



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Avaliação do potencial antilítico do extrato etanólico das folhas da *Persea americana* Mill. em modelo experimental.

ALINE ANDRADE MARTINS

Dourados - MS 2017

ALINE ANDRADE MARTINS

Avaliação do potencial antilitiásico do extrato etanólico das folhas da *Persea americana* Mill. em modelo experimental.

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros

Dourados - MS 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M379e Martins, Aline Andrade.
Avaliação do potencial antiliteiásico da *Persea americana* Mill. Em modelo experimental. / Aline Andrade Martins. – Dourados, MS : UFGD, 2017.
36f.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Abacateiro. 2. Cálculos vesicais. 3. Modelo de corpo estranho. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR ALINE ANDRADE MARTINS, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 28 DE AGOSTO DE 2017.

Ao vigésimo oitavo dia do mês de agosto do ano de dois mil e dezessete (28/08/2017), às 14h, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "*Efeito antitiliásico de Folhas de Persea americana Mill. em modelo experimental.*" apresentada pela mestranda ALINE ANDRADE MARTINS, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Marcio Eduardo Barros** (Presidente/orientador), **Dr. Jonas da Silva Mota** (membro titular/externo) e **Dra. Virgínia Demarchi Kappel Trichez** (membro titular/interno). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 20 até 30 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo jus ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 28 de agosto de 2017.

Dr. Marcio Eduardo Barros

Dr. Jonas da Silva Mota

Dra. Virgínia Demarchi Kappel Trichez

ATA HOMOLOGADA EM: __/__/__, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

Dedico este trabalho a todos humanos e animais que
contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

À Deus, a Jesus e espíritos superiores que me guiaram até a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio e suporte de sempre;

Ao meu esposo Vinicius pelo apoio nas horas de preocupação;

Aos meus queridos Rogério, Joelma, Maria Fernanda, Ana Luiza, Maria Rosa, Vitória;

Aos meu amigos de sempre, Wellington, Tabajara, Debora, Kamila, Ellen, Anderson, Titi, Cris, Krislaine, Wana, Celinha, Lets, Paulo e Nathalie.

Ao meu orientador Professor Márcio pela tranquilidade nos momentos de aflição; Aos amigos que fiz durante esses 2 anos: Gisele, Enaile, Fred, Fernanda, Juliana.

A todos os funcionários da FCS: Debora, Aleksandra, Cleide, Lujan, Ana Paula, Letícia, Daniela, Priscila, Anália, Gugu, Ana Neide e Cristiano;

A clínica de diagnostico por imagem Diagnostika, especialmente Ariele e Juliana por toda dedicação no auxílio ao desenvolvimento desse trabalho;

A professora Anelise pelo auxílio; Aos Professores pelos ensinamentos; Aos colegas de turma;

E os animais utilizados.

EPÍGRAFE

Ninguém se movimenta no mundo sem enfrentamentos.
Que são excelentes oportunidades para se medir os
valores morais íntimos

(Joanna de Angelis)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – *Persea americana* Mill.

15

LISTA DE ABREVIATURAS

CaOx	Oxalato de cálcio.
EEPA	Extrato etanólico das folhas de <i>Persea americana</i>
DATASUS	Departamento de informática do SUS.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
pH	Potencial Hidrogênionico.
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
U-Controle	Grupo Urolitíase Controle.
U-EEPA P	Grupo Urolitíase tratado com Extrato etanólico das folhas de <i>Persea americana</i> prevenção.
U-EEPA T	Grupo Urolitíase tratado com Extrato etanólico das folhas de <i>Persea americana</i> tratamento.

MARTINS, A.A. **Avaliação do potencial antilitiásico do extrato etanólico das folhas da *Persea americana* Mill. em modelo experimental.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2017.

RESUMO

A utilização de plantas medicinais é uma das mais antigas formas alternativas para tratamento de enfermidades, entretanto, muitas das espécies utilizadas não foram cientificamente estudadas. A espécie *Persea americana*, conhecida popularmente como abacateiro, possui ampla disseminação no território brasileiro, com ocorrência na região do cerrado do Mato Grosso do Sul. As folhas dessa espécie são utilizadas popularmente para o tratamento de cálculos renais e como diurético. Considerando a utilização popular e sua ocorrência na região da Grande Dourados, o presente estudo teve como objetivo verificar o potencial antilitiásico da *Persea americana* avaliando sua ação na prevenção e tratamento dos cálculos vesicais em modelo de litíase vesical por corpo estranho em ratos. Foram implantadas pastilhas de oxalato de cálcio (CaOx) na bexiga de grupos de ratos U-Controle, U-EEPA P, U-EEPA T através de microcirurgia, as pastilhas serviram de nicho para a formação dos cálculos vesicais. Os grupos U-EEPA P e U-EEPA T foram tratados com o extrato etanólico da *P. americana* (EEPA) 250 mg/kg via *gavagem* durante 25 dias. Ao final do experimento foram coletados urina 24 horas em gaiola metabólica para dosagem de volume, pH, densidade, uréia e creatinina e coletado soro para dosagens de cálcio, magnésio, sódio, potássio, uréia e creatinina, e tecidos para análise histológica. Os Grupos U-controle, U-EEPA P foram sacrificados 30 dias após o implante da pastilha e o grupo U-EEPA T 55 dias após. O crescimento dos cálculos foi mensurado através de Raio X. Resultados: Análises dos cálculos através de Raio X não indicou diferença estatística de crescimento dos cálculos entre os grupos testes e controles.

Palavras-chaves: Abacateiro, cálculos vesicais, urolitíase, modelo de corpo estranho

MARTINS, A.A. **Antilithiasis effect of *Persea americana* Mill. In an experimental model.** Dissertation (Master degree) - Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, 2017.

ABSTRACT

The use of medicinal plants is one of the oldest alternative ways of treating diseases; however, many of the species used have not been scientifically studied. The species *Persea americana*, popularly known as avocado, has wide dissemination in the Brazilian territory, occurring in the cerrado region of Mato Grosso do Sul. The leaves of this species are popularly used for the treatment of kidney stones and as a diuretic. Considering the popular use and its occurrence in the region of Grande Dourados, the present study aimed to verify the antilithiasis potential of *Persea americana* by evaluating its action in the prevention and treatment of bladder stones in foreign body model of bladder lithiasis in rats. Calcium oxalate (CaOx) pellets were implanted in the bladder of groups of rats. U-Control, U-EEPA P, U-EEPA T through microsurgery. The U-EEPA P and U-EEPA T groups were treated with the ethanolic extract of *P. americana* (EEPA) 250 mg / kg via gavage for 25 days. The U-EEPA P and U-EEPA T groups were treated with the ethanolic extract of *P. americana* (EEPA) 250 mg / kg via gavage for 25 days. At the end of the experiment, 24-hour urine was collected in a metabolic cage for volume, pH, density, urea and creatinine dosing, and serum was collected for calcium, magnesium, sodium, potassium, urea and creatinine dosages and tissues for histological analysis. The U-control, U-EEPA P groups were sacrificed 30 days after the insertion of the pellet and the U-EEPA T group 55 days after. The growth of the calculations was measured by X-ray and measured by ruler. Results: Analysis of the calculations by X-ray did not indicate statistic difference in growth of the calculations between the test and control groups.

Keywords: Abacateiro, urolithiasis, foreign body model, bladder stones.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Urolitíase	2
2.2	Epidemiologia da Urolitíase	4
2.3	Fisiopatologia dos cálculos renais	6
2.4	Plantas medicinais	8
2.5	<i>Persea Americana</i>	8
3	OBJETIVOS	11
3.1	Objetivo Geral	11
3.2	Objetivo Específico	11
4	REFERÊNCIAS	12
5	APENDICES.....	16
5.1	Artigo: Antilithiasis effect of <i>Persea americana</i> Mill. in an experimental model.	17
6	ANEXO	32
6.1	Aprovação do projeto pelo comitê de ética em uso animal	33

1 INTRODUÇÃO

Cálculos renais são formações de sais minerais ou outras substâncias como oxalato de cálcio e ácido úrico que se cristalizam em diversas partes do trato urinário, o cálculo mais frequente é o oxalato de cálcio (CaOx) respondendo por 70-80% dos casos. A urolitíase que é presença do cálculo renal em alguma parte do sistema urinário, é uma doença de distribuição universal frequentemente encontrada nos serviços de emergência com baixa taxas de mortalidade, porém com quadros de dor intensa e alta taxa de recorrência (Korkes *et al.*, 2011). Estima-se que sejam gastos mais de 60 milhões por ano apenas no Sistema Único de Saúde brasileiro, com tratamento da urolitíase (Nardoza Junior *et al.*, 2010).

A probabilidade de um indivíduo formar um cálculo renal pode ser previsto a partir dos seguintes fatores de risco: baixo pH urinário, baixa ingestão hídrica, hipercalcúria; hiperuricosúria; hiperoxalocosúria; aumento de magnésio na urina, doenças endócrinas como hiperparatiroidismo primário, também podem resultar clinicamente na urolitíase (Abdel-Halim *et al.*, 2005; Elkoushy, 2014).

Visto que a prevalência de cálculos do trato urinário está aumentando em todo o mundo, tornam-se relevantes os estudos toxicológicos, pré-clínicos e clínicos que atuam como subsídio para a validação do uso medicinal de algumas plantas utilizados popularmente para o tratamento de diversas doenças (Trinchieri, 2008).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam tratamento tradicional nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais (Mariz *et al.*, 2006). Um estudo experimental utilizando uma proposta terapêutica alternativa, testou o extrato da *Phyllanthus niruri*, já utilizado pela população brasileira para doenças do trato urinário (Freitas, *et al.*, 2002), em cálculos previamente implantados na bexiga de ratos, os animais que receberam o extrato apresentaram cálculos menores, com peso significativamente menor quando comparado ao peso inicial da pastilha implantada, os cálculos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura apresentaram-se menos espiculados quando comparados aos controles com cálculo implantado e sem tratamento (Barros *et al.*, 2006). Modelos cirúrgicos de introdução de corpo estranho na bexiga de animais são descritos desde 1877, ainda hoje são amplamente utilizados por apresentarem uma boa reprodutibilidade e permitir a quantificação do crescimento dos cálculos sob ações preventivas e terapêuticas. Este modelo provoca a formação de cálculos em cerca de 90% dos ratos, com ritmo de crescimento semelhante em todos os grupos (Coelho *et al.*, 1989;

Barros *et al.*, 2006).

A *Persea americana* Mill., (Lauraceae) popularmente chamado de abacateiro, é uma árvore de aproximadamente 20 m, nativa da América Central, é amplamente utilizada por comunidades para o tratamento de doenças renais, como o cálculo há muitos anos (Balmé,1978).

Apesar de poucas publicações que comprovem o potencial terapêutico da *P. americana* no tratamento de cálculos renais, a planta é muito rica em informações etnobotânicas, estudos realizados em diversas regiões do Brasil como Roraima, Minas Gerais e Porto Alegre, descrevem potencial atividade diurética e utilização no tratamento do cálculo renal, demonstrando que o uso popular da planta é difundido pelo país (Berg e Silva, 1985; Vendruscolo e Menz, 2006; Calabria *et al.*, 2006).

Considerando as indicações de uso popular e estudos que demonstram potencial terapêutico do extrato da *P. americana*, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a ação do extrato sobre a formação de cálculos vesicais a partir de pastilhas implantadas em bexiga de ratos, com o intuito de validar seu uso popular no tratamento da urolitíase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Urolitíase

Urolitíase é a presença de cálculos (pedras) em qualquer segmento das vias urinárias, desde os rins, ureteres, bexiga ou uretra. Nefrolitíase é a presença desses cálculos apenas próximo ao rim. A pelve e os cálices do rim são locais comuns para a formação e o acúmulo de cálculos (Rubin *et al.*, 2006).

Aproximadamente 180 L de sangue são filtrados pelos rins por dia e apenas 1 a 1,5 L são excretados como urina. Durante a esse processo a urina primária torna-se saturada com sais de resíduos pouco solúveis, como exemplo fosfato de cálcio e oxalato de cálcio, levando a formação de cristais. Em condições normais de excreção os cristais são eliminados naturalmente pela urina (Verkoelen, 2006).

A formação do cálculo requer pré requisitos físicos e bioquímicos, porém a retenção do cristal é vista como um processo crítico para formação do cálculo, já que a produção do cristal é comum no processo de formação da urina, que em condições de equilíbrio é facilmente eliminado do túbulo renal sem causar prejuízos ao trato urinário (Cicerello, 2016, Rodgers 2016). O mecanismo de formação do cálculo renal acontece pelo desequilíbrio entre inibidores da formação e os promotores desencadeado pela supersaturação da urina, esse

desequilíbrio leva à internalização de cristais que são produzidos dando início à nucleação, então inicia-se um processo de agregação de novos cristais até a formação do cálculo (Djojodimedjo e Soebadi, 2013)

Os cálculos renais podem ser classificados de acordo com os seguintes aspectos: tamanho, localização, características radiológicas, etiologia da litogênese, composição mineral e risco de recorrência (Lopez e Hoppe, 2010).

Quanto ao tamanho dos cálculos a variação pode ser desde <1mm de diâmetro a cálculos enormes que dilatam toda a pelve renal. Geralmente formam-se no interior do rim e podem migrar através do sistema urinário, em alguns casos levando a obstrução das vias, causando dor, hidronefrose e pielonefrite. A passagem de uma pedra dentro do ureter causa dor no flanco, chamada de cólica renal (Rubin *et al.*, 2006).

Quanto à localização podem ser classificados em caliciais, piélicos, coraliformes, ureterais (dependendo de sua localização no ureter: proximais, mediais e distais), vesicais e uretrais (Evan *et al.*, 2010).

Os cálculos renais mais prevalentes são os compostos de oxalato de cálcio correspondendo a 70% dos casos, geralmente em sua forma mono-hidratado embora possa estar presente como dihidrato. A forma tri-hidratada não foi detectado em cálculos renais. Na urina ácida (pH baixo), é possível formar cálculos compostos de ácido úrico correspondendo a 7% dos cálculos detectados e urato monossódico. Um distúrbio metabólico que leva à cistinúria pode resultar em pedras de cistina, e infecção pode levar a pedras formada de estruvita que apresenta uma prevalência de 7% dos cálculos formados (fosfato de magnésio e amônio) (Rez *et al.*, 2016).

A maioria dos casos de cálculo renal é esporádica e não está associada a fatores predisponentes. Algumas formas de litíase estão relacionadas a anomalias metabólicas transitórias ou permanentes (por exemplo gota) ou a doenças genéticas específicas que resultam em concentrações anormais de alguns metabólitos (por exemplo cistinúria), a recorrência nos 3 primeiros anos é de aproximadamente 40% nos 3 e 4% em 10 anos (Ramaswany *et al.*, 2015).

Os cálculos que possuem cálcio em sua composição: oxalato de cálcio, hidroxiapatita, brushita que correspondem 75 a 90% são radiopacos podendo ser visualizados no raio X quando maiores que 3mm. Cálculos de ácido úrico, estruvita, cistina e idinavir não são visualizados por essa técnica de imagem (Dar e Denstedt, 2009).

Estudos recentes têm relatado uma porcentagem significativa de pacientes adultos com cálculos renais decorrente de doença monogênica. Até agora, mais de 30 genes foram identificadas como causadoras de cálculo renal. A transmissão pode ser autossômica dominante, recessiva ou ligada ao X. A maioria dos defeitos genéticos codificam para proteínas que são expressas no rim (Mohebbi *et al.*, 2016).

Na maioria dos casos, a presença de um cálculo renal está associado ao aumento do seu principal componente no sangue, bem como sua excreção na urina. Entretanto, em muitos pacientes com cálculos de cálcio, observa-se hipercalciúria sem hipercalcemia. Os cálculos mistos de ácido úrico e cálcio são comuns em excreção aumentada de ácido úrico, porque os cristais de urato agem como nicho ao redor do qual sais de cálcio se precipitam (Coe *et al.*, 2016). Na formação do oxalato de cálcio, o cálcio circulante aumentado se deposita em tecidos normais, acentuando-se mais nos locais onde houver tecidos lesados. Neste tipo de calcificação, o cálcio se deposita em meios ácidos como na parede alveolar, nas glândulas profundas do corpo e fundo gástrico e em túbulos e interstício do rim (Franco *et al.*, 2010).

2.2 Epidemiologia da Urolitíase

A epidemiologia do cálculo renal é dependente da área geográfica, distribuição de idade e sexo, composição do cálculo e localização da mesma. As mudanças das condições sócio-econômicas têm gerado mudanças na prevalência, incidência e distribuição da idade, sexo e tipo de cálculo tanto no local como na composição físico-química dos cálculos (Trinchieri, 2008).

As taxas de incidência e prevalência são mais altas em países desenvolvidos ricos, em comparação aos países em desenvolvimento, o que pode estar ligado a diferenças na dieta, pois populações mais ricas consomem maior quantidade de sal, proteína, cálcio e purinas provavelmente por melhores condições socioeconômicas (Cook *et al.*, 2016). Nos últimos 20 anos pesquisadores observaram elevação na incidência de cálculo renal também em áreas do Terceiro mundo que estão passando por mudanças econômicas e sociais (Trinchieri, 2006).

Pesquisas mostram que a Turquia tem um dos mais altos índices de prevalência no mundo. Uma pesquisa nacional de 1500 indivíduos de toda a Turquia em 1991 concluiu que a Turquia tinha uma prevalência de urolitíase de 14,8% (Akenci *et al.*, 1991). Um estudo transversal de qualidade superior em 2011, que pesquisou 2468 indivíduos na Turquia refinou esse valor para 11,1%, mas continua entre as maiores prevalências do mundo (Muslumanoglu *et al.*, 2011; Rodgers, 2016).

Nos Estados Unidos, a prevalência dobrou desde o Período de 1964-1972, essa alta também foi relatada na Alemanha, Espanha e Itália. Esse aumento da prevalência pode ser correlacionado ao aumento da obesidade nas populações, principalmente nos Estados Unidos (Souci *et al.*, 1994). Somente a Escócia teve um ligeiro decréscimo na prevalência de 3,83% em 1977 a 3,5% em 1987 (Romero *et al.*, 2010).

No Japão, a incidência de cálculo renal dobrou ao longo de período de 40 anos, tanto em homens quanto mulheres. Esses aumentos foram proeminente nos últimos 10 a 20 anos, com taxas entre homens aumentando desde a década de 1990, e as taxas de entre mulheres aumentando gradualmente desde a década de 1980 (Yasui *et al.*, 2008).

Em relação ao sexo observa-se um aumento do cálculo renal em mulheres. A incidência crescente de urolitíase em mulheres pode ser devido a mudanças no estilo de vida associados fatores de risco, como a obesidade (Scales *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos do cálculo renal no Brasil são escassos, dados disponíveis apontam que incidência estimada no Brasil é de 3-8% da população entre 20 a 50 anos, com maior frequência no sexo masculino (Sebben *et al.*, 2007).

Dados de 2010, apontam que ocorreram 69.039 internações por urolitíase, totalizando 0,61% todas as admissões hospitalares no sistema público de saúde brasileiro. As internações hospitalares por cálculo renal no sistema público de saúde brasileiro aumentaram 69% de 1996 a 2010 (Korkes *et al.*, 2011).

Dados do DATASUS do ano de 2015 revelam que ocorreram 69.955 internações por urolitíase nos hospitais brasileiros e um total de R\$ 3.925.637,03 de reais foram gastos nesses atendimentos hospitalares. Mato Grosso do Sul teve o total de 1238 casos de internações notificadas nesse período, a faixa etária com maior casos de internação foi 30 a 39 anos, com distribuição por sexo o aproximadamente iguais, sexo masculino 617, feminino 621, com apenas 2 casos a mais notificados para o sexo feminino. Em relação cor/raça a cor parda teve maior número de internação totalizando 730, seguida pela raça branca com 479 internações(DATASUS, 2017).

2.3 Fisiopatologia dos Cálculos Renais

Em geral a formação do cálculo ocorre, porque o equilíbrio excretor delicado se rompe: a urina torna-se concentrada com materiais insolúveis; os cristais são formados a partir desses materiais que, em seguida, consolidam-se, formando cálculos (Kohri *et al.*, 2012).

Embora a fisiopatologia da litíase renal não seja decorrente de um processo único e que se aplique a todos os cálculos e pacientes, o modo como um mineral se acumula envolve a saturação da urina, nucleação, agregação e retenção dos cristais (Ortiz e Ambrogini, 2010).

Supersaturação de sais urinários tem sido citada há mais de 50 anos como um fator de risco chave para urolitíase (Coe *et al.*, 2010), sendo este influenciada por múltiplos compostos chamados moduladores de cristalização. Estes moduladores podem ter características inibitórias e promotoras. Para haver a formação de cálculo, a urina deve conter uma quantidade excessiva de minerais. Para todas as soluções, a urina inclusive, existe uma quantidade máxima de sal que se pode ser dissolvida numa solução estável. A concentração nesse ponto é denominada de produto de solubilidade termodinâmico (Ortiz e Ambrogini, 2010).

A cristalização ou nucleação é a formação da menor unidade de um cristal, o primeiro passo na formação de um cálculo renal. Diversas substâncias químicas podem interferir de forma favorável ou desfavorável, nesse processo estas substâncias foram originalmente chamadas de inibidores e promotores, mas agora são referidos como moduladores (Basavaraj *et al.*, 2007).

Os principais moduladores promotores são: oxalato, cálcio, ácido úrico e cistina, já os inibidores são: citrato, pirofosfato, alguns glicosaminoglicanos e um grande grupo de proteínas. O mais intensamente estudado e provavelmente mais importante das proteínas são albumina, inibidor inter alfa, nefrocalcina, osteopontina, fragmento de protrombina 1 e Tamm Horsfall Glicoproteína (Coe *et al.*, 2010; Rodgers, 2016).

Os inibidores controlam o nível de supersaturação, servem como quelantes tais como citrato e fitato, ligam-se ao cálcio livre, enquanto que os quelantes catiônicos, tais

como o magnésio, ligam-se oxalato ionizado. Se a formação de cristais ocorre ou não, depende da capacidade dos moduladores quelantes para manter o nível de supersaturação abaixo da formação produto de sais CaOx. Se não conseguir fazer isso, a cristalização vai acontecer. (Rodgers, 2016)

Agregação é o processo em que ocorre a junção dos cristais, resultante de forças intermoleculares e que leva ao aparecimento de grandes partículas que podem ficar retidas no sistema coletor. Para formação do cálculo é necessário a retenção do cristal. Se cristais que sofreram nucleação e agregação forem eliminados com o fluxo urinário, um cálculo clinicamente evidente não se formará (Ortiz e Ambrogini, 2010).

A retenção pode ser definida como movimento de um cálculo através do trato urinário, a uma velocidade menor do que a do fluxo urinário, ou pode ocorrer pela ampliação do tamanho do cálculo fazendo com que o cristal fique fisicamente preso. Isto tem sido chamado de log-jamming efeito, quando o tamanho de partícula é fator decisivo que determina sua livre passagem pelos túbulos renais (Rodgers, 2016).

Outra hipótese para formação do cálculo seria que após lesão química no urotélio, que normalmente atua impedindo a aderência do cristal, ocorreria aderência de cristais num ponto do sistema coletor renal, prolongando o tempo de exposição à urina supersaturada e facilitando a agregação e o crescimento do cálculo (Verkoelen, 2006).

Além dos fatores da supersaturação e lesões prévias do epitélio renal que podem levar a formação do cristais por favorecer a adesão de cristais ao epitélio. Estudos afirmam que após essa adesão um processo de internalização do cristal pode ocorrer, isso se dá através de uma reorganização do citoesqueleto da célula, aparecimento da expressão de genes de transcrição de promoção de fibrose e proliferação celular. A internalização é dependente da quantidade de cristal presente no meio e tem maior afinidade por cristais de oxalato de cálcio. (Lieske *et al.*, 1993).

A presença de bactérias produtoras de urease podem colaborar com formação de cálculos principalmente de estruvita e carbonato de apatita. Estudos apontam que a *E. coli* pode funcionar como núcleo para disposição de cristais e alterar quimicamente a urina promovendo a formação de cristais, algumas nanobactérias também podem ser ligadas a formação de cálculo (Cicerello *et al.*, 2016).

Em infecções associadas ao cálculo renal o patógeno mais prevalente é a *E. coli*, identificada como agente causador da infecção em 40% dos casos (Djojojimedjo e Soebadi, 2013).

2.4 Plantas Medicinais

Os benefícios de extratos de ervas e especiarias são discutidos por séculos, sendo as plantas o método terapêutico mais antigo que se conhece. Eles têm sido usado em muitos ramos da indústria, como medicina, farmácia, cosmetologia e produção de alimentos (Bourgaud *et al.*, 2001; Leja e Czaczyk, 2016).

As plantas medicinais tem despertado grande interesse pela possibilidade de descoberta de atividades biológicas, que podem originar fitoterápicos, medicamentos semi-sintéticos e derivados de produtos naturais (Bauer e Bronstrup, 2014).

Diversas plantas foram estudadas para o tratamento do cálculo renal, e apresentaram resultados promissores como: o extrato hidrometanólico de *Bergenia ligulata*, apresentou efeito antioxidante, diurético e inibição da agregação de cristais de CaOx, bem como formação de cristais. Sua atividade pode estar ligada a efeitos sobre a inibição da nucleação, e do crescimento de cristais de fosfato de cálcio dihidratado (Bashir e Gilani, 2009).

O extrato aquoso *Rubus idaeus* demonstrou efeito profilático sobre a formação de cálculos pela redução de oxalato, cálcio e fósforo urinário (Ghalayini *et al.*, 2011).

A *Boerhaavia diffusa* Linn (família Nyctaginaceae), usada na Índia e Brasil (erva tostão) para tratamento da urolitíase, foi avaliada experimentalmente, ratos com hiperoxalúria induzida por etileno glicol, foram tratados com extrato aquoso da raiz por 28 dias. O extrato reduziu a produção dos cristais e promoveu preferencialmente a formação de cristais de CaOx dihidratado em relação ao monohidratado (Pareta *et al.*, 2011).

O extrato de *P. niruri* foi testado em modelo de cristalização de CaOx *in vitro*. A precipitação foi induzida por oxalato de sódio em urina não filtrada de ratos Wistar e humanos. O *P. niruri* não diminuiu o número de cristais, porém induziu redução do tamanho e agregação destes na urina humana (Barros *et al.*, 2003).

2.4 *Persea americana*

Persea americana tem o nome popular de abacateiro, é uma árvore de copa arredondada e densa, de 12-20 M de altura, nativa da América Central, suas folhas simples, cartáceas, de 9-18 cm de comprimento, com tronco curto de 40-70 cm de

diâmetro, revestido por casca parda e áspera. Seu cultivo foi introduzido no Brasil em 1809 (Scora e Berg, 1992).

O abacateiro é rico em descrições etnofarmacológicas que lhe atribuem numerosas e variadas propriedades medicinais (Lorenzi e Matos, 2002). Apresenta em suas propriedades químicas principais os taninos, terpenos, ácido málico e acético, dopamina, aspargina, metil eugenol, metil chavicol e perseitol, além de carboidratos, proteínas, óleo essencial, sais minerais, gorduras e pigmentos (Owolabi *et al.*, 2010).

Em 2006, o Governo Federal instituiu um grupo de trabalho interministerial para elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – (PNPMF) que, estabelece ações em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (Ministério da Saúde, 2009).

O Programa Nacional de Pesquisas de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), reconhece o uso popular das folhas da *P. americana* na forma de chá. Sua principal indicação popular reconhecida pelo PPPMF é o efeito diurético (Ministério da Saúde, 2009).

Um estudo pré-clínico realizado com o extrato aquoso das folhas de *P. americana* indicou que o extrato possui efeitos analgésicos e antiinflamatórios (Adeyemi *et al.*, 2002).

Em testes de cristalização *in vitro* na urina humana, com cristais de oxalato de cálcio o extrato da *P. americana* mostrou-se eficiente na inibição da formação de cristais e no aumento do volume urinário (Arrigo, 2013).

Tendo em vista o uso popular de algumas plantas para o tratamento de diversas doenças, tornam-se relevantes os estudos pré-clínicos e clínicos que atuam como subsídio para a validação do uso medicinal; aliando-se ao aumento no número de pessoas acometidas pelas urolitíases torna-se necessário o estudo de novas propostas terapêuticas. A pesquisa poderá contribuir para a elucidação da ação do extrato etanólico da *P. americana* em cálculo vesical já formado e implantado em modelo "*in vivo*". O extrato poderá revelar-se como uma terapia economicamente viável e menos invasiva que as convencionais adotadas pelos centros de saúde em todo o mundo, promovendo a melhora na atenção à saúde humana.



Figura1. *Persea americana*. Fonte: <http://creativecommons.org/licenses>

3 OBJETIVOS

3.1OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com o extrato etanólico das folhas da *Persea americana* sobre o crescimento dos cálculos vesicais no modelo de litíase por corpo estranho em ratos;

3.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar modelo de litíase por corpo estranho em ratos;
- Avaliar o potencial do extrato etanólico das folhas da *Persea americana* em cálculos previamente implantados;
- Relacionar o potencial preventivo do extrato etanólico das folhas *P. americana*;
- Relacionar efeito terapêutico do extrato etanólico das folhas de *P. americana*.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Halim, R., E. Urolithiasis in adults. Clinical and biochemical aspects. **Saudi Medical Journal**. v. 26, p. 705-713, 2013.
- Adeyemi, O. O. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). **Fitoterapia**. v. 73, p. 375-380, 2002.
- Akinci, M., et al. Urinary stone disease in Turkey: an updated epidemiological study. **European urology**. v. 20, p. 200-203, 1991.
- Arrigo, Jucileia da Silva, Efeitos diuréticos e antilítiasico de folhas de *Persea americana* Mill (Lauraceae). Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2013.
- Balmé, F. Plantas Mediciniais. **Editora Hemus**, São Paulo, Brasil, 1978.
- Barros, M., et al. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. **Urological Research**. v. 34, p. 351-357, 2006.
- Bashir, S., Gilani, A. H. Antiurolithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: an explanation of the underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, p. 106-116, 2009.
- Bauer, A., Brönstrup, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Natural Product Reports**. v. 31, p. 35-60, 2014.
- Basavaraj, D.R. et al. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. **EAU-EBU update series**. v. 5, p.126- 136, 2007.
- Berg, V.D.M.E., Silva, M.H.L.D. Contribuição ao conhecimento da flora medicinal de Roraima. **Acta Amazonica**. v. 18, p. 23-35, 1988.
- Bourgaud, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**. v. 161, p. 839-851, 2008.
- Calábria, L., et al. Ethnobotanical and ethnopharmacological survey of medicinal plants in Indianopolis, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2008.
- Cicerello, E., et al. Metabolic evaluation in patients with infected nephrolithiasis: Is it necessary?. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**. v. 88, p. 208-211, 2016.
- Coe, F.L., Worcester, E.M., Evan, A.P., Idiopathic hypercalciuria and formation of calcium renal stones. **Nature Reviews Nephrology**. v. 12, p. 519-533, 2016.
- Coelho, S.T.S.N., et al. Litíase experimental em ratos:sistematização do modelo com corpo estranho. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v. 11, p. 59-64, 1989.
- Cook, J., et al. The Epidemiology of Urolithiasis in an Ethnically Diverse Population Living in The Same Area. **Urology Journal**. v. 13, p. 2754-2758, 2016
- Dar, M., Denstedt, J.D., Imaging in diagnosis, treatment, and follow-up of stone patients. **Advances in Chronic Kidney Diseases**. v. 16, p. 39-47, 2009.
- Djojodimedjo, T., Soebadi, D.M., *Escherichia coli* infection induces mucosal damage and expression of proteins promoting urinary stone formation. **Urolithiasis**. v. 41, p. 295- 301, 2013.
- Elkoushy, M.A., et al. Determinants of urolithiasis before and after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. **Urology**. v. 84, p. 22-26, 2014.
- Evan, Andrew P. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. **Pediatric Nephrology**. v. 25, p. 831-841, 2010.
- Eskandarifar, A. et al. Effect of urinary tract infection on the urinary metabolic characteristic as a risk factor in producing urolithiasis. **International Journal of Medical Research e Health Sciences**. v. 5, p. 229-232, 2016.

- Franco, M. et al. Patologia: processos gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 52, p. 106-106, 2010.
- Freitas, A. M., et al. Urolitíase experimental: avaliação do efeitos do chá de quebra-pedra ("*Phyllanthus niruri*"). **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 13, 26-30, 2002.
- Ghalayini, I. F., et al. Prophylaxis and therapeutic effects of raspberry (*Rubus idaeus*) on renal stone formation in Balb/c mice. **International Brazilian Journal of Urology**. v. 37, p. 259-267, 2011.
- Jung, H., Ooster, P.J., Acute management of stones: When to treat or not to treat?. **World Journal of Urology**. v. 33, p. 203-211, 2015.
- Korkes, F., et al. Custo do tratamento hospitalar da litíase urinária para o Sistema Único de Saúde Brasileiro. **Einstein**, v. 9, p. 518-522, 2011.
- Kohri, K., et al. Biomolecular mechanism of urinary stone formation involving osteopontin. **Urological research**. v. 40, p. 623-637, 2010.
- Lieske, J.C., Leonard, R.E.B.B.E.C.C.A., Toback, F.G. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**. v. 268, p. 604-612, 1995.
- Leja, K.B., Czaczyk, K. The industrial potential of herbs and spices—a mini review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**. v. 15, p. 353-365, 2016.
- Lorenzi, H., de Abreu Matos, F. J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2002.
- López, M., Hoppe, B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. **Pediatric nephrology**. v. 25, p. 49, 2010.
- Mariz, S.R., et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 163, p. 372-378, 2006.
- Muslumanoglu A.Y. et al. Updated epidemiologic study of urolithiasis in Turkey. I: Changing characteristics of urolithiasis. **Urology Research**. v. 39, p. 309-314, 2011.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.1. Plantas medicinais e fitoterápicos. 2. **Fitoterapia**. 3. Programas Nacionais de Saúde. I. Título. II. Série
- Mohebbi, N., et al. Tubular and genetic disorders associated with kidney stones. **Urolithiasis**. v. 1, p. 11, 2016.
- Nardoza Junior, A., Reis, R.B., Campos, R.S.M., Manual de Urologia. **PlanMark**, São Paulo, 2010.
- Ortiz, V., Ambrogini, C. Fisiopatologia e tratamento clínico da litíase urinária, **PlanMark**, São Paulo, 2010.
- Owolabi, M. A., Coker, H. A. B., Jaja, S. I. Bioactivity of the phytoconstituents of the leaves of *Persea americana*. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, p. 1130-1135, 2010.
- Pareta, S. K., et al. Aqueous extract of *Boerhaavia diffusa* root ameliorates ethylene glycol-induced hyperoxaluric oxidative stress and renal injury in rat kidney. **Pharmaceutical biology**. v. 49, p. 1224-1233, 2010.
- Pérez Machín, M., et al. Validación de un método *in vivo* para evaluar la actividad diurética. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**. v. 30, p. 332-344, 2011.
- Ramaswamy, K., et al. The elementome of calcium-based urinary stones and its role in urolithiasis. **Nature Reviews Urology**, 2015.

- Rez, P. What does the crystallography of stones tell us about their formation? **Urolithiasis**. p. 1-8, 2016.
- Rodgers, A. L. Physicochemical mechanisms of stone formation. **Urolithiasis**. p. 1-6, 2016.
- Rodgers, A. L. Race, ethnicity and urolithiasis: a critical review. **Urolithiasis**. v. 41, p. 99-103, 2013.
- Romero, V., et al. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. **Reviews in Urology**. v. 12, p. 86-96, 2010.
- Rubin, E. et. al. Rubin patologia: bases clinicopatológicas da medicina. 4 edição. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2006.
- Sebben, S., Polidoro, S., Brum, B. Urolitíase e fatores associados. **Arquivo Catarinense de Medicina**. v. 36, p. 99-106, 2007.
- Scales, C. D., et al. Urologic Diseases in America Project., Prevalence of kidney stones in the United States. **European urology**. v. 62, p. 160-165, 2012.
- Scora, R. W., Bergh, B. O. Origin of and taxonomic relationships within the genus *Persea*. **In Proceedings of the Second World Avocado Congress**. v. 2, p. 505-574, 1992.
- Soucie, J.M., et al. Demographic and geographic variability of kidney stones in the United States. **Kidney international**. v. 46, p. 893-899, 1994.
- Trinchieri, A., et al. Epidemiological trends in urolithiasis: impact on our health care systems. **Urological research**. v. 34, p. 151-156, 2006.
- Trinchieri, A., Epidemiology of urolithiasis: an update. **Clinical cases in mineral and bone metabolism**. v. 5, p. 101-106, 2008.
- Trevisan, L.F.A. et al. Tratamento fitoterápico experimental em ovino acometido por urolitíase obstrutiva. **Agropecuária Técnica**. v. 30, p. 96-101, 2010.
- Vendruscolo, G.S., Mentz, L.A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**. v. 61, p. 83-103, 2006.
- Verkoelen, C.F., Crystal retention in renal stone disease: a crucial role for the glycosaminoglycan hyaluronan? **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 17, p. 1673-1687, 2006.
- Yasui, T. et al. Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis in Japan: national trends between 1965 and 2005. **Urology**. v. 7, p. 209-213, 2005.

AENDICES

Artigo 1: Este trabalho deu origem ao artigo “**Antilithiasis effect of *Persea americana* Mill. in an experimental model**” que será submetido para o periódico “Fitoterapia” (Fator de impacto 3.055, Qualis A2 na área Medicina II).

Normas para publicação disponível:

<https://www.elsevier.com/journals/fitoterapia/0367-326X/guide-for-authors>

Antilithiasis effect of *Persea americana* Mill. in an experimental model

Aline Andrade Martins^a, Enaile Salviano^a, Giselli Karenina Traesel^a, Kamilla Felipe Nascimento^a, Debora Regina Hoff Brait^a, Anelise Samara Nazari Formagio^a, Ariany Carvalho dos Santos^a, Rosevelt Isaias Carvalho de Souza^a, Leticia Ayran Yabunaka^b Marcio Eduardo de Barros^a

^a *Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil*

^b *Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados.*

**Autor para correspondência:*

E-mail address: marciobarros@ufgd.edu.br (M.E. Barros)

ABSTRACT

Leaves of *Persea americana* have been applied in popular medicine for the treatment of kidney stones. However, there are no scientific evidences to support this activity. Aim of the study: To assess the anti-lithiasis activity of the ethanolic extract of *P. Americana* leaves [Avocado]. The study was performed aiming to find the evidences that support the ethnobotanical use of this specie. Material and methods: The ethanolic extract from *P. Americana* (herein named EEPA) was prepared through cold maceration method and evaporated under reduced pressure for solvent elimination. The anti-lithiasis effect was assessed by foreign body model, with implants of calcium oxalate (CaOx) pills into bladders of Wistar rats, what proportioned the formation of gallbladder stones. The anti-lithiasic potential of EEPA was assessed through X-ray images, as well as by the measurements of the pills weights on the day of the implant and at the end of the EEPA treatment, which consisted of 250 mg/Kg for 25 days. Samples of blood, urine and tissues were collected for posterior analyses. Two groups received the ethanolic extract. The group one, named U-EEPA P, received the extract 5 days after the implant for 25 days, for the assessment of the preventive effect against gallbladder stones. The second one, named U-EEPPA T, received the treatment 30 days after the implant in order to assess its influence over the already formed gallbladder stones. At the end of the treatment, the animals were taken to the final X-ray tests to check the pills growth. Results: comparing the X-rays images and the pills weights of both groups, we concluded there was no statistic difference in the calculi growth. On the other hand, the U- EEPA P showed a smaller size on the gallbladder stones in comparison to both U-EEPA T and U- Control groups. Conclusion: EEPA (whose leaves were collected in Dourados – MS city) did not show anti-lithiasis activity with the protocol of 250 mg/Kg for 25 days on the tested models.

Keywords: avocado tree, gallbladder stones, urolithiasis, foreign body model.

1. Introduction

Urolithiasis is the formation of stone concretions in the urinary system and affects both animals and humans worldwide, especially adults[1]. Several factors are bonded to kidney stones, enabling their formation: diets rich in mineral salts and proteins, both metabolic and genetic disturbs, climate, age, sex and bacterial infections[2,3]. In most part of the countries, the prevalence of kidney stones increased over the last 50 years[4]. The recurrence rate during the 3 first years of age is around 40%, what increases up to 70% in 10 years [5].

The most frequent stone in urolithiasis is the calcium oxalate (CaOx), which corresponds to 60% of cases, followed by hydroxyapatite with 20%, uric acid with 7% and struvite with 7%[6,7].

There are no allopathic, homeopathic or herbal medication - neither in human nor in veterinary Medicine – that are efficient and specific for elimination and prevention of these stones[8].

Based on the stories related to the popular use of *Persea americana* Mill (Lauraceae) [“Avocado”] in the treatment of kidney diseases since the 70’s [9], also considering its ethnobotanical information pointing to the diuretic activity of the leaf infusion for the treatment of kidney stone[10,11,12], this study aimed to assess the action of the ethanolic extract of *P. americana* over the formation of bladder stones over *in vivo* experimental models.

2. Materials and Methods

2.1 Botanical material

The leaves of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) were collected in April, 2015, from the orchard of Federal University of Grande Dourados – UFGD, Mato Grosso do Sul state, Brazil (22°14’S and 54°49’W.Gr). The botanical material identification was made by Professor Zefa Valdevina Pereira, who also lodged an exsiccata of the leaves to UFGD’s Herbarium (DDMS 5450).

2.3 Preparation of *P. americana* ethanolic extract (PAEE)

Green leaves of *P. americana* were dried in air circulating heater at 95°F for 48 hours and chopped in a knife mill. The obtained powder was exhaustively macerated in ethanol 95% at room temperature, filtered off and rotoevaporated under reduced pressure at 113°F.

2.4 Animals

For *in vivo* experimental models, we used male *Rattus norvegicus*, Wistar lineage (8-10 weeks old, weight 230 – 260 g). The rats were divided into five different experimental groups (six animals per group). This study was approved by the Animal Experimentation Committee from UFGD under the protocol 31/2015. The animals furnished by UFGD's Central Viverium were kept under controlled conditions (71.6 °F; 40-60% humidity and a cycle dark-light of 12 h). They were individually identified and each group was kept in polypropylene cages (six per cage) with food and water *ad libitum*.

2.5 Anti-lithiasis Activity

2.5.1 Experimental Groups

As we mentioned, groups were divided into five (six animals each). Herein, they were named as:

- **Naive Group** = did not receive any treatment
- **PAEE Group** = received PAEE 250 mg/kg per day via intragastric gavage method during 25 days;
- **U-Control Group** = surgery for pill implant + 5 days of recovery + 1,0 mL saline solution per day via intragastric gavage during 25 days;
- **U-PAEE P** (prevention) Group = surgery for pill implant + 5 days of recovery + 250 mg/kg extract per day via intragastric gavage method during 25 days;
- **U-PAEE T** (treatment) = surgery for pill implant + 5 days of recovery + 25 days for pill growing + on the 30th day after surgery, 250 mg/g of extract per day via intragastric gavage method during 25 days;

2.6 Administration of PAEE

PAEE was diluted in 0.09% physiologic solution daily through ultrasound probe each day in necessary doses. The PAEE administration was done at the end of the dark cycle, orally, via gavage method.

2.7 Preparation of Calcium Oxalate pills

Calcium oxalate (CaOx) pills were obtained through supersaturation, by adding 23.34g calcium chloride and 19.92 g potassium oxalate mixed by constant grip to 300 mL distilled water during 2 h under agitation at 167 °F, and mixture was kept under agitation at 167 °F and rinsed 10 times for removing the excess of potassium chloride.

The resulting mixture was placed in a greenhouse at 98.6 °F for 2 weeks for the crystal growing and then

transferred to molds (4mm diameter per 1mm height) in order to obtain the CaOx crystal pills. They were weighed and sterilized with ethylene oxide prior to use [13].

2.8 Surgical Implant

The surgical procedure for the pills implant was performed according to the protocol described by Barros [13] in the groups U-Control, U-PAEE P and U-PAEE T. The anesthesia and analgesia chosen was xylazine (8 to 15 mg/kg) associated to ketamine (60 to 80mg/kg) via intraperitoneal injection according to Oliveira[14]. After the anesthesia and cleaning of the abdomen, a 2cm-extension incision encompassing skin, muscle and peritoneum was done. With the help of abdominal retractors, these structures remained separated to enable the exhibition of the bladder outside the cavity. With a surgical clamp and a fine tipped scissors, a small incision in the bladder was done for the CaOx crystal pill introduction. Bladder was sutured with surgical nylon 6.0 with simple stitches. Peritoneum, muscle and skin were sutured with simple stitches with surgical nylon 3.0.

Immediately after the surgery, the rats were given analgesic sodium dipyrone 150mg/kg (via subcutaneous injection). The same procedure happened after 24h in order to assure a good post surgery healing. Animals were kept in a thermal blanket for 2 h with a controlled temperature of 95 °F until the total recovery of anesthesia, inside collective cages. We next performed the initial X-rays of the introduced calculi.

2.9 Sample collection, Biochemical Analyses, Calculi Analyses and X-Ray

During all the experiment, we observed the rats' consumption of water and food, as well as their weight evolution. Animals were weighed once a week and water and food content were daily checked.

The experimental groups Naive, U-Control and U- PAEE P went through 24h- urine collection in metabolic cages to assess (1) urine's volume, density and pH, via reagent strips; (2) urea, via kinetic method and (3) creatinine, via Jaffe's kinetic method.

After urine's collection, U-Control and U-PAEE P groups were taken to final X-Ray tests, using FCR Prima Fugi Film 100 ma device, with unique laterolateral projection of the abdominal cavity in a 0.02 millisecond scanning. Afterwards, animals were anaesthetized with xylazine (8 to 15 mg/Kg) associated to ketamine (60 to 80mg/Kg) via intraperitoneal injection and blood collected via cardiac puncture (1-2mL volume), used for serum dosage of urea, creatinine, sodium, potassium and magnesium via kinetic methods, specific for each analysis.

After the euthanasia due to anesthetic overdose, incisions in the rats' bladder were made in order to remove the

formed calculi, which were washed with distilled water, measured, weighed and photographed. The organs - liver, right kidney and bladder - were also removed for histopathological analyses.

After 30 days of surgery, U-PAEE T group started PAEE treatment via gavage method for 25 days. After this period, the same procedures were performed with this experimental group.

2.10 Statistical Analysis

Results are shown as means \pm standard error of the mean (SEM). Normality of samples was proved via Kolmogorov-Smirnov test. Variance analysis (ANOVA) was used to compare the answers among the groups. Means were compared via Tukey test. P values inferior to 0.05 were established as criteria of statistic significance. Statistic analyses were done with GraphPad Prism software, version 5.00 for Windows.

3.Results and Discussion

3.1 Weight evolution and Consumption of water/food

Weight evolution data are available in Table 1. PAEE group presented final weight superior to U-Control's. In relation to the percentage of body weight gain, data show a significant difference between groups U-PAEE-P and U-PAEE-T in comparison to Naive group, although the values did not differ when compared to U-Control group. Despite the weight variation among the groups, there was no significant difference in the consumption of water and food. Experimental groups which showed smaller weight were the ones surgically manipulated; data analysis showed they did not gain weight during the first 7 days after the surgery, although after this period there was some weight evolution.

The stagnation of weight on the animals surgically treated may be due to the inflammatory process of the surgical wound, once in this process high levels of tumor necrosis factors are produced, among other interleukins that may cause weight loss. The same happens with the elevation of leptine, which, in high levels, induce body to energy loss, catabolism of thin mass and the sensation of fullness, leading to weight loss [15].

Table 1. Physiological habits: body weight gain and consumption of water/food of rats orally treated with ethanolic extract of *P. americana* leaves and control animals

Groups	Naïve	PAEE	U- Control	U-PAEE P	U-PAEE T
Initial weight (g)	235,5 ± 6,29	229,7 ± 7,02	223,3 ± 8,50	242,7 ± 8,13	244,2 ± 7,46
Final weight (g)	355,8 ± 8,75	353,3 ± 6,83 [#]	290,2 ± 13,55	280,8 ± 15,48*	311,8 ± 6,37
Body weight gain (%)	51,33 ± 3,43	52,97 ± 6,71 [#]	27,68 ± 3,52	15,24 ± 3,91*	29,57 ± 5,10*
Food consumption (g/day)	50,9 ± 2,88	45,85 ± 3,78	48,16 ± 2,28	47,57 ± 3,11	46,19 ± 1,96
Water consumption (mL/day)	66,67 ± 8,81	60,0 ± 15,28	38,0 ± 5,83	58,00 ± 11,58	56,00 ± 8,71

Values are expressed as means, ± standard error of the mean;

* $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey) when compared to Naive group.

[#] $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey) when compared to U- Control.

3.2 X-Ray analysis

Figure 1 presents the comparison of the pills size between U-Control group and the treatment groups U-PAEE P and UPAEE T, assessed through X-Ray (Figure 2). Once it is a low-cost test, easily available and quickly performed, simple X-Ray of abdomen is still a very useful test, once around 60 to 95% of calculi contain calcium, which is radiopaque and potentially visualized when bigger than 3mm diameter [16].

The final size of the pills extracted from U-PAEE P and U-PAEE T groups did not show significant difference when compared to U-Control, though U-PAEE P group shows a slight tendency to decrease, especially when compared to U-PAEE T, which was treated after 30 days of calculus formation and growing, what indicated that the anti-lithiasis effect did not succeed in that dose, model and time.

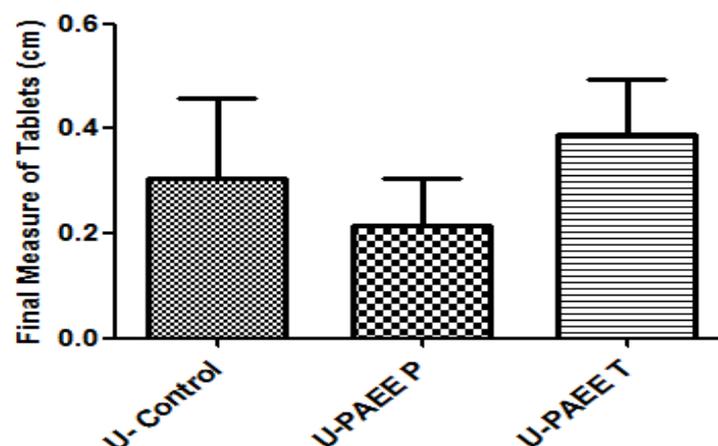


Figure 1.

Comparative analysis of pills of U-Control group in relation to U-PAEE P's and U-PAEE T's groups, from X-ray abdominal images. Pills of U-EEPA P group showed a slight decrease when compared to U-Control, but with no statistical significance. Values expressed as means \pm standard error of the mean.

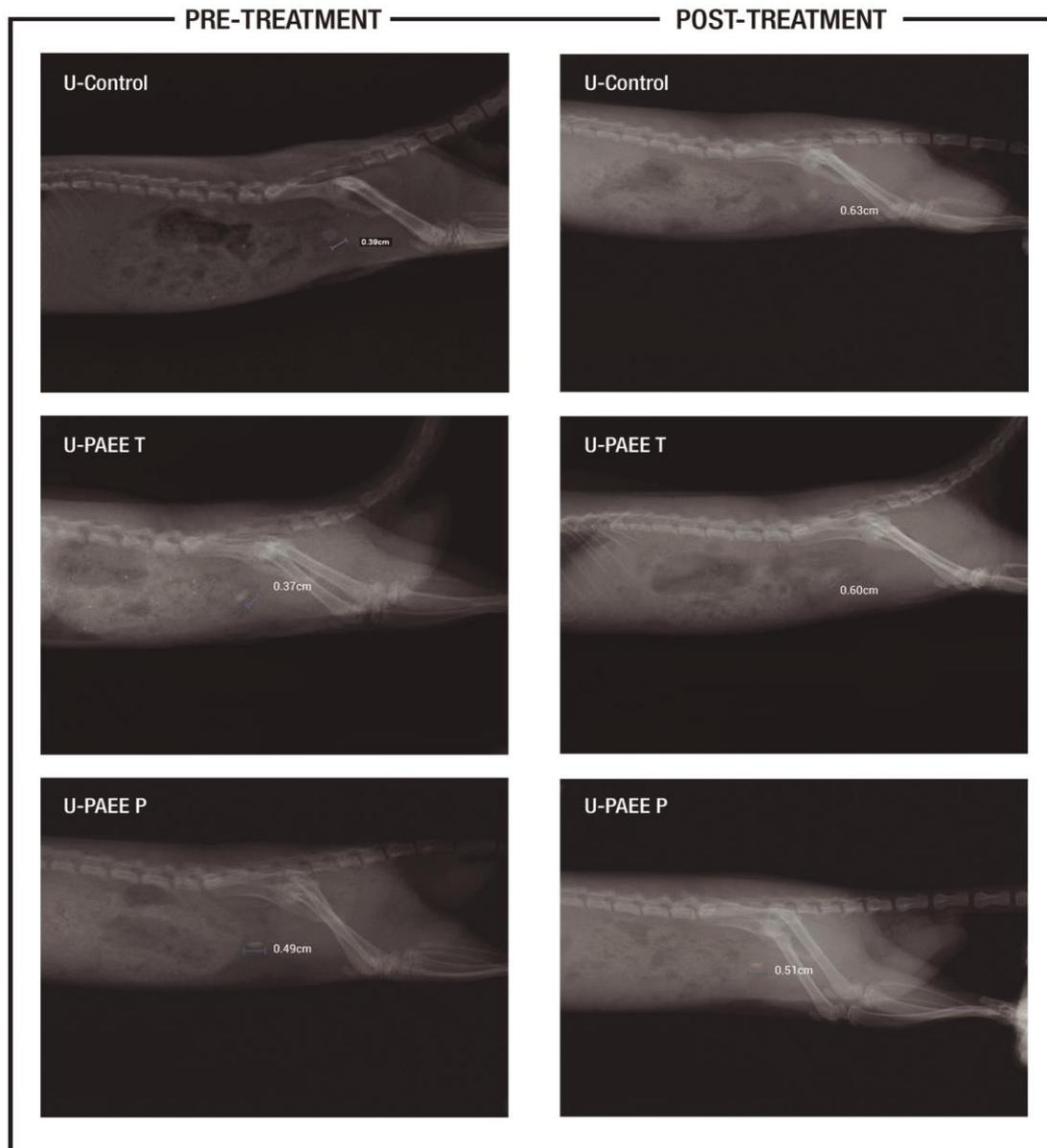


Figure 2. X-Ray Images of laterolateral of abdominal cavity – comparison of the size of the pills between the beginning and end of the experiment.

3.4 Analysis of the pills' final weight

The pills weights of the groups treated with PAEE did not show a significant difference when compared to U-Control (Figure 3). As for the pills size, the U-PAEE P's pills weight shows a tendency to reduction when compared to other groups, though statistically insignificant.

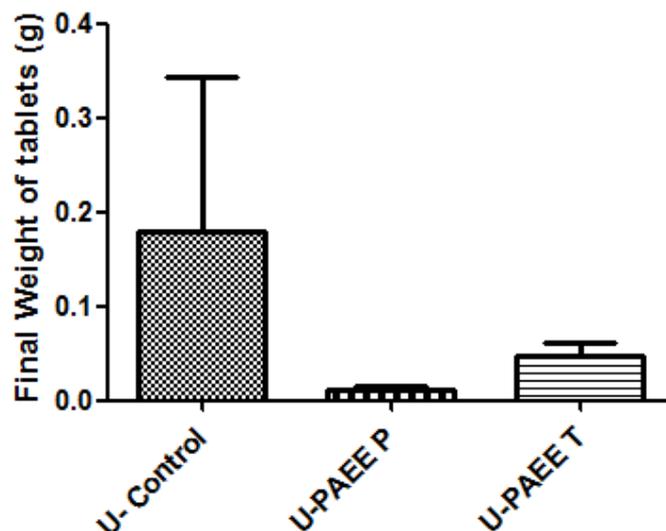


Figure 3. Mean of pills' final weight – groups did not show significant difference. Values expressed as means \pm standard error of the mean.

3.3 Biochemical parameters of urine and serum

Table 2 shows the biochemical results from serum analysis. Group U-PAEE T showed a significant difference in urea's levels in relation to Naive group, however, these values do not represent clinical importance, once they are normal according to reference values for this animal species[17,18,19].

Table 2. Biochemical parameters of serum – rats treated with ethanolic extract of *P. americana* and controls.

Serum Doses	Naive	PAEE	U-Control	U-PAEE P	U-PAEE T
Na (mmol/dL)	112,5 \pm 7,39	108,2 \pm 14,7	130,3 \pm 3,60	134,0 \pm 2,44	122,4 \pm 4,86
K (mmol/dL)	4,08 \pm 0,31	4,06 \pm 0,43	4,54 \pm 0,34	4,88 \pm 0,37	5,00 \pm 0,20
Ca (mg/dL)	8,63 \pm 1,27	7,600 \pm 1,30	9,36 \pm 0,49	9,58 \pm 0,45	8,44 \pm 0,29
Urea (mg/dL)	27,03 \pm 3,37	27,57 \pm 6,02	34,90 \pm 1,23	29,22 \pm 1,69	40,92 \pm 2,8*
Mg ⁺ (mg/dL)	2,41 \pm 0,45	2,20 \pm 0,33	3,26 \pm 0,17	2,79 \pm 0,17	2,36 \pm 0,10
Creatinine(mg/dL0 (mg/dL)	0,26 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04	0,40 \pm 0,04	0,31 \pm 0,02	0,28 \pm 0,00

Values expressed as means \pm standard error of the mean.

* $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey) when compared to Naive.

The complexity of the substances present in urine and the multiple conditions of minimum saturation work together for the crystallization process. The action over one (or both) factor may reduce the risk of crystal formation[20]. Table 3 shows such parameters.

In standardized diuresis test [21] described the diuretic potential of *P. americana* ethanolic extract compared to the action Furosemide. In this study, they did not use the specific protocols of diuresis tests, thus, urine excretion was similar in both tests and control groups. Measurements of urinary excretion were done through metabolic cage collection during 24 h, prior to euthanasia.

Table 3. Urinary parameters of urine samples from rats treated with ethanolic extract of *P. Americana* and control groups

Urinary Parametrs	Naive	PAEE	U-Control	U-PAEE P	U-PAEE T
Volume (ml)	45,33 ±6,883	42,67 ±15,07	29,40 ±4,915	46,00 ±7,071	40,80 ±7,605
Density	1007 ±1,054	1007 ±1,667	1009 ±2,267	1009 ±1,000	1006 ±1,871
Ph	7,167 ±0,166	7,000 ± 0,0	7,400 ±0,244	7,200 ±0,200	7,000 ± 0,0
Urea (mg/dL)	1660 ±5.342	1099 ±1,742	1937 ±3,471	1501 ±2,044	1767 ±4,757
Creatinine (mg/dL)	27,60 ±6,557	20,27 ±4,187	37,04 ±7,886	27,74 ±2,567	31,54 ±6,825

Values expressed as means ± standard error of the mean;

* $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey) when compared to Naive.

3.4 Histopathological analysis of the organs

The values of PAEE groups, U-PAEE P and U-PAEE T did not show significant difference when compared to Naive and U-Control groups. U-PAEE P showed an increase on the relative kidney weight in comparison to Naive, however with no significant changes in relation to U-Control. Dantas [17] reported a research they performed with male rats with relative kidney weight of 0,61g/100g of body weight. Based on such information, the changes on kidney weights of U-PAEE P rats (even insignificant in relation to Naive group) are among the reference values presented in researches for physiological parameter in rats, despite the insignificant difference when compared to control animals manipulated, who also received the pill implant.

Liver and bladder weights did not show significant changes neither in treated nor in control groups.

Table 4. Relative weight (g/100g) of the organs of rats orally treated with ethanolic extract of *P. americana* and Control groups.

Organ	NAIVE	PAEE	U- Control	U-PAEE P	U-PAEE T
Liver	2,494 ±0,085	2,524 ±0,050	2,582 ± 0,031	2,665 ±0,185	2,703 ±0,077
Kidney	0,309 ± 0,008	0,327 ±0,004	0,359 ± 0,012	0,379±0,014*	0,339 ±0,011
Bladder	0,041 ± 0,002	0,050 ±0,013	0,096 ± 0,034	0,053 ±0,003	0,080 ±0,017

Values expressed as means ± standard error of the mean.

* $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey) when compared to Naive.

Table 5 contains the histological analyses. We observed areas of squamous metaplasia in the bladder of the rats that went through surgery. Analysis showed the bladder lining epithelium (transitional epithelium) is replaced by a squamous stratified epithelium. Metaplasia is a reversible transformation in which an adult cell type (epithelial or mesenchymal) is replaced by another cell type. In this kind of cellular adaptation, a cell sensible to a determined stimulus is replaced by another cell type with a better ability of withstand that hostile environment [22]. Cellular replacement may be related to surgical wound healing or to mechanical stress caused by the calculus.

Histological changes in kidney and bladder on animals possessing CaOx pills were also reported by Barros [13] in an experiment with a foreign body model with bladder calculus, what suggested that this tissue replacement was a response to the mechanical stress provoked by the CaOx pill growing.

Table 5. Histopathological analysis of the organs of control groups and groups treated with PAEE .

Group	Animals with changes (in	Histopathology
Naive	Zero	No changes
PAEE	Zero	No changes
U- Control	1	kidney: small foci of mononuclear inflammatory infiltrates
	4	bladder: focal areas and extensive areas of squamous metaplasia (squamous stratified epithelium)
U-PAEE P	2	Bladder: extensive areas of squamous metaplasia
	2	Kidney: mild dilation of renal tubules (TCP e TCD);
U-PAEE T	1	Liver: mild degeneration of hepatocytes in center-lobular region;
	2	Bladder: focal areas and extensive areas of squamous metaplasia (squamous epithelium)

4. Conclusion

From the results of this research, we concluded that the PAEE samples on tested doses did not show neither a preventive nor therapeutic potential for the treatment of bladder calculus for the tested model. Although we did not obtain the expected results in statistical significance, we observed that calculi of U-PAEE P group, treated right after the pill implant were smaller than the ones found in U-Control and U-PAEE T, indicating that new studies are necessary to assess the anti-lithiasis potential of the *P. americana* leaves.

Author contributions

AAM and KFN collected the plant samples; AAM, MEB designed the study; AAM, KFN and ASNF conducted the extraction of PAEE. AAM, ES, DRHB, GKT, ACS, RICS, LAY participated in the anti-lithiasic activity and analyzes of the materials. All authors participated in the design, interpretation, and analysis of the

data and approved the final manuscript.

Conflict of interest

Authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, Brazil, 59/300.029/2015), Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), UFGD (Universidade Federal da Grande Dourados) and HU Dourados (Hospital Universitário da Grande Dourados) for their financial support and fellowships.

References

- [1] Kan WC, Chou YH, Chiu SJ, Hsu YW, Lu HF, Hsu W, Chang WC, Study of the association between ITPKC genetic polymorphisms and calcium nephrolithiasis, *BioMed Research International* 2014. (2014).
- [2] Verkoelen, C.F, Crystal retention in renal stone disease: a crucial role for the glycosaminoglycan hyaluronan?, *Journal of the American Society of Nephrology*. 17 (2006) 1673-1687.
- [3] Shafi, H., Shahandeh, Z., Heidari, B., Sedigiani, F., Ramaji, A. A., Pasha, Y. R. Y., Mir, M. M. R. A, Bacteriological study and structural composition of staghorn stones removed by the anatomic nephrolithotomic procedure, *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 24 (2013) 418.
- [4] Coe, F. L., Worcester, E. M., Evan, A. P, Idiopathic hypercalciuria and formation of calcium renal stones, *Nature Reviews Nephrology*. 12 (2016) 519-533.
- [5] Ramaswamy, K., Killilea, D. W., Kapahi, P., Kahn, A. J., Chi, T., Stoller, M. L, The elementome of calcium-based urinary stones and its role in urolithiasis, *Nature reviews Urology*. 12(2015) 543.
- [6] Ortiz V, Ambrogini C. Fisiopatologia e tratamento clínico da litíase urinária. Nardoza Júnior A, Zerati Filho M, Reis RB. *Urologia Fundamental*, Planmark, São Paulo, 2010, pp.119-25.
- [7] Nardoza Junior, A., Reis, R.B., Campos, R.S.M, *Manual de Urologia*. Planmark, São Paulo, 2010..
- [8] Trevisan, L.F.A., de Melo, M.A., Pereira, A.V., de Lima, E.Q., Rodrigues, O.G., Pereira, M.D.S.V., Albuquerque, A.C.L, Tratamento fitoterápico experimental em ovino acometido por urolitíase obstrutiva, *Agropecuária Técnica*. 30 (2010) 96-101.
- [9] Balmé, F, *Plantas Mediciniais*. Editora Hemus, São Paulo, 1978.
- [10] Berg, V.D.M.E., Silva, M.H.L.D, Contribuição ao conhecimento da flora medicinal de Roraima, *Acta Amazônica*. 18 (1998) 23-35.
- [11] Vendruscolo, G.S., Mentz, L.A, Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por

moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Iheringia Série Botânica. 61(2006) 83-103.

[12]Calábria, L., Cuba, G.T., Hwang, S.M., Marra, J.C.F., Mendonça, M.F., Nascimento, R.C., Oliveira, M.R., Porto, J.P.M., Santos, D.F., Silva, B.L., Soares, T.F, Ethnobotanical and ethnopharmacological survey of medicinal plants in Indianópolis, Minas Gerais, Brazil, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2 (2008).

[13]Barros, M., Lima, R., Mercuri, L., P., Matos, J., R., Schor, N., Boim, M, Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis, Urological Research. 34 (2006) 351-357.

[14]Oliveira, H. P, Protocolos Anestésicos comumente utilizados em animais de pequeno porte. CETEA-UFMG. 2015.

[15]Paschoalini, M. A., Raschocowetzki, A. M., Pereira, I. S., Nobre, J. Q. S., Marques, L. B., Silva, T, Regulação do peso corporal. Seminário de interação sobre os aspectos morfofuncionais orais de clínica médica e de saúde pública, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. 76 (2005).

[16]Heilberg, I. P, Treatment of patients with uric acid stones, Urolithiasis. 44 (2016) 57-63.

[17]Dantas, J. A., Ambiel, C. R., Cuman, R. K. N., Baroni, S., Amado, C. A. B, Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Acta Scientiarum, Health Sciences. 28(2008) 165-170.

[18]Branco, A. C. D. S. C., Diniz, M. D. F. F. M., de Almeida, R. N., Santos, H. B., de Oliveira, K. M., do Amaral Ramalho, J., Dantas, J. G, Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* do biotério professor Thomas George, Revista Brasileira de Ciências da Saúde. 15 (2011) 209-214.

[19]Lima, C. M., Lima, A. K., Melo, M. G. D., Dória, G. A. A., Serafini, M. R., Albuquerque-Júnior, R. L. C. Araújo, A. A. S, Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes, Scientia Plena. 10 (2014).

[20]Heilberg, I. P., Schor, N, Litíase renal: fisiopatogenia e tratamento, Jornal Brasileiro de Nefrologia. 16 (1994) 125-33.

[21]Pérez Machín, M., Sueiro Oyarzun, M.L., Boffill Cárdenas, M.D.L.A., Morón Rodríguez, F.J., Marrero Faz, E, Validación de un método in vivo para evaluar la actividad diurética, Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 30 (2011) 332-344.

[22]Zachary, J.F., McGavin, M.D, Bases da patologia em veterinária, Elsevier, Brasil, 2012.

6.ANEXOS

6.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 19 de maio de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito terapêutico da *Persea americana* sobre a formação e composição de cálculos em modelo de litíase urinária”, registrada sob o protocolo de nº 31/2015, sob a responsabilidade de *Marcio Eduardo de Barros e Aline Andrade Martins* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 30/11/2015.

<i>Finalidade</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ensino () Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	20/06/2016 a 20/02/2017
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
<i>Nº de animais</i>	24
<i>Peso/idade</i>	190-250 g
<i>Sexo</i>	Machos
<i>Origem</i>	Biotério da Universidade Federal da Grande Dourados

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

11 de Janeiro de 2018 14:29

 <small>Universidade Federal da Grande Dourados</small>	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS REITORIA - COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE BIBLIOTECA	
Declaração de situação regular de empréstimos Declaramos para fins institucionais da Universidade Federal da Grande Dourados, que ALINE ANDRADE MARTINS , cartão nº (2015002230), categoria Acadêmicos de pós-graduação, vinculado ao curso/órgão CIENCIAS DA SAUDE , não possui empréstimos atrasados até a data 11 de Janeiro de 2018 às 14:29 Hrs. O documento é verdadeiro e dou fé! <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; font-size: small;"> A autenticidade desse documento pode ser confirmada no endereço http://sistemas.ufgd.edu.br/webdoc, por meio do Código de Controle: 646.887.892.000 - Data: 11/01/2018 - Hora: 14:33. </div>		
Coordenadoria de Serviços de Biblioteca da UFGD. Divisão de Atendimento ao Usuário. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitária, Cx. Postal 533 - CEP 79804-970 Dourados (MS). (67) 3410-2511 e (67) 3410-2519 E-mail: biblioteca.atendimento@ufgd.edu.br Portal: http://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca		
Via acadêmico/servidor.		

Contatos: DIAU/CSB/RTR/UFGD - (67) 3410-2511/(67) 3410-2519. E-mail: biblioteca.atendimento@ufgd.edu.br

 <small>Universidade Federal da Grande Dourados</small>	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS REITORIA - COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE BIBLIOTECA	
Declaração de situação regular de empréstimos Declaramos para fins institucionais da Universidade Federal da Grande Dourados, que ALINE ANDRADE MARTINS , cartão nº (2015002230), categoria Acadêmicos de pós-graduação, vinculado ao curso/órgão CIENCIAS DA SAUDE , não possui empréstimos atrasados até a data 11 de Janeiro de 2018 às 14:29 Hrs. O documento é verdadeiro e dou fé! <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; font-size: small;"> A autenticidade desse documento pode ser confirmada no endereço http://sistemas.ufgd.edu.br/webdoc, por meio do Código de Controle: 646.887.892.000 - Data: 11/01/2018 - Hora: 14:33. </div>		
Coordenadoria de Serviços de Biblioteca da UFGD. Divisão de Atendimento ao Usuário. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitária, Cx. Postal 533 - CEP 79804-970 Dourados (MS). (67) 3410-2511 e (67) 3410-2519 E-mail: biblioteca.atendimento@ufgd.edu.br Portal: http://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca		
Via institucional (UFGD).		

Contatos: DIAU/CSB/RTR/UFGD - (67) 3410-2511/(67) 3410-2519. E-mail: biblioteca.atendimento@ufgd.edu.br