UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem

**PAPEL DA HEME-OXIGENASE NA PROTEÇÃO PELAS
ESTATINAS NA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA
ISQUÊMICA EM RATOS**

Cláudia Akemi Shibuya

São Paulo
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem

**PAPEL DA HEME-OXIGENASE NA PROTEÇÃO PELAS
ESTATINAS NA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA
ISQUÊMICA EM RATOS**

Cláudia Akemi Shibuya

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde
do Adulto, PROESA, para obtenção do
título de mestre.

Linha de pesquisa: Tecnologia na saúde
do adulto

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de
Fátima Fernandes Vattimo

São Paulo
2006

Dedicatória

Aos meus pais que estão ao meu lado em todos os momentos da minha vida, me dando força, amor e carinho.

Ao Shigueru, que trouxe mais felicidade a minha vida.

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a Maria de Fátima Fernandes Vattimo, pela paciência,
dedicação e apoio constante. Muito obrigada por tudo.

Ao Prof Dr. Antonio Carlos Seguro pelo constante apoio às nossas
pesquisas.

À Prof^a Dr^a Terezila M. Coimbra por ter aberto as portas do seu
laboratório e pelos seus ensinamentos.

Às pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho:
Heloísa (FMUSP-RP), Heloísa (FMUSP-SP), Cleo (FMUSP-RP) e
Giovane.

À minha amiga Miriam, pela imensa contribuição na coleta de dados e
pelo apoio nos momentos difíceis.

Às minhas amigas do LEMA: Carolina, Cassiane, Elisabete, Luciana,
Sara, por toda a contribuição e também pelos momentos agradáveis
que passamos juntas.

Aos meus amigos: Célio, Deisy, Érika, Giane, Helen, Juliana, Kelin,
Patrícia, Regiane, Rita, Silvia, Tekla.

À querida Neusa, que cuida não só do LEMA, mas de todas nós.

Aos meus irmãos e demais familiares, pela compreensão e apoio.

À chefia do Hospital Santa Catarina.

Shibuya CA. Papel da heme-oxigenase na proteção pelas estatinas na insuficiência renal aguda isquêmica em ratos. [dissertação] São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2006.

RESUMO

O inibidor de HMG redutase (estatina) pode ter papel protetor na função renal por estimulação da atividade de HO-1. Este estudo foi desenvolvido para avaliar se a associação desses dois agentes poderia induzir um efeito mais pronunciado sobre a função renal (FR) após insuficiência renal aguda isquêmica. A isquemia foi obtida por meio do clampeamento dos pedículos renais bilaterais por 30 minutos, seguida de reperusão. Foram utilizados ratos wistar, machos, pesando entre 250-300g, distribuídos nos grupos: SHAM (controle, sem clampeamento renal); Isquemia; Estatina (animais que receberam 0,5 mg/kg, via oral, v.o., por 3 dias); Isquemia+Estatina; Hemin (indutor de HO-1, 1 mg/100g, i.p., 24h antes da cirurgia); Isquemia+Hemin; SnPP (inibidor de HO-1, 2µmol/kg i.p. 24h antes da cirurgia); Isquemia+SnPP; Estatina+Hemin; Isquemia+Estatina+Hemin; Estatina+SnPP; Isquemia+Estatina+SnPP. Foram avaliados a função renal (FR) (clearance de creatinina, método Jaffé), a excreção de peróxidos urinário (FOX-2), a osmolalidade urinária (osmômetro) e a imunohistoquímica para ED-1. Os resultados mostraram que a estatina otimizou a FR e reduziu a excreção de peróxidos urinários. A indução da HO-1 apresentou padrão similar ao descrito para estatina. A associação de estatina+Hemin induziu melhora de FR, com melhora de função tubular e redução de peróxidos discretamente superior àquela demonstrada pelos tratamentos isolados. A substituição do Hemin pelo SnPP no modelo de associação não pareceu ter inibido o efeito da estatina. Em síntese, o estudo confirmou o efeito antioxidante da estatina e do Hemin com proteção da FR pelos métodos utilizados. Os resultados da imunohistoquímica ED-1 para macrófagos/monócitos não foram conclusivos.

Palavras-chave: Insuficiência renal aguda. Isquemia. Estatina. Heme-oxigenase. Antioxidante. Antiinflamatório.

ABSTRACT

HMG-CoA inhibition reductase (statins) can have a protector role on renal function by stimulating HO-1 activity. This study was performed in order to evaluate if the association of these two agents could induce a more pronounced effect on RF after ischemic acute renal failure. The ischemia was obtained through clamping of bilateral renal pedicles for 30 minutes followed by reperfusion. Adult Wistar rats, weighting from 250-300g, were divided into twelve groups: SHAM (control); Isch (30' renal ischemia); Stat (statin 0,5mg/kg, p.o.); Isch+Stat (statin 0.5mg/kg, p.o., once a day, 3 days and the Isch); Hemin (HO-1 inducer, hemin, 1.0mg/100g, i.p.); Isch+Hemin (HO-1 inducer, hemin, 1.0mg/100g, i.p., once, 24hours before Isch); SnPP (2 μ mol/kg, i.p.); Isch+SnPP (HO-1 inhibitor, 2 μ mol/kg, i.p., as hemin); Stat+Hemin; Isch+Stat+Hemin (all treatments as described); Stat+SnPP; Isch+Stat+SnPP (all treatments as described). Creatinin clearance (crCl), urinary peroxides (UP), osmolality (Osm) and immunohistochemical for ED-1 analyses were performed in order to evaluate oxidant and inflammatory responses. Results have shown that Stat could protect RF and peroxide excretion probably attenuating tubular damage. HO-1 presented a similar pattern to that described for statin. Instead, when Hemin or SnPP was associated to Statin, no benefit was observed neither to RF nor to UP. Immunohistochemical ED-1 for macrophages/monocytes analysis were inconclusive.

Keywords: Acute renal failure. Ischemia. Statin. Heme-oxygenase. Antioxidant. Antiinflammatory

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Materiais	20
3.1.1 Reagentes	20
3.1.2 Animais	20
3.1.3 Apresentação dos grupos experimentais	21
3.2 Métodos	24
3.2.1 Função renal	24
3.2.2 Peróxidos urinários	25
3.2.3 Osmolalidade urinária	27
3.2.4 Imunohistoquímica	27
3.3 Local	28
3.4 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Insuficiência Renal Aguda (IRA) é uma síndrome caracterizada pelo rápido declínio na taxa de filtração glomerular e retenção de escórias nitrogenadas, tais como a uréia nitrogenada sanguínea (BUN) e a creatinina (Brady et al., 2000).

A síndrome acomete mais o paciente idoso (média de 67 anos) e não há diferença referente a sexo. O índice de mortalidade intra-hospitalar é de 60,3%, sendo no Brasil 76,8% (Kelly, 2003; Uchino et al., 2005).

A isquemia, a causa mais comum de IRA (Hill-Kapturczak, Chang, Agarwal, 2002), representa 72% dos casos e está relacionada a grandes cirurgias, trauma, hipovolemia severa, sepse e queimaduras (Brady et al., 2000).

A IRA isquêmica constitui um problema clínico importante, em parte porque não há, até o momento, terapias de resgate funcional. O cenário atual evoluiu em favor de terapias de suporte, destacando-se as modalidades dialíticas (Gueler et al, 2002; Leonard et al., 2002).

Contudo, as restrições no controle da IRA extrapolam a ausência de tratamento específico e incluem, a dificuldade em comparar resultados, o desconhecimento acerca dos mecanismos fisiopatológicos predominantes e a definição de biomarcadores com bom desempenho discriminatório para disfunção. Este estudo destacará aspectos fisiopatológicos da síndrome com ênfase ao desequilíbrio redox e o seu componente inflamatório.

A fisiopatologia da Isquemia/Reperusão (I/R) é multifatorial, envolvendo uma somatória de eventos hemodinâmicos, tubulares, celulares e moleculares que levam à súbita queda do ritmo de filtração glomerular (Gueler et al., 2002; Leonard et al, 2002; Ventura et al., 2002). Fazem parte destes eventos a vasoconstrição intrarenal, o dano intracelular com depleção de ATP, o acúmulo de Ca intracelular, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), a ativação de fosfolipase e alterações da membrana lipídica (Gueler et al., 2002; Leonard et al., 2002).

Além disso, o binômio isquemia-reperusão determina alterações funcionais que se mantêm mesmo após o restabelecimento da perfusão do órgão. Após o insulto inicial, o fluxo sanguíneo renal permanece diminuído por determinado tempo em decorrência de um mecanismo vasoconstritor autônomo. Os principais mediadores implicados na gênese desta vasoconstrição são o aumento na produção de agentes vasoconstritores como a endotelina e a diminuição na produção de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (Brady et al., 2000).

Apesar da diversidade de eventos fisiopatológicos envolvidos na gênese da IRA, ainda não é possível isolá-los ou agrupá-los por predominância ou gravidade na manifestação da lesão.

A seqüência de eventos oxidativos desencadeados pela isquemia caracteriza-se pelos baixos níveis de ATP que induzem disfunção da Na-K-ATPase, causando edema e rotura nuclear e mitocondrial na célula tubular. Conseqüentemente, ocorre um aumento do cálcio

intracelular, que por sua vez ativa enzimas proteolíticas levando à alterações no citoesqueleto. Os níveis de xantina oxidase e hipoxantina se elevam e exacerbam a produção de radicais livres durante a reperfusão tecidual. Esses radicais livres promovem peroxidação lipídica de membranas, causando quebra da integridade estrutural da célula (Brady et al., 2000).

A disfunção tubular é a responsável pela manutenção da IRA após o insulto. A obstrução tubular associada ao aumento na pressão intratubular e o vazamento do filtrado tubular para o interstício renal são os mecanismos tubulares envolvidos na fisiopatologia da IRA (Brady et al., 2000; Yu et al., 2000).

Os componentes inflamatórios e o estresse oxidativo, pela inquestionável relação com a manutenção da disfunção após o insulto isquêmico, serão comentados a seguir.

A isquemia aguda leva a ativação do endotélio com um aumento na permeabilidade e expressão de diferentes moléculas de adesão (Gueler et al., 2004).

Essas moléculas são essenciais para o recrutamento e infiltração de células efetoras para dentro do tecido isquêmico. Fatores de transcrição, tais como fator nuclear- κ B (NF- κ B), são induzidos e ativados, levando ao aumento da expressão de genes inflamatórios. As células endoteliais perdem suas propriedades antiadesivas e desenvolvem uma superfície trombogênica e adesiva (Gueler et al., 2004).

Além disso, a inflamação está relacionada ao aumento da expressão renal de citocinas, incluindo fator- α necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ , fator de estimulação de granulócito-macrófago, interleucina (IL)-1, IL-2 e IL-8. Essas citocinas ativam leucócitos e aumentam a expressão de moléculas de adesão endotelial tais como ICAM-1 e selectinas (P e E) (Brady et al., 2000; Bonventre, Zuk, 2004; Roelofs et al., 2005).

Os leucócitos ativados estão envolvidos com a lesão renal por meio de vários mecanismos: liberação de substâncias tóxicas, como espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas e vasoconstritores, que ampliam a reação inflamatória local e contribuem também, indiretamente, para o insulto tubular, prolongando a hipoperfusão na medula externa que segue um insulto isquêmico ou tóxico perpetuando a isquemia (Brady et al., 2000).

Essa hipoperfusão pode ser provocada de duas maneiras:

- 1) O insulto ao endotélio capilar mediado por leucócito pode exacerbar a congestão da circulação causada por agregação plaquetária e células vermelhas;

- 2) Leucócitos ativados exacerbam a vasoconstrição intrarenal pela liberação de fatores vasoativos incluindo tromboxane A₂, leucotrieno B₄ e PAF (fator de ativação plaquetária) (Brady et al., 2000).

Nesse contexto inflamatório, a estatina (Hidroxil-3-metilglutaril coenzima A inibidor de redutase), uma droga utilizada para diminuir

os níveis de colesterol e largamente administrada a pacientes dislipidêmicos, tem sido citada pela sua ação antiinflamatória e, portanto, protetora de lesão renal causada na I/R (Gueler et al., 2002; Zoja et al., 2002; Inman et al 2003).

Evidências recentes sugerem que a estatina pode prevenir reações vasculares inflamatórias em humanos e em modelos animais, independentemente do seu efeito redutor de colesterol (Gueler et al., 2002; Inman et al., 2003).

Gueler et al., 2002, observou que o tratamento por três dias com esse agente melhorou a função renal por necrose tubular aguda pós-isquêmica e limitou consideravelmente o dano estrutural. Histologicamente observou-se diminuição do dano no seguimento S3 do túbulo proximal na medula externa, área mais suscetível a hipoperfusão e hipóxia.

Recentes evidências têm demonstrado direta influência da estatina no sistema de sinalização intracelular envolvido na proliferação celular e nas respostas inflamatória e fibrogênica. “In vitro”, a estatina reduziu a proliferação de células mesangiais e células epiteliais tubulares e inibiu a expressão de citocinas como MCP-1(proteína quimioatraente de monócitos-1) (Zoja et al., 2002).

Um provável mediador para a resposta antiinflamatória da estatina seria o sistema enzimático heme-monóxido de carbono.

ERO incluem uma quantidade de moléculas quimicamente reativas, derivadas do oxigênio. Algumas dessas moléculas são

extremamente reativas, tais como radical hidroxil enquanto outras são menos reativas (superóxido e peróxido de hidrogênio). Os radicais livres são moléculas de baixo peso molecular, com elétron não pareado, comumente chamado de ERO (Nordberg, Arnér, 2001; Wardle, 2005).

As ERO são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbios e podem apresentar-se tanto em concentrações fisiológicas necessárias quanto em excessiva quantidade. O desbalanço entre a disponibilidade de antioxidantes endógenos e a geração de ERO caracteriza o estresse oxidativo (Nordberg, Arnér, 2001).

As ERO têm função fisiológica importante, pois participam da defesa do organismo contra microrganismos patogênicos. São produzidas pelos fagócitos e são altamente tóxicas para a bactéria a ser fagocitada (Nordberg, Arnér, 2001).

Porém, quando as ERO são produzidas em quantidades excessivas, devido à reatividade, podem causar dano e são potencialmente tóxicas, mutagênicas ou carcinogênicas (Nordberg, Arnér, 2001).

Por esse motivo, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de desenvolver terapias capazes de reduzir a produção dessas ERO ou eliminá-las do organismo. Neste cenário, os indutores de heme oxigenase têm sido citados também pela ação antioxidante.

A Heme oxigenase (HO) é uma enzima que degrada heme (um potente oxidante) gerador de monóxido de carbono (um gás

vasodilatador que tem propriedades antiinflamatórias), bilirubina (um antioxidante derivado da biliverdina), e ferro (seqüestrado pela ferritina). A heme oxigenase é uma enzima limitante na degradação da cadeia heme, um complexo de átomos ferroso (Fe^{2+}) que funciona como um grupo prostético de várias hemoproteínas, como a hemoglobina e mioglobina que atuam no transporte de oxigênio, ou o citocromo P450 na ativação de oxigênio. Os produtos das suas reações enzimáticas têm importantes funções de citoprotetores, antioxidantes e antiinflamatórios (Agarwal, Nick, 2000; Abraham et al., 2001; Wardle, 2005).

A HO apresenta três isoformas, das quais, duas são bem definidas e a terceira ainda é desconhecida (Amersi et al., 1999).

A heme-oxigenase-1 (HO-1) é a forma induzível da enzima, sendo encontrada em vários tecidos, como rim, fígado e pulmão (Abraham et al., 2001). Sua indução é importante na resposta tecidual ao estresse oxidativo e à inflamação (Agarwal, Nick, 2000). Vários agentes têm sido relacionados à indução da HO-1 incluindo metais pesados, proteínas de choque térmico, radiação, isquemia, hipóxia e nefrotoxicidade (Amersi et al., 1999).

A HO-2 é a forma constitutiva, não induzível, distribuída no cérebro, testículos e vasculatura (Silva et al., 1996; Agarwal, Nick, 2000; Abraham et al., 2001).

Amersi et al., 1999, demonstrou que o aumento da expressão de HO-1, por meio da administração de Hemin, em ratos receptores de

fígado, melhorou a função hepática, preservou a integridade dos hepatócitos e diminuiu a infiltração de células mononucleares inflamatórias, com aumento da sobrevida após o transplante. Já o tratamento com a protoporfirina de zinco (ZnPP), uma metaloporfirina inibidora de HO-1, aboliu os efeitos benéficos.

Estudos utilizando indutores e inibidores de HO-1 têm demonstrado que a expressão de HO-1 em túbulos renais pode ser citoprotetora. A inibição da HO-1 por metaloporfirinas relacionou-se ao aumento do nível de heme desviando a cascata para o agente precursor e reduzindo os sub-produtos, com isso agravando o insulto renal (Hill-Kapturczak, Chang, Agarwal, 2002).

A protoporfirina de estanho (SnPP) é um potente inibidor competitivo de HO, regula a HO por duplo mecanismo de controle: inibe a atividade da enzima HO enquanto aumenta a síntese da proteína enzimática HO. Desse modo, bloqueia a atividade da enzima pré-formada e novamente sintetizada, agindo como inibidor da HO “in vivo” (Kaizu et al., 2003).

Em outro estudo com células LLC-PK₁, Neiva observou que após a administração de Hemin, na vigência de toxicidade por polimixina B, houve aumento da população de células vivas, em relação àquelas submetidas somente ao antibiótico. O inverso ocorreu em relação a apoptose, sugerindo possível efeito protetor da heme oxigenase naquele modelo (Neiva, 2004).

Desta forma, está bem estabelecido o componente inflamatório como evento crítico na IRA isquêmica. O uso de agentes antiinflamatórios tem mostrado resultados promissores na resposta funcional em rins isquêmicos. O efeito pleiotrópico antiinflamatório da estatina tem-se mostrado eficiente na prevenção ou atenuação da disfunção na IRA isquêmica. Não é possível, entretanto, definir em que substratos enzimáticos se sustentam a resposta antiinflamatória otimizada por esses agentes. O sistema heme-monóxido de carbono é a hipótese deste estudo.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do pré-condicionamento com estatina em ratos com IRA isquêmica.
- Verificar a interferência do indutor de HO (Hemin) e do seu inibidor (protoporfirina de estanho) na função renal de ratos com IRA isquêmica.
- Verificar se a HO-1 pode constituir-se em agente mediador do efeito da estatina sobre a função renal de ratos com IRA isquêmica.
- Avaliar a resposta inflamatória nos rins de animais isquêmicos, tratados e não tratados com Estatina e Hemin ou SnPP, por meio de imunohistoquímica..

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema Nanopure da Barnstead.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico da marca Sigma, exceto quando especificado no texto.

3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar, adultos, machos, pesando entre 250 e 300g. Todos os animais tiveram livre acesso à água e alimentos e permaneceram em condições térmicas com ciclos alternados de dia e noite durante todo o experimento.

Os animais foram anestesiados com a solução de hidrato de cloral a 10% (0,1 ml/kg), i.p. (intraperitoneal). Os animais do grupo isquemia foram submetidos à isquemia renal, por meio de dissecação do pedículo renal direito e esquerdo e posterior clampeamento bilateral por 30 minutos, utilizando clamps vasculares não traumáticos. Após esse período, os clamps foram retirados, ocorrendo a reperusão renal. Foi então realizada a sutura do músculo e pele.

Os animais do grupo SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento, porém, apenas com a manipulação delicada dos pedículos renais bilaterais, sem isquemia.

Os animais foram avaliados até a recuperação anestésica e devolvidos ao biotério, onde permaneceram em repouso por 24 horas

para recuperação do ato cirúrgico. Em seguida, foram colocados em gaiolas metabólicas para mensuração do volume de 24 horas e coleta de amostra urinária

Na última etapa, os animais foram anestesiados e submetidos a uma nova laparotomia para coleta de amostra sanguínea por meio de punção da aorta abdominal. Após a coleta de sangue, os rins foram perfundidos com solução salina com tampão fosfato (PBS), depois com solução de formaldeído 4% + Solução salina tampão (PB). Logo após, foi retirado o rim esquerdo de cada animal, que permaneceu por 4 horas em solução de formaldeído 8% sob refrigeração (4°C) e depois 2 horas em Bowin à temperatura ambiente. Por fim, os fragmentos foram imersos em solução de etanol 70%, trocada diariamente, até que ficassem desidratados e foram parafinizados em laboratório de patologia.

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados de acordo com as recomendações para utilização de animais em estudos com fins científicos.

3.1.3 Apresentação dos grupos experimentais

Os animais foram agrupados nos seguintes protocolos:

PROTOCOLO I - Isquemia

Isquemia – animais submetidos a laparotomia para isquemia renal por 30 minutos.

SHAM (controle da isquemia) – animais submetidos a laparotomia com simulação delicada do clampeamento do pedículo renal, sem isquemia.

PROTOCOLO II – Estatina

Isquemia+Estatina – animais isquêmicos que receberam estatina SINVASCOR[®], Baldacci (0,5 mg/kg) por gavagem (v.o.) três dias, no terceiro dia os animais foram submetidos à isquemia renal (Gueler et al., 2002).

Estatina – animais que receberam estatina SINVASCOR, Baldacci (0,5 mg/kg) por gavagem (v.o.) três dias.

PROTOCOLO III – HO

Os animais que receberam o inibidor ou o indutor da HO.

A protoporfirina de estanho (SnPP) é um inibidor seletivo de HO. As famílias compostas de protoporfirinas inibem a atividade de HO-1 com alta especificidade (Miyazano et al., 2002 Kaizu).

O Hemin é considerado como um forte indutor da HO (Silva et al., 2001).

Isquemia+Hemin – animais isquêmicos que receberam Hemin, Fluka Chemin-Sigma Aldrich; Switzerland (1,0 mg/100g, i.p.) 24h antes da cirurgia. (Silva et al., 2001;Watanabe, 2005)

Hemin – animais que receberam Hemin, Fluka Chemin-Sigma Aldrich; Switzerland (1,0 mg/100g, i.p.) .

Isquemia+Protoporfirina de estanho - animais isquêmicos que receberam protoporfirina de estanho (2 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.) 24h antes da cirurgia (Kaizu et al., 2003).

SnPP – animais que receberam protoporfirina de estanho (2 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.).

PROTOCOLO IV – Associação estatina e HO

Isquemia+Hemin+estatina – animais isquêmicos que receberam estatina (0,5mg/kg) por gavagem (v.o.) três dias e Hemin (1,0 mg/100g i.p.) 24 h antes da cirurgia.

Isquemia+Estatina+Protoporfirina de estanho – animais isquêmicos que receberam estatina (0,5 mg/kg) por gavagem (v.o.) três dias e protoporfirina de estanho (2 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.) 24h antes da cirurgia.

Estatina+Hemin – animais que receberam estatina (0,5mg/kg) por gavagem (v.o.) 3 dias e Hemin (1,0 mg/100g i.p.).

Estatina+Protoporfirina de estanho – animais que receberam estatina (0,5 mg/kg) por gavagem (v.o.) três dias e protoporfirina de estanho (2 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.).

Os animais dos diversos grupos foram submetidos à análise de FR, por clearance de creatinina (Clcr), à mensuração de peróxidos urinários pelo método xilenol laranja (FOX-2), a análise de função tubular por meio da osmolalidade urinária. Com vistas ao estudo da resposta inflamatória, os rins dos animais foram submetidos ao estudo

de imunohistoquímica. Esses métodos serão descritos nas seções que seguem:

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Função renal: Clearance de creatinina

A FR foi avaliada através da metodologia do C_{ler} a partir da mensuração da creatinina plasmática e urinária.

A mensuração da creatinina plasmática e urinária foi realizada através do método de Jaffé (Dorea et al., 1997).

- Dosagem de creatinina plasmática

A primeira etapa para mensuração da creatinina plasmática consistiu na desproteinização do plasma. Neste processo, 0,5 ml de plasma diluídos em 1,5 ml de água destilada (1:5) recebeu 0,25 ml de ácido sulfúrico 0,75 N. A solução final foi homogenizada e centrifugada durante 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante (1,5) foi retirado para a etapa seguinte.

Foram adicionados ao sobrenadante 0,3 ml de hidróxido de sódio 0,75 N e 0,3 ml de ácido pícrico 0,036 M. A solução permaneceu em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente após a homogenização. A leitura para a dosagem da creatinina procedeu-se em espectrofotômetro de absorbância em 520 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

- Dosagem de creatinina urinária

A dosagem de creatinina urinária reuniu 0,05 ml da amostra de urina diluída em 5 ml de água destilada (1:100), acrescentando-se 1 ml de hidróxido de sódio a 0,75 N e 1 ml de ácido pícrico a 0,036 M a solução. Os mesmos procedimentos descritos anteriormente para mensuração da creatinina plasmática foram realizados para leitura da creatinina urinária.

O Clcr foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Clcr} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dl)} \cdot \text{fluxo urinário (ml/min) de 24 horas}}{\text{Creatinina plasmática (mg/dl)}}$$

Os valores do Clcr foram expressos em ml/min.

3.2.2 Método FOX-2 para peróxidos urinários

Os peróxidos são encontrados em todos os fluídos corporais, especialmente na urina e alterações de seus níveis são considerados como marcadores da geração de H_2O_2 ou preditores da extensão da lesão oxidativa *in vivo* (Long, Evans, Halliwell, 1999; Halliwell, Clement, Long, 2000). A mensuração direta de peróxidos pode ser realizada através do método de análise FOX-2 (Halliwell, Gutteridge, 1999a).

O método FOX-2 consistiu na determinação dos níveis de peróxidos através do método ferro-xilenol laranja. Os peróxidos são considerados como potenciais indicadores da formação ou resultantes das moléculas reativas de oxigênio (Gay, Collins, Gebicki, 1999).

Os peróxidos oxidam o íon Fe^{2+} para íon Fe^{3+} quando diluídos em solução ácida, como descrita na reação abaixo:

O xilenol laranja [ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3'' – bis (metilamino) ácido diacético] apresenta alta seletividade para o íon Fe^{3+} produzindo um complexo de coloração azul-arroxeadado ($\alpha=4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Wolff, 1994).

O método de xilenol laranja versão-2 (FOX-2) foi utilizado neste estudo e a preparação da solução obedeceu a seguinte ordem:

- 90 ml de metanol e 10 ml de água bidestilada;
- 100 μM de xilenol laranja;
- 4mM de BHT (2[6] –di-ter-butil-p-cresol);
- 25 mM da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- 250 μM de sulfato ferroso de amônio – (Vetec Química – RJ, Brasil).

A resultante da somatória dos reagentes acima consistiu na solução denominada FOX.

Na etapa seguinte, 100 μl da amostra urinária fresca foi acrescentada em 900 μl da solução FOX-2. A solução foi homogenizada e permaneceu em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 560 nm, após a retirada de resíduos de proteínas ou

outros materiais através da cintrifugação (Wolff, 1994; Long, Evans, Halliwell, 1999).

Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos/grama creatinina (Banerjee et al., 2003; Halliwell et al., 2004).

3.2.3 Osmolalidade urinária

A osmolalidade urinária foi avaliada pelo osmômetro (The advanced osmometer model 3D3), colocando-se 250 µl de urina no aparelho que congela a amostra e depois realiza a leitura.

3.2.4 Imunohistoquímica

Neste estudo foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-ED-1 (macrófagos/monócitos, Serotec, UK).

O tecido renal dos animais foi obtido 48h após o clampeamento dos pedículos renais. No grupo controle, SHAM, o protocolo de retirada do órgão foi mantido.

As secções foram desparafinizadas e receberam coloração de imunohistoquímica. Foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com anticorpo anti-ED1 na diluição 1:1000. As secções para detecção de macrófagos foram previamente imersas em tampão citrato e submetidas à irradiação por microondas por 5 minutos, para

aumentar a recuperação do antígeno. O produto da reação foi detectado por um complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.). A reação de cor foi obtida com 3,3-diamino-benzidina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A.) e o material foi contra-corado com verde de metila, desidratado e montado.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Carl Zeiss Jena, Jenamed – 2).

3.3 Local:

Os estudos de função renal foram realizados no Laboratório de Pesquisa Experimental com Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Investigação Médica (LIM 12) da Faculdade de Medicina da USP-SP.

Os estudos de imunohistoquímica ocorreram no Laboratório de Fisiologia Renal da Faculdade de Medicina da USP/RP.

3.4. Análise estatística

Utilizou-se o método GLM (Anova univariada) e teste de comparações múltiplas ajustadas para Bonferrone. Os resultados foram apresentados como média±desvio padrão. Os valores $p < 0,005$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Função renal

Tabela 1: Resultados referentes à função renal global dos grupos SHAM, Estatina, Hemin, SnPP, Estatina+SnPP e Estatina+Hemin. São Paulo, 2006.

Grupo	Peso (g)	F.U. (ml/min)	Clcr/100g ml/min
SHAM (n=6)	275±12	0,006±0,00 ₁	0,60±0,07
Estatina (n=6)	277±21	0,008±0,00 ₂	0,85±0,19*
Hemin (n=5)	291±5	0,010±0,00 ₁	0,56±0,03
SnPP (n=7)	298±13	0,008±0,00 ₁	0,68±0,07
Estatina+Hemin (n=6)	291±24	0,009±0,00 ₂	0,52±0,08
Estatina+SnPP (n=5)	288±11	0,007±0,00 ₃	0,64±0,06

Sendo: FU – fluxo urinário.

*p<0,005 vs SHAM

Os dados representam média ± desvio padrão

Observa-se na tabela 1 que os animais não apresentaram variações significativas em relação ao peso corporal e ao fluxo urinário nos diversos grupos.

Quanto à função renal (FR), avaliada pelo clearance de creatinina, os grupos controle não apresentaram sinais de disfunção, utilizando-se o grupo SHAM como padrão de normalidade já confirmado em estudos anteriores no laboratório.

Tabela 2: Resultados referentes à função renal global dos grupos SHAM, Isquemia, Estatina, Isquemia + Estatina, Hemin, Isquemia + Hemin, SnPP, Isquemia + SnPP, Estatina + Hemin, Isquemia + Estatina + Hemin, Estatina + SnPP, Isquemia + Estatina + SnPP. São Paulo, 2006.

Grupo	Peso (g)	FU (ml/min)	Clcr/100g (ml/min)
SHAM (n=6)	275±12	0,006±0,001	0,60±0,07
Isquemia (n=7)	287±16	0,013±0,008	0,20±0,02 ^a
Estatina (n=6)	277±21	0,008±0,002	0,85±0,19 ^{ab}
Isquemia+Estatina (n=10)	283±22	0,016±0,011	0,49±0,04 ^{bc}
Hemin (n=5)	291±5	0,010±0,001	0,56±0,03 ^{bc}
Isquemia+Hemin (n=8)	287±8	0,013±0,003	0,46±0,03 ^{bc}
SnPP (n=7)	298±13	0,008±0,001	0,68±0,07 ^{bcd}
Isquemia+SnPP (n=9)	287±23	0,010±0,005	0,33±0,04 ^{acdeg}
Estatina+Hemin (n=6)	291±24	0,009±0,002	0,52±0,08 ^{bcegh}
Isq+Estatina+Hemin (n=6)	296±28	0,008±0,004	0,54±0,07 ^{bch}
Estatina+SnPP (n=5)	288±11	0,007±0,003	0,64±0,06 ^{bcd}
Isq+Estatina+SnPP (n=8)	318±43	0,012±0,009	0,36±0,07 ^{abceigjk}

^a p<0,005 vs SHAM

^b p<0,005 vs Isquemia

^c p<0,005 vs Estatina

^d p<0,005 vs Isquemia+Estatina

^e p<0,005 vs Hemin

^f p<0,005 vs Isquemia+Hemin

^g p<0,005 vs SnPP

^h p<0,005 vs Isquemia+SnPP

ⁱ p<0,005 vs Estatina+Hemin

^j p<0,005 vs Isquemia+Estatina+Hemin

^k p<0,005 vs Estatina+SnPP

Os dados representam média ± desvio padrão.

Observa-se na tabela 2 que houve redução da FR do grupo isquêmico quando comparado ao controle o que, juntamente com a manutenção do parâmetro fluxo urinário, confirmou a ocorrência de IRA não-oligúrica (Isquemia 0,20±0,02 vs SHAM 0,60±0,07 p<0,005).

Todos os grupos controle tratados apresentaram invariavelmente valores de FR superiores aos dos grupos isquêmicos.

Os grupos isquêmicos tratados com Hemin ou Estatina ou com a associação de estatina+Hemin demonstraram FR superior àquela exibida pelos grupos com isquemia não tratados.

A administração de SnPP aos grupos isquêmicos, por outro lado, induziu elevação na FR quando comparado ao Isquemia com significância apenas quando associado à estatina. A comparação entre os grupos Isquemia+Hemin e Isquemia+SnPP demonstrou valores de FR superiores para o grupo tratado com o indutor ($0,46 \pm 0,03$ vs $0,33 \pm 0,04$).

O grupo isquêmico com duplo tratamento Estatina+Hemin apresentou elevação da FR na comparação com os tratamentos isolados, contudo, essa diferença confirmou-se estatisticamente apenas para o grupo Isquemia+Estatina.

O grupo Isquemia + Estatina + SnPP apresentou resultado intermediário quando comparado aos grupos Isquemia e SHAM, pois o seu resultado demonstrou diferença significativa quando comparado a ambos (Isquemia+Estatina+SnPP $0,36 \pm 0,07$; Isquemia $0,20 \pm 0,2$; SHAM $0,60 \pm 0,07$ $p < 0,005$).

Os grupos isquêmicos tratados com a associação Estatina+Hemin ou Estatina+SnPP apresentaram diferença estatisticamente significativa, entre si, em favor do grupo que recebeu o indutor.

4.2 Função tubular

Tabela 3. Resultados referentes à osmolalidade urinária segundo os grupos: SHAM, Isquemia, Isquemia + Estatina, Isquemia + Hemin, Isquemia + SnPP, Isquemia + Estatina + Hemin, Isquemia + Estatina + SnPP. São Paulo, 2006.

Grupo	Osmolalidade urinária (mOsm)
SHAM (n=5)	1793±191
Isquemia (n=5)	766±188 ^a
Estatina (n=5)	1849±71 ^b
Isquemia+Estatina (n=8)	1153±404 ^{ac}
Hemin (n=7)	1536±216 ^b
Isquemia+Hemin (n=5)	1013±211 ^{ac}
SnPP (n=6)	1468±372 ^b
Isquemia+SnPP (n=6)	977±125 ^{acd}
Estatina+Hemin (n=5)	1635±124 ^{bef}
Isquemia+Estatina+Hemin (n=5)	1314±394
Estatina+SnPP (n=4)	1634±242 ^{bf}
Isquemia+Estatina+SnPP (n=5)	1218±274 ^c

^ap<0,005 vs SHAM

^bp<0,005 vs Isquemia

^cp<0,005 vs Estatina

^dp<0,005 vs Hemin

^ep<0,005 vs Isquemia+Hemin

^fp<0,005 vs Isquemia+SnPP

Os dados representam médias ± desvio padrão

Observa-se na tabela 3 que o grupo Isquemia quando comparado ao grupo SHAM apresentou redução significativa da osmolalidade urinária (766±188 vs 1793±191 p<0,005).

Todos os grupos controle tratados apresentaram elevação significativa da osmolalidade quando comparados ao grupo Isquemia.

Os grupos isquêmicos tratados com Estatina, Hemin ou SnPP apresentaram redução significativa da osmolalidade urinária quando comparados ao grupo SHAM (Isquemia + Estatina 1153±404; Isquemia

+ Hemin 1013 ± 211 ; Isquemia + SnPP 977 ± 125 ; SHAM 1793 ± 191 $p < 0,005$).

Observou-se que os grupos isquêmicos tratados com as associações Estatina + Hemin ou Estatina + SnPP apresentaram diferença entre si e com o grupo isquemia, porém, sem confirmação estatística. O mesmo ocorreu quando esses grupos foram comparados com aqueles grupos que receberam tratamento único.

4.3 Peróxidos urinários

Tabela 4: Resultados referentes aos valores de peróxidos urinários segundo os grupos: SHAM, Isquemia, Isquemia + Estatina, Isquemia + Hemin, Isquemia + SnPP, Isquemia + Estatina + Hemin, Isquemia + Estatina + SnPP. São Paulo, 2006.

Grupo	Peróxidos urinários (nmol/ g de creatinina)
SHAM (n=8)	5,6±0,9
Isquemia (n=8)	13,5±0,8 ^a
Isquemia+Estatina (n=8)	7,9±1,0 ^b
Isquemia+ Hemin (n=5)	7,6±1,0 ^b
Isquemia+SnPP (n=5)	11,9±1,1 ^a
Isquemia+Estatina+Hemin (n=6)	11,3±1,1 ^a
Isquemia+Estatina+SnPP (n=8)	11,3±1,1 ^a

^a p,0,005 vs SHAM

^b p<0,005 vs Isquemia

Os dados representam médias ± desvio padrão

O grupo SHAM apresentou valores que foram considerados como referência de normalidade neste estudo para este parâmetro (5,6±0,86).

Observou-se que o grupo Isquemia quando comparado ao grupo controle apresentou elevação significativa dos peróxidos urinários (13,5±0,8 vs 5,6±0,9 p<0,005).

Se por um lado os animais isquêmicos tratados com Estatina ou Hemin isoladamente tiveram uma redução dos peróxidos urinários, com diferença significativa quando comparados ao grupo Isquemia (7,9±1,0; 7,6±1,0; 13,5±0,8, respectivamente p<0,005) por outro lado, demonstraram valores discretamente superiores ao grupo SHAM.

Já os animais isquêmicos tratados com a associação Estatina + Hemin ou Estatina + SnPP obtiveram valores próximos aos do grupo Isquemia (11,3±1,1; 11,3±1,1; 13,5±0,7, respectivamente p<0,005).

Apesar da aparente diferença entre os grupos com duplo tratamento, não se constatou significância quando comparados com os tratamentos isolados.

4.4 Imunohistoquímica ED-1 para macrófagos/monócitos

Tabela 5. Resultados referentes a Imunohistoquímica, segundo os grupos: SHAM, Isquemia, Isquemia + Estatina, Isquemia + Hemin, Isquemia + SnPP, Isquemia + Estatina + Hemin, Isquemia + Estatina + SnPP. São Paulo, 2006.

Grupos	Macrófagos por campo
SHAM (n=3)	2,4±0,6
Isquemia (n=3)	2,9±0,6
Isquemia+Estatina (n=4)	0,5±0,5
Isquemia+Hemin (n=4)	0,6±0,5
Isquemia+SnPP (n=5)	0,8±0,5
Isquemia+Estatina+Hemin (n=4)	1,6±0,5
Isquemia+Estatina+SnPP (n=4)	2,8±0,5

Os dados representam média ± desvio padrão

Como pode ser observado na tabela 5 e na figura 1, todos os grupos apresentaram pequeno infiltrado de macrófagos por campo, mesmo o grupo isquemia (2,9±0,6), não havendo diferença significativa entre os grupos.

Figura 1. Infiltração renal por ED-1-macrófagos monócitos positivo. (A) SHAM e (B) Isquemia. Aumento, x280.

(A)

(B)

Quadro 1. Quadro síntese esquemático dos resultados apresentados referentes à função renal (FR), função tubular (Osm), excreção de peróxidos urinários (PU) e imunohistoquímica ED-1 para macrófagos/monócitos dos grupos SHAM, Isquemia e Isquemia tratados.

Grupo	FR	Osm	PU	Imunohistoquímica
SHAM	≈	≈	≈	≈
Isquemia	↓	↓	↑	≈
Isq+Estatina	↑	↑≈	↓	≈
Isq+Hemin	↑	↑≈	↓	≈
Isq+SnPP	≈	≈	↑	≈
Isq+Est+Hemin	↑↑	↑≈	↑	≈
Isq+Est+SnPP	↑	↑≈	↑	≈

Sendo ≈ não se alterou; ↑ elevação; ↓ redução; ↑↑ maior elevação; ↑≈ elevação sem significância estatística.

5 DISCUSSÃO

A IRA é caracterizada pela súbita perda da capacidade dos rins de excretar escórias, concentrar urina, conservar eletrólitos e manter o balanço hídrico. Constitui um problema clínico importante principalmente em unidades de terapia intensiva, onde a mortalidade gira em torno de 50 a 80% (Kelly, 2003; Schrier et al., 2004).

Nos últimos 30 anos, desde o advento de métodos dialíticos, avanços nessa área que caracterizem diferenças significativas no controle da síndrome ainda são inconsistentes. Nesse sentido, diversos estudos têm sido feitos com o objetivo de desenvolver intervenções terapêuticas para prevenir ou acelerar o restabelecimento do paciente com IRA (Lieberthal, Nigam, 2000).

Nessa seqüência, alguns medicamentos passaram a compor o cenário terapêutico na busca pelo seu controle clínico. Muitos deles têm sido citados por resultados não relacionados à proposta primária de formulação. Entre os agentes que demonstraram que esses efeitos pleiotrópicos poderiam ser benéficos no controle da síndrome isquemia-reperfusão renal, destaca-se atualmente a estatina.

Estudos reiteram o poder da estatina como agente renoprotetor por sua ação antiinflamatória e antioxidante, dois significativos mecanismos de lesão descritos para essa síndrome. Além disso, o seu efeito antiinflamatório também tem sido relacionado à redução da rejeição a enxerto (Elisaf, Mikhailidis, 2002).

Entre os efeitos imunomodulatórios da estatina, destacam-se a regulação da expressão do complexo maior de histocompatibilidade II

(MHC II); do antígeno funcional do leucócito (LFA-1), da inibição da adesão e do extravasamento de leucócito endotelial e da atividade de células natural killer; da promoção de célula T-helper (Th1) a Th2, ou da inibição da liberação de citocinas tais como TNF- α , IL-1 β ou IL-6. Estudos mostraram que a estatina desencadeou melhora na encefalite autoimune e em modelos animais de neuroinflamação crônica e esclerose múltipla (Endres, 2005). Há ainda dados que demonstram que a ação protetora da estatina pode estar relacionada à indução da HO. Sugere-se ainda que os achados com a interferência no sistema HO estejam associados não só à ação direta da HO, mas também, de seus subprodutos (Hsu et al, 2006).

Além de indutores enzimáticos, a HO-1 pode ser induzida por uma vasta gama de estímulos, incluindo estresse oxidativo, choque, radiação UV, isquemia-reperfusão, metais pesados, lipopolisacarídeo bacteriano (LPS), citocinas, óxido nítrico e seu próprio substrato heme (Agarwal, Nick, 2000).

Antes, os produtos heme-derivados eram considerados escórias ou produtos tóxicos. Hoje, ao contrário do que se pensava, sabe-se que esses produtos têm propriedades biológicas significantes que incluem além dos efeitos antiinflamatório e antioxidante, também anti-apoptótico, imunomodulatório e a supressão de expressão de moléculas de adesão (Akagi, Takahashi, Sassa, 2001).

Neste estudo, o papel protetor da estatina e da enzima heme-oxigenase foi avaliado utilizando-se o modelo animal de insuficiência

renal aguda isquêmica com clampeamento dos pedículos renais por trinta minutos.

Considerando hipóteses anteriores de que a HO-1 pudesse ser mediadora do efeito antiinflamatório e antioxidante da estatina, foram implementados tratamentos com os reagentes relacionados, de forma isolada ou simultânea. As variáveis avaliadas foram o clearance de creatinina, a osmolalidade urinária, a excreção de peróxidos urinários e foi realizado estudo de imunohistoquímica para macrófagos nos rins dos animais estudados. As metodologias tiveram o objetivo de definir o perfil de lesão envolvidos nessa categoria de IRA. A saber, disfunção glomerular e tubular, provavelmente relacionadas ao desequilíbrio redox e mecanismo inflamatório.

Os dados obtidos mostraram que o tratamento com a estatina foi capaz de proteger significativamente a função renal dos animais isquêmicos. O resultado promissor de proteção de função foi acompanhado por melhora na avaliação de função tubular, porém sem significância estatística.

Na vigência de IRA, quando os néfrons deixam de exercer suas funções (reabsorção de sódio, secreção de potássio, reabsorção de água e concentração da urina), a osmolalidade urinária fica reduzida a níveis plasmáticos (Yu et al., 2000). Essa afirmação também foi contatada no estudo em questão. Clássico exemplo de melhora biológica sem confirmação matemática.

Se por um lado, esperava-se melhora da lesão tubular, com significativa elevação da osmolalidade com a administração de estatina quando comparada ao grupo isquêmico, já que em estudo anterior, Gueler et al., 2002, detectou redução da lesão do túbulo proximal e da medula externa após esse tratamento, por outro lado, se considerada a melhora da função tubular, mesmo sem confirmação estatística, é possível inferir que o tratamento com estatina, de fato, protegeu a função renal com melhora também visível na função tubular.

Os achados otimistas de FR e função tubular foram complementados com a redução da excreção de peróxidos urinários após o tratamento com estatina.

Juntos, os dados obtidos parecem sublinhar o efeito renoprotetor da estatina com provável interferência na cadeia redox.

Os efeitos pleiotrópicos da estatina, foram apresentados anteriormente. Esses efeitos que são tipicamente mediados pela inibição da HMG-CoA redutase, são dose dependente e ocorrem rapidamente após o início do tratamento (Endres, 2005). Estudos demonstram que a redução dos sinais pró-inflamatórios via citocinas e a redução da formação de radicais livres podem estar relacionados a uma restauração na produção de óxido nítrico (NO) dependente de endotélio, por meio da superexpressão gênica da óxido nítrico sintase endotelial e da expressão do ativador de plasminogênio tecidual (Elisaf, Mikhailidis, 2002).

O NO reage com outros radicais livres gerando moléculas menos reativas, funcionando então como varredor de radicais livres e tem sido citado como inibidor da peroxidação lipídica em membranas celulares (Nordberg, Arnér, 2001). Esse achado pode justificar o resultado benéfico da estatina para o parâmetro peróxidos urinários.

Diferentemente, as estatinas têm demonstrado efeito vasodilatador relacionado à redução da reatividade vascular de diferentes vasoconstrictores e a inibição da entrada de cálcio para dentro das células do músculo liso, podendo apresentar efeito antihipertensivo (Elisaf, Mikhailidis, 2002; Donald, 2006). Esses efeitos induziram resposta funcional e estrutural significativas em modelos de síndrome nefrótica com redução da proliferação mesangial (Elisaf, Mikhailidis, 2002). Adicionalmente, a estatina pode suprimir a expressão de citocinas, inibir a fibrose e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e estimular a angiotensina II e a endotelina. (Vidt, 2006).

Avançando neste estudo, o papel da HO na IRA isquêmica e na mediação do efeito protetor da estatina também foi avaliado. Os dados demonstraram que a indução da HO resultou em melhora significativa da FR de ratos pós-isquêmicos. Esse resultado foi acompanhado de recuperação na função tubular, vista pela osmolalidade, porém, sem confirmação estatística. Além disso, à semelhança do que foi exposto para a estatina, a indução de HO determinou redução na resposta

oxidativa dessa lesão. A proteção via antioxição pela HO e seus subprodutos era esperada e será circunstanciada a seguir.

Sabe-se que a indução de HO-1 protege as células do insulto isquemia reperfusão, estresse oxidativo, inflamação, rejeição de enxerto, apoptose e muitas outras condições (Kumar, Bandyopadhyay, 2005). Não está bem definido se esses resultados com a interferência na HO-1 têm relação com a sua atividade ou a de seus subprodutos: o monóxido de carbono (CO), a bilirrubina e a ferritina ou ainda se de toda a cascata.

Estudos mostraram que a inalação do CO pode proteger alguns órgãos contra a rejeição, tais como intestino, pulmão e rim. Essa ação protetora pode estar relacionada à diminuição da inflamação e apoptose (Vera et al., 2005).

O CO controla a atividade de várias heme proteínas, tais como citocromo P-450, ciclooxigenase, guanilil ciclase e NO sintase. O CO ativa o guanilil ciclase pela ligação ao seu sítio ativo. A molécula heme converte guanosina trifosfato a guanosina 3,5-monofosfato cíclico e subseqüentemente causa vasodilatação. Além disso, tem efeito antiinflamatório, inibindo a expressão de citocinas pro-inflamatórias $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, e macrófago inflamatório, proteína-1 β e esse efeito antiinflamatório não ocorre via guanilil ciclase-cGMP ou via óxido nítrico, mas através de via envolvendo proteína quinase mitógeno-ativada (Kumar, Bandyopahyay, 2005).

Outro subproduto da HO também apontado como protetor de lesão é a bilirrubina. Anteriormente, a elevação dos níveis de bilirrubina em pacientes em tratamento com estatina era citada como um marcador de disfunção hepática, porém, hoje, considera-se que altos níveis de bilirrubina podem representar fator protetor adicional contra doença cardiovascular e servir como marcador de redução de risco para doença coronariana por sua ação antioxidante (Hsu et al., 2006).

A bilirrubina é considerada como um antioxidante importante, pois age como varredor de radicais peroxy, além de inibir a peroxidação lipídica em outras etapas (Kumar, Bandyopadhyay, 2005).

Na lesão isquêmica ocorre expressiva liberação de ferro de estoques celulares, estimulando a conversão do H_2O_2 em OH, intensificando a peroxidação lipídica e as reações oxidativas (Halliwell, Gutteridge, 1999b).

A ferritina funciona como um varredor de ferro livre e a sua síntese é regulada ao nível transducional pela concentração de ferro. Quando a concentração celular de ferro está aumentada, a síntese de ferritina é estimulada (Nath, agarwal, Vogt, 1995). Estudos demonstram que a indução de HO estimula a síntese de ferritina (Kumar, Bandyopadhyay, 2005).

Neste estudo, os resultados encontrados com o inibidor de HO, diferentemente do esperado, não demonstraram alterações na FR,

osmolalidade e excreção de peróxido, ou seja, a inibição da HO pela SnPP não promoveu piora nas variáveis estudadas.

Sabe-se que a maioria das metaloporfirinas testadas como inibidoras de HO têm se mostrado inespecíficas. No sentido de tornar a inibição instituída neste estudo a mais específica possível, utilizou-se a SnPP. Esse inibidor tem mostrado efeito superior a outras metaloporfirinas adotadas para a inibição particular da HO-1 (Kaizu et al., 2003).

A SnPP quando administrada isoladamente, na vigência de lesão isquêmica, não induziu piora da FR, dos peróxidos urinários e nem da osmolalidade. Watanabe, 2004, em seu estudo neste mesmo laboratório obteve resultado semelhante com o inibidor de HO-1 Protoporfirina de zinco (ZnPP).

Por fim, foram realizados estudos dos animais que receberam duplo tratamento. Os animais tratados com a associação Estatina+Hemin tiveram melhora da FR quando comparados com o grupo Isquemia e também com os tratamentos isolados com Estatina ou Hemin, porém sem diferença estatística. No parâmetro osmolalidade urinária, as associações mostraram perfil semelhante, pois desencadearam elevação desses valores, porém sem diferença significativa quando comparados aos grupos Isquemia e SHAM.

Diferentemente, quando a SnPP foi associada a Estatina, observou-se que a função renal demonstrou comportamento intermediário, sendo estatisticamente significante para Isquemia e

SHAM. Sugere-se que a SnPP tenha inibido parcialmente a ação da estatina. Para que isso tenha ocorrido, é possível que a ação da estatina sofra alguma interferência da HO que com a administração do inibidor tenha sido parcialmente suprimida. Há que se desenvolver outros estudos voltados para a atividade enzimática individual da estatina e Hemin para que essa hipótese se confirme.

Com relação à excreção de peróxidos urinários, as associações Estatina+Hemin ou Estatina+SnPP determinaram interferência no efeito protetor dos agentes quando administrados isoladamente. Novamente, um achado de elevação na excreção de peróxido sem confirmação de lesão funcional.

Neste estudo, a análise imunohistoquímica ED-1 para macrófagos/monócitos não mostrou resultados relevantes. Os animais isquêmicos, SHAM e aqueles tratados ou não com estatina ou Hemin ou SnPP não demonstraram alterações significativamente diferentes entre si. Esse dado faz crer que, apesar da alteração significativa da função nos animais isquêmicos e tratados, quando comparados com os seus controles, o tempo de isquemia padronizado (30 minutos) não tenha sido suficiente para exacerbar a infiltração de macrófagos. Se isso for verdadeiro, é possível pressupor que a repercussão inflamatória na síndrome isquemia-reperfusão seja tempo-dependente. Estudos que tinham por objetivo avaliar se o efeito renoprotetor da estatina é mediado pela inibição da hidroximetilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) observaram que a infiltração de neutrófilos e macrófagos

em rins pós-isquêmicos não se correlacionou com a severidade da disfunção e que o efeito da estatina pareceu independente da migração de leucócitos (Yokota et al., 2003). Esse achado foi confirmado neste estudo e encontra respaldo em outros estudos que demonstraram que uma isquemia renal bilateral de pelo menos 45 minutos seria necessária para induzir a infiltração de macrófagos (Gueler et al., 2002; Ventura et al., 2002).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se pressupor que a HO exerça alguma interferência no efeito renoprotetor da Estatina, já que quando foi associada a Hemin, o resultado obtido para FR, osmolalidade e peróxidos urinários, foram discretamente superiores. A substituição de Hemin por SnPP na associação com Estatina determinou a tendência a piora da FR, contudo com manutenção da osmolalidade e peróxidos urinários. Esse achado pode referendar os resultados obtidos com Hemin. Há que se considerar que a diferença no perfil funcional induzido quando a estatina foi associada, se não confirma essa interface, é minimamente intrigante. Acredita-se que, o comportamento desigual da estatina quando a HO-1 foi induzida ou inibida, estabelece alguma reação funcional entre esses componentes.

Hsu et al., 2006 confirmou que a estatina pode induzir a atividade da HO em vários órgãos aos níveis de transcrição, translação e catalítico. O autor afirma que uma moderada indução de HO-1 pode

estar relacionada com alguns dos efeitos pleiotrópicos antiinflamatórios e citoprotetor da estatina.

Em síntese, os achados deste estudo permitem concluir que o clampeamento dos pedículos renais bilaterais por 30 minutos causou redução da FR e da osmolalidade urinária, com aumento da peroxidação lipídica, porém sem repercussão inflamatória, representada pela infiltração de macrófagos. Os tratamentos com Estatina ou Hemin mostraram proteção dos parâmetros FR, função tubular e peroxidação lipídica. Os animais isquêmicos tratados com a associação Estatina+Hemin apresentaram elevação da FR, redução da excreção de peróxidos urinários e discreta alteração na osmolalidade. Os animais tratados com a associação Estatina+SnPP tiveram resultado intermediário, com melhora da FR, porém inferior ao valor do grupo SHAM.

O estudo confirmou o efeito renoprotetor da Estatina e do Hemin, contudo, a investigação referente à mediação do efeito da estatina pela HO-1, apesar de resultados sugestivos em favor dessa afirmação, exige novos ensaios para sua confirmação.

6 CONCLUSÕES

- O pré-condicionamento com Estatina induziu melhora da FR, osmolalidade urinária e excreção de peróxidos dos animais com IRA isquêmica.
- A IRA isquêmica demonstrou ser modelo Heme de lesão renal.
- A HO-1 pode constituir-se em agente mediador do efeito renoprotetor da Estatina na IRA isquêmica.
- Não foi possível constatar alterações significativas no infiltrado inflamatório de animais pós-isquêmicos tratado e não tratados.

REFERÊNCIAS

Abraham NG, Lianos E, Li MY, Sabaawy HE, Silva JL, Sng BA. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int* 2001; 59(4):1448-57.

Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(5):965-73.

Agarwal R. Effects of statins on renal function. *Am J Cardiol* 2006; 97(5):748-55.

Akagi R, Takahashi T, Sassa S. Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. *Jpn J Pharmacol* 2002; 88(2):127-32.

Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *The J Clin Invest* 1999; 104(11):1631-9.

Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta* 2003; 334(1/2):205-9.

Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; 66(2):480-5.

Brady HR, Brenner BM, Clarkson MR, Lieberthal W. Acute renal failure. In: Brenner BM, Rector FC Jr, editor. *The kidney*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p.1201-62.

Dorea EL, Yu L, De Castro I, Campos SB, Ori M, Vaccari EM et al. Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8(9):1415-22.

Elisaf M, Mikhailidis DP. Statins and renal function. *Angiol* 2002; 53(5):493-502.

Endres M. Statins: potential new indications in inflammatory conditions. *Atherosclerosis Suppl* 2006; 7(1):31-5.

Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydrogen peroxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem* 1999; 273(2):149-55.

Gueler F, Rong S, Park JK, Fiebeler A, Menne J, Elger M, et al. Postischemic acute renal failure is reduced by short-term statin treatment on a rat model. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(9):2288-98.

Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, Haller H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int* 2004; 66(2):523-27.

Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free radical in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1999a. Determination of free radical and other reactive species: trapping and fingerprinting. p.393-400.

Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free radical in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1999b. Free radical, other reactive species and disease; p.617-58.

Halliwell B, Long LH, Yee TP, Lim S, Kelly R. Establishing biomarkers of oxidative stress: the measurement of hydrogen peroxide in human urine. *Curr Med Chem* 2004; 11(9):1085-92.

Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol* 2002; 21(4):307-21.

Hsu M, Muchova L, Morioka I, Wong RJ, Schröder H, Stevenson DK. Tissue-specific effects of statins on the expression of heme oxygenase-1 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343(3):738-44.

Inman SR, Davis NA, Olson KM, Lukaszek VA. Simvastatin attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats administered Cyclosporine A. *Am J Med Sci* 2003; 326(3):117-21.

Jo SK, Sun F SA, Cho WY, Go KL, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1231-9.

Kaizu T, Tamaki T, Tanaka M, Uchida Y, Tsuchihashi SI, Kawamura A, et al. Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int* 2003; 63(4):1393-403.

Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(6):1549-58.

Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 2005; 157(3):175-88.

Leonard MO, Hannan K, Burne MJ, Lappin DW, Doran P, Coleman P, et al. 15-Epi-16-(Para-Fluorophenoxy)-Lipoxin A4 methylester, a synthetic analogue of 15-epi-Lipoxin A4, is protective in experimental ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(6):1657-62.

Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(1): F1-12.

Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262(3):605-9.

Marsden PA, Hall AV, Brenner BM. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and the kidney. In: Brenner BM, editor. *The kidney*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. v.1.p.735-9.

McCord JM. The evolution of free radical and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108(8):652-9.

Miyazano M, Garat C, Morris KG Jr, Carter EP. Decreased renal heme oxygenase-1 expression contributes to decrease renal function during cirrhosis. *Am J Physiol* 2002; 283(5): F1123-31.

Nath KA, Agarwal A, Vogt BA. Functional consequences of induction of heme oxygenase. In: Goligorsky MS, editor. *Acute renal failure: new concepts and therapeutic strategies*. New York: Churchill Livingstone; 1995. p.97-118.

Neiva LBM. O papel da heme-oxigenase-1 na lesão celular desencadeada pelo sulfato de polimixina B em células LLC-PK1 [dissertação]. São Paulo (SP): Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2004.

Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol & Med* 2001; 31(11):1287-312.

Roelofs JJTH, Rouschop KMA, Leemans JC, Claessen N, Boer AM, Frederiks WM, et al. Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(1):131-40.

Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; 114(1):5-14.

Silva JL, Morishita T, Escalante B, Standiger R, Drummond G, Goligorsky MS, et al. Dual role of heme oxygenase in epithelial cell injury: contrasting effects of short-term and long-term exposure to oxidant stress. *J Lab Clin Med* 1996; 128(3):290-5.

Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabaaway HE, Liaos E, Abraham NG. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int* 2001; 59(4):1448-57.

Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005; 294(7):813-8.

Ventura CG, Coimbra TM, Campos SB, Castro I, Yu L, Seguro AC. Mycophenolate mofetil attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(10):2524-33.

Vera T, Henegar JR, Drummond HA, Rimoldi JM, Stec DE. Protective effect of carbon monoxide-releasing compounds in ischemia-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(4):950-8.

Vidt DG. Inflammation in renal disease. *Am J Cardiol* 2006; 97(2A):20-7.

Wardle EN. Cellular oxidative processes in relation to renal disease. *Am J Nephrol* 2005; 25(1):13-22.

Watanabe M. A isoflavona e o sistema heme-oxigenase na insuficiência renal aguda isquêmica em ratos [dissertação]. São Paulo (SP): Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2005.

Wolff SP. Ferrous ion oxidantion in presence of ferric ion indicator xylenol orange for mensurament of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1994; 233:182-9.

Yokota N, O'Donnell M, Daniels F, Burne-Taney M, Keane W, Kasiske B, et al. Protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor on experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Nephrol* 2003; 23(1):13-7.

Yu L, Burdmann E, Seguro AC, Helou CMB, Zatz R. Insuficiência renal aguda. In: Zatz R editor. *Fisiopatologia renal*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.261-82.

Zoja C, Corna D, Rottoli D, Cattaneo D, Zanchi C, Tomasoni S, et al. Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropaty. *Kidney Int* 2002; 61(5):1635-45.