine clearance (Polzin et al., 2005; McGrotty, 2008).

Table 2 shows the serum creatinine levels along the experiment. There was no difference between the groups prior to surgery (baseline), which confirmed normal renal function of animals. The UUO induced acute renal failure 7 days after the surgery, as indicated by the significant increase ($p < 0.05$) in serum creatinine. There was no significant difference ($p > 0.05$) among the groups treated with enalapril and extract at this moment. At the 14th day, the serum creatinine levels of untreated UUO group returned to the baseline, probably as a compensatory effect promoted by the contralateral kidney. However, in the groups treated with enalapril and extract, this compensatory mechanism was not observed. It is known that the secondary hypovolemia induced by diuretics in the initial phase of treatment may result in increase

of plasma creatinine level, mainly in the case of a preexistent kidney failure (Mindell et al., 1997; Venkataraman et al., 2008). This situation is also observed in treatments using ngiotensin-converting-enzyme inhibitors (Fotino et al., 1983; Abuelo, 2007).

The levels of blood urea nitrogen (BUN) are shown in Table 3. The acute renal failure process observed 7 days after the UUO procedure resulted in significant increase of BUN level, which is in accordance with the uremia usually observed in this pathology (Tapmeier et al., 2008). At the 7th day, the BUN level in animals treated with the extract were lower than in group treated with enalapril ($p < 0.001$) but was still higher than that observed in Sham group. At the 14th day, the excretion of nitrogen compounds in the group treated with the extract showed a similar level ($p > 0.05$) to that detected in Sham group while the urea levels in animals treated with enalapril remained increased. The diuretic action of extract may explain the reduction of plasmatic urea levels that represents a beneficial effect of it in this pathological condition since the increase in plasma urea level may lead to damage in neurological and cardiovascular systems. Increased BUN levels in animals treated with enalapril is a well-known side effect of this drug (Elliott and Watson, 2009).

Blood pressure levels before surgery had no statistical difference between the groups. The UUO caused a significant increase in systolic blood pressure of the animals and, after 14 days, the hypertension was reversed in the group treated with enalapril (Figure 3), in according with its use in clinical practice as a hypotensive agent. However, the extract could not reverse the hypertension.

The animals submitted to the UUO also showed increased levels of lipid peroxidation and reduction of GSH levels in kidney, in comparison with Sham group (Figure 4A and 4B). In the liver, the lipid peroxidation did not increase but the GSH levels were also lower than in Sham group (Figure 4C and 4D). The treatment with the

extract prevented these alterations in lipid peroxidation and GSH levels and the results were similar to that obtained in group treated with enalapril. Probably the effect of enalapril on lipid peroxidation was due to its antioxidant activity (Kim et al., 2013) and may be possible that the effect of the methanolic extract has been through a similar mechanism.

4. Conclusion

The methanol extract of *S. terebinthifolius* bark is a beneficial agent in renal injury due to its diuretic and antioxidant effects. The study indicates the extract as a promising antihypertensive agent that acts at the level of the renal tubule.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for fellowships (A.D.O. Paixão, P.M.G. Paiva), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Edital 071/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE, APQ-0661-2.08/15; FACEPE-PPSUS, APQ-0318-2.08/13). J.H.M. Pimentel would like to thank FACEPE (IBPG-1044-2.08/14) for graduate scholarship.

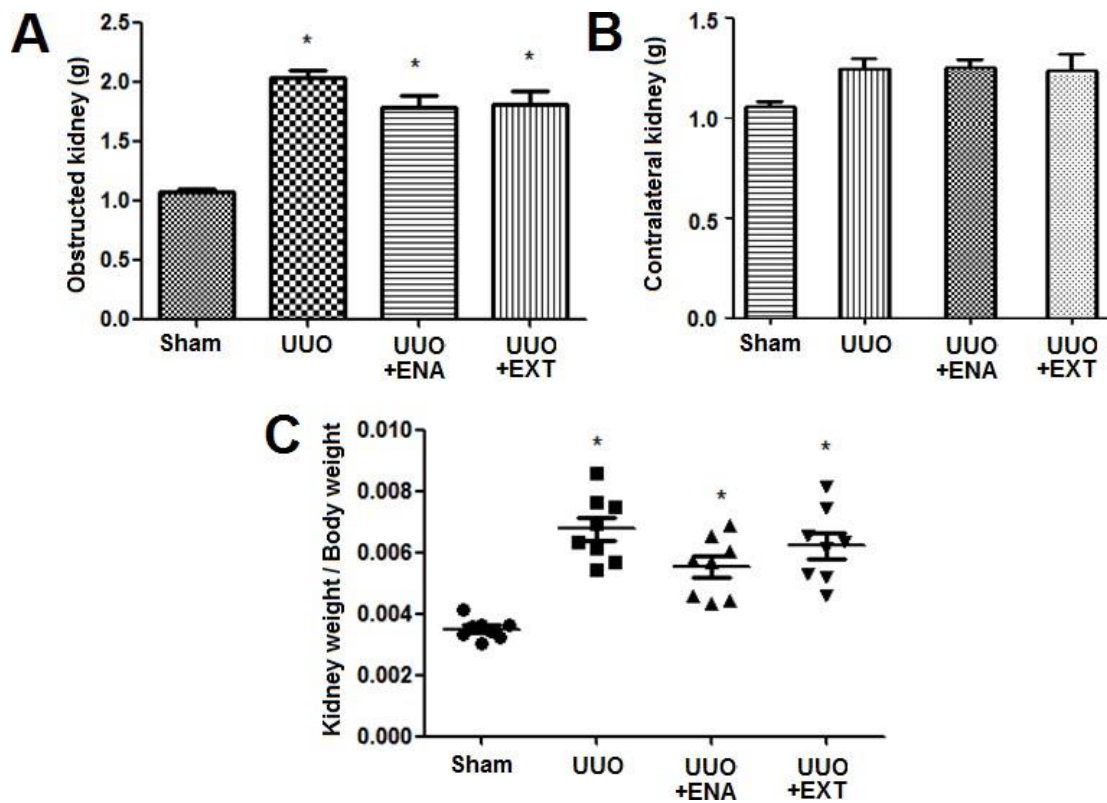


Figure 1. Weight of obstructed (A) and contralateral (B) kidneys in animals from Sham group or that went through unilateral ureteral obstruction procedure and received no treatment (UUO), were treated with the methanolic extract from *S. terebinthifolius* bark (UUO+EXT) or treated with enalapril (UUO+ENA). The ratios **obstructed** kidney weight/body weight are also shown (C). (*) $p < 0.05$ vs. Sham group.

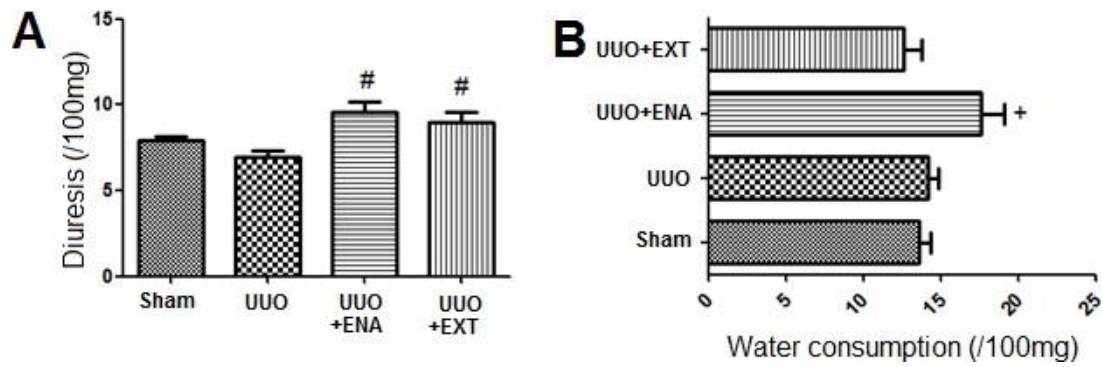


Figure 2. Diuresis (A) and water consumption (B) in animals from Sham group or that went through unilateral ureteral obstruction procedure and received no treatment (UUO), were treated with the methanolic extract from *S. terebinthifolius* bark (UUO+EXT) or treated with enalapril (UUO+ENA). (#) $p < 0.05$ vs. UUO group. (+) $p < 0.05$ vs. UUO+EXT group.

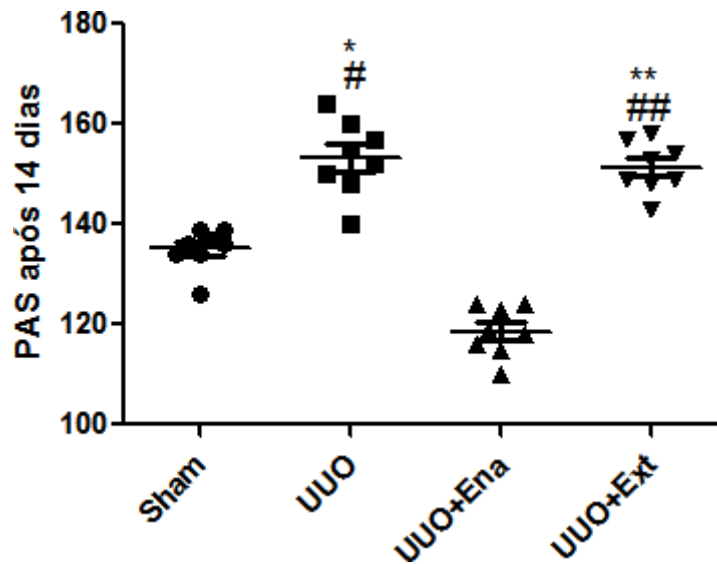


Figure 3. Blood pressure levels (mmHg) measured by indirect plethysmography in animals from Sham group or that went through unilateral ureteral obstruction procedure and received no treatment (UUO), were treated with the methanolic extract from *S. terebinthifolius* bark (UUO+EXT) or treated with enalapril (UUO+ENA). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Bonferroni's test. Significant differences ($p < 0.05$) are shown as follows: (#) Sham vs. UUO; (##) Sham vs. UUO+EXT; (*) UUO vs. UUO+ENA; (**) UUO+ENA vs. UUO+EXT.

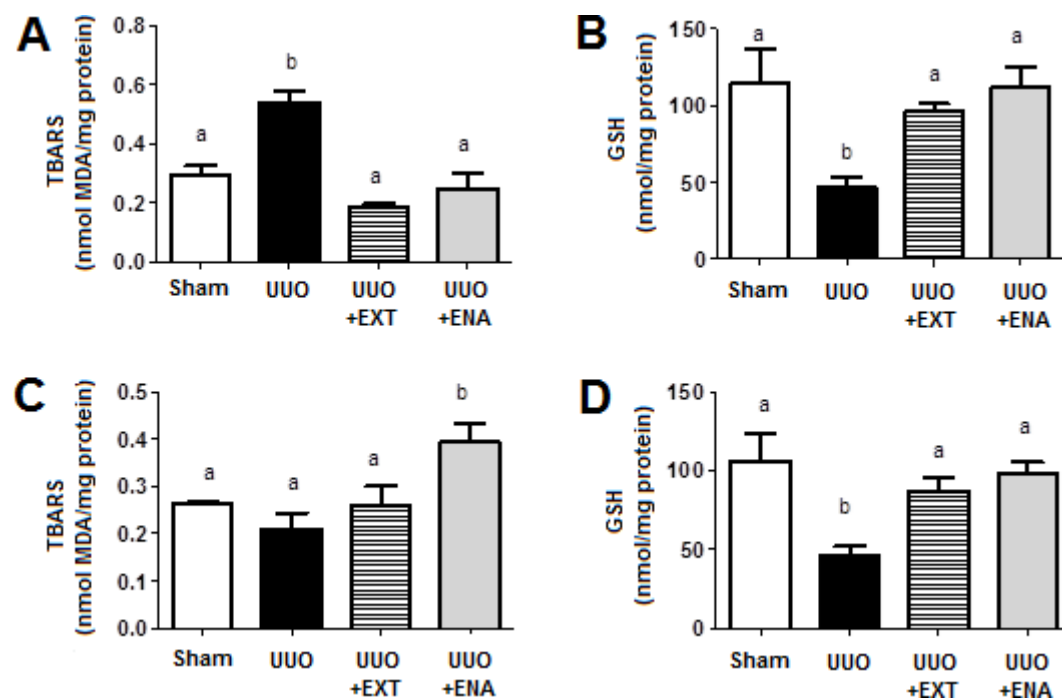


Figure 4. Evaluation of lipid peroxidation (TBARS) and reduced glutathione (GSH) levels in the obstructed kidney (A and B) and liver (C and D) of animals from Sham group or that went through unilateral ureteral obstruction procedure and received no treatment (UUO), were treated with the methanolic extract from *S. terebinthifolius* bark (UUO+EXT) or treated with enalapril (UUO+ENA). Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) between the groups.

Table 1. Creatinine clearance in animals from Sham group or that went through unilateral ureteral obstruction procedure and received no treatment (UUO), were treated with the methanolic extract from *S. terebinthifolius* bark (UUO+EXT) or treated with enalapril (UUO+ENA).

Time	Creatinine clearance			
	Groups			
	Sham	UUO	UUO+ENA	UUO+EXT
Day 0	0.4825±0.043	0.4775±0.053	0.4650±0.053	0.4638±0.044
Day 7	0.4588±0.040	0.2613±0.048 ^a	0.2863±0.033 ^a	0.2513±0.029 ^a
Day 14	0.4763±0.056	0.4338±0.027	0.4538±0.028	0.4788±0.046

^ap < 0.0001 vs. Sham group.

Table 2. Serum creatinine levels in animals from Sham group or that went through unilateral ureteral obstruction procedure and received no treatment (UUO), were treated with the methanolic extract from *S. terebinthifolius* bark (UUO+EXT) or treated with enalapril (UUO+ENA).

Time	Serum creatinine levels			
	Groups			
	Sham	UUO	UUO+ENA	UUO+EXT
Day 0	0.4925±0.035	0.4888±0.042	0.4913±0.059	0.4925±0.032
Day 7	0.4863±0.061	0.8163±0,054 ^a	0.7363±0.031 ^{ab}	0.7700±0.022 ^a
Day 14	0.5113±0.047	0.4838±0.046	0.6000±0.042 ^{ab}	0.5938±0.043 ^{ab}

^ap < 0.0001 vs. Sham group. ^bp < 0.05 vs. OUU group.

Table 3. Blood urea nitrogen (BUN) levels in animals from Sham group or that went through unilateral ureteral obstruction procedure and received no treatment (UUO), were treated with the methanolic extract from *S. terebinthifolius* bark (UUO+EXT) or treated with enalapril (UUO+ENA).

Time	BUN			
	Groups			
	Sham	UUO	UUO+ENA	UUO+EXT
Day 0	58.,50 ± 2.25	61.21 ± 6.58	53.26 ± 2.38	57.7 ± 3.544
Day 7	63.04 ± 2.28	80.05 ± 6.26 ^{a#}	89.49 ± 3.80 ^a	79.03 ± 3.760 ^{a#}
Day 14	268.9 ± 14.31	299.6 ± 25.08	318.5 ± 36.54 ^a	278.1 ± 38.90

^ap < 0.0001 vs. Sham group. [#]p < 0.001 vs. OUU+ENA group.