



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Sueli Aparecida Alves

**Efeito do Cigarro na Nefrotoxicidade
Crônica Causada pela Ciclosporina A em
Ratos**

São José do Rio Preto
2011

Sueli Aparecida Alves

**Efeito do Cigarro na Nefrotoxicidade
Crônica Causada pela Ciclosporina A em
Ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-
graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de A. Burdmann

São José do Rio Preto
2011

Alves, Sueli

Efeito do cigarro na nefrotoxicidade crônica causada pela
Ciclosporina A em ratos/ Sueli Aparecida Alves

São José do Rio Preto, 2011.

60 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José
do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann

1. Ciclosporina; 2. Nefrotoxicidade; 3. Rato; 4. Cigarro.

Sueli Aparecida Alves

**Efeito do Cigarro na Nefrotoxicidade
Crônica Causada pela Ciclosporina A em
Ratos**

**BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

Presidente e Orientador: **Prof. Dr. Emmanuel de A. Burdmann**

2º Examinador: **Prof. Dr.**

3º Examinador: **Prof. Dr.**

Suplentes: **Prof. Dr.**

Prof. Dr.

São José do Rio Preto, ____/____/2011

SUMÁRIO

Dedicatória.....	
Agradecimentos	
Epígrafe	
Lista de Figuras.....	
Lista de Tabelas.....	
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	
Resumo.....	
Abstract.....	
1. Introdução	
1.1. Objetivos	
2. Materiais e Métodos.....	
2.1. Animais e Dieta.....	
2.2. Exposição ao Fumo	
2.3. Tratamento com Ciclosporina A.....	
2.4. Grupos Experimentais.....	
2.5. Filtração Glomerular Renal	
2.6. Estudo Hemodinâmico	
2.7. Dosagem de Ciclosporina A.....	
2.8. Análises Bioquímicas e Hematócrito.....	
2.9. Análise Histológica.....	
2.10. Análise Imuno-histoquímico	
2.11. Análise Estatística.....	

3. Resultados
3.1. Filtração Glomerular Renal
3.2. Hemodinâmica Renal
3.3. Peso
3.4. Dosagem de Ciclosporina no Sangue
3.5. Análises Bioquímicas e Hematócrito
3.6. Fibrose Intersticial
3.7. Imuno-histoquímica
4. Discussão
5. Conclusões
6. Referências Bibliográficas
7. Apêndices
8. Anexos

Dedicatória

- ✓ Ao **Senhor Deus**, que me deu vida, Fé e a Salvação por meio de seu Filho Jesus Cristo. Toda Honra e toda a Glória é só para Ti Senhor, Sou grata por cada dia e cada conquista...
- ✓ A **Eduardo M. Romano**, AMOR da minha vida... Desde o primeiro dia da nossa história estive ao meu lado na realização deste trabalho, com MUITA paciência. Incontáveis vezes me acompanhou, em dias e horários nada convencionais, secou as minhas lágrimas e me abraçou quando as tarefas pareciam difíceis demais... Você é um presente de DEUS para mim.
- ✓ Ao MEU PAI, **Izaldo Alves**, meu exemplo de perseverança, força e sabedoria. Não mediu esforços para realizar seus sonhos por meio dos seus filhos, sem nunca ter nos obrigado a estudar ou trabalhar, mas com seu exemplo genuíno, nos fez AMAR os estudos e o trabalho.
- ✓ A MINHA MÃE, **Aparecida P. Alves**, minha inspiração de mulher, companheira e amiga, sinônimo de lealdade, preocupando-se e cuidando de mim, me fazendo ser criança sempre... Junto ao meu pai, meu exemplo de família...
- ✓ Ao MEU IRMÃO, **João Roberto Alves**, uma espécie de amor que a sua dor é a minha dor e com a sua felicidade eu fico feliz, uma pessoa que posso contar e confiar sempre...

ESTE CONJUNTO É A MINHA RAZÃO DE VIVER FELIZ...

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS,

- ✓ Ao meu orientador, **Prof. Dr. Emmanuel A. Burdmann**, pela oportunidade de trabalhar com alguém especial, que elogia antes de corrigir, que valoriza o esforço, ENSINA com paciência e simplicidade, o que o torna ADMIRÁVEL, demonstrando que SUCESSO combina com HUMILDADE...
- ✓ A **Dr^a. Carla P. Carlos**, você faz parte deste trabalho em toda a sua extensão. Com seu carinho e sua disponibilidade, sempre pronta a dizer “SIM, EU POSSO AJUDAR...” você fez toda a diferença. Hoje você faz parte da minha vida como um exemplo de CARINHO, DEDICAÇÃO e AMIZADE....
- ✓ A **Dr^a. Glória E. F. Mendes**, que me acolheu com carinho e foi a responsável pelos meus primeiros passos em laboratório, com ratos, tubos de ensaio, medos, falta de tempo... Coisas que eu jamais imaginei que fosse conseguir transpor... Esteve ao meu lado quando passei por fases difíceis da minha vida, MUITO OBRIGADA, jamais esqueço...
- ✓ A **Sandra M. Oliveira, Rafael P. S. Souza e Rael L. Matimoto**. Esta excelente equipe que eu tive o privilégio de ter comigo. Trabalharam duro, com muita responsabilidade, sem vocês teria sido MUITO MAIS DIFÍCIL...

- ✓ Aos meus chefes, **Dr. Paulo César B. Saad** e **Dr. Oswaldo S. Taube**, por compreenderem os tantos momentos em que estive pouco disponível e por valorizarem meu trabalho... MUITO OBRIGADA!
- ✓ Aos funcionários da Pós-Graduação **Luiz Henrique Ferreira, José Antonio Silistino** e **Rosimere Cleide S. Desidério** que sempre estiveram dispostos a informar e ajudar, gentil e prontamente em relação às atividades da Pós. Aos demais funcionários, **Fabiana Cristina Godoy** e **Guilherme M. Dias**. MUITO OBRIGADA!
- ✓ Ao **Sr. Luiz Onivaldo Bizuti**, que construiu e deu manutenção à câmara de fumo. MUITO OBRIGADA!
- ✓ A **Prof^a. Dr^a. Terezila M. Coimbra** e a Bióloga Cleonice G. A. Silva do Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela grande colaboração nas reações de imunohistoquímica.
- ✓ Ao Biotério da FAMERP, pelo fornecimento dos animais, a veterinária responsável, **Profa. Dr^a. Débora A. P. C. Zuccari**. Funcionários do Biotério, Pedro José de Freitas, responsável técnico, **Edna Maria Gracioli, Luzia da Silva Viana, Florentino Damaceno de Oliveira** e **Idalina F. M da Silveira**.
- ✓ A **Dr. Marcus Alexandre Mendes Luz**, pela leitura da fibrose intersticial renal.
- ✓ A **Profa. Dr^a. Dorotéia Rossi da Silva Souza**, Departamento de Biologia Molecular, Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular – NPBIM, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto,

pela colaboração nas reações de estresse oxidativo e a funcionária

M.Sc. Marcela Augusta Souza Pinhel.

- ✓ Por fim, aos amigos que continuaram amigos, apesar do distanciamento causado pela falta de tempo. Obrigada por compreenderem e torcerem por mim... Vocês são essenciais...

O único homem que não erra é aquele que nunca faz nada.

Franklin Delano Roosevelt

Se permanecerdes em mim, e as minhas palavras permanecerem em vós,
pedireis o que quiserdes, e vos será feito.

João 15:7

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fibrose Intersticial Renal.....
- Figura 2.** Expressão de α -SMA túbulo intersticial.....
- Figura 3.** Expressão de α -SMA periglomerular.....
- Figura 4.** Fotomicrografias das reações imuno-histoquímicas no córtex renal para α -SMA.....
- Figura 5.** Expressão de Nitrotirosina.....
- Figura 6.** Fotomicrografias das reações imuno-histoquímicas no córtex renal para Nitrotirosina.....
- Figura 7.** Expressão de Vimentina.....
- Figura 6.** Fotomicrografias das reações imuno-histoquímicas no córtex renal para Vimentina.....

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Função e Hemodinâmica renal.....
- Tabela 2.** Peso, análises bioquímicas e hematócrito.....
- Tabela 3.** Função e hemodinâmica renal.....
- Tabela 4.** Peso, análises bioquímicas e hematócrito.....
- Tabela 5.** Análise histológica e imunohistoquímica.....

Introdução: A nefrotoxicidade crônica induzida pela ciclosporina A (CsA) é caracterizada por disfunção renal e fibrose tubulointersticial irreversível. Associado ao uso da CsA, o hábito de fumar é um fator de risco que reduz a taxa de filtração glomerular, aumenta a resistência vascular renal, deteriora a função renal e causa alterações morfológicas como glomeruloesclerose e dano tubulointersticial. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da exposição prévia à fumaça do cigarro sobre as alterações renais funcionais e estruturais induzidas pela CsA em um modelo experimental de nefrotoxicidade crônica. **Material e Método:** Ratos machos, Munich-Wistar, 180-200 g, divididos em quatro grupos de 10 animais (CsA/F, CsA/S, VH/F e VH/S), foram expostos à fumaça de cigarros (câmara de Fumo - F) ou procedimento SHAM (câmara de fumo sem os cigarros - S) por 10 minutos, duas vezes/dia, durante 20 semanas, com três cigarros cada exposição. Receberam dieta hipossódica da 16^a a 20^a semana, e na 17^a semana foi administrada a CsA (2,5mg/Kg/dia; subcutânea) ou o veículo (VH), por 28 dias. Após 24 horas da última injeção, os animais foram anestesiados e os seguintes estudos realizados: filtração glomerular renal - FGR (clearance de inulina); fluxo sanguíneo renal – FSR e resistência vascular renal - RVR (Ultra-som Doppler); histologia renal (% de fibrose, Sistema de Merz), nível de CsA sanguínea (radioimunoensaio, ng/ml) e imuno-histoquímica para α -SMA, nitrotirosina e vimentina. Na análise estatística foi utilizado ANOVA + teste Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis + teste Dunn. **Resultados:** Os grupos que utilizaram CsA apresentaram queda na FGR (CsA/F $0,39 \pm 0,03$

vs VH $0,83 \pm 0,15$ vs CsA/S $0,53 \pm 0,05$; $***p < 0,001$), no FSR (CsA/F $3,9 \pm 0,4$ vs VH $6,7 \pm 1,0$ vs CsA/S $3,8 \pm 0,6$; $p < 0,001$) e aumento da RVR (CsA/F 26 ± 2 vs VH 17 ± 3 vs CsA/S 27 ± 3 ; $p < 0,001$), aumento da fibrose intersticial (CsA/F 17 ± 3 vs VH 3 ± 2 e CsA/S 21 ± 8 vs VH 3 ± 2 ; $p < 0,001$), da expressão de α -SMA túbulo intersticial (CsA/F $1,8 \pm 0,3$ vs VH $0,8 \pm 0,3$ vs CsA/S $1,7 \pm 0,4$; $p < 0,001$) e periglomerular (CsA/F $1,0 \pm 0,4$ vs VH $0,3 \pm 0,3$, $p < 0,001$, CsA/S $0,5 \pm 0,1$ vs VH $0,3 \pm 0,1$; $p < 0,05$), e da expressão da nitrotirosina (CsA/F $3 \pm 0,3$ vs VH $2,3 \pm 0,4$; $p < 0,01$) e vimentina (CsA/F $0,4 \pm 0,4$ vs VH $0,0 \pm 0,0$; $p < 0,05$ e CsA/S $0,5 \pm 0,6$ vs VH $0,0 \pm 0,0$; $p < 0,01$). Com a utilização do fumo, houve piora na queda da FGR (CsA/F $0,4 \pm 0,03$ vs CsA/S $0,5 \pm 0,0$; $*p < 0,05$), aumento da expressão da α -SMA periglomerular (CsA/F $1,0 \pm 0,4$ vs CsA/S $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,01$) e da nitrotirosina (CsA/F $3 \pm 0,3$ vs CsA/S $2 \pm 0,2$; $p < 0,05$). **Conclusões:** O fumo agrava significativamente o declínio da FGR, a lesão estrutural renal e o estresse oxidativo causados pela CsA.

Palavras-Chave: 1. Ciclosporina; 2. Nefrotoxicidade; 3. Rato; 4. Cigarro.

Abstract

Introduction: Chronic nephrotoxicity induced by cyclosporine A (CsA) is characterized by renal dysfunction and irreversible tubulointerstitial fibrosis. Associated with the use of CsA, the habit of smoking is a risk factor that reduces the glomerular filtration rate, renal vascular resistance increases, deteriorating renal function and also causes morphological changes such as glomerulosclerosis and tubulointerstitial damage. **Objective:** The aim of this study was to assess the effects of previous cigarette smoke exposure on CsA-induced renal functional and structural changes in a consistent experimental model of chronic CsA nephrotoxicity. **Methods:** Wistar male Munich-Wistar, 180-200 g were divided into four groups of 10 animals (CsA/SC, CsA/S, VH/SC and VH/S) were exposed to cigarette smoke (Smoke chamber - SC) or sham procedure (chamber without smoke cigarettes - S) for 10 minutes twice a day for 20 weeks, with three cigarettes each exposure. Received a low sodium diet from 16th to 20th week and at week 17 was administered to CsA (2.5 mg/kg/day subcutaneously) or vehicle (VH) for 28 days. After 24 hours the last injection, the animals were anesthetized and the following studies: renal glomerular filtration - RGF (inulin clearance), renal blood flow - RBF and renal vascular resistance - RVR (Doppler ultrasound), renal histology (% System Merz), CsA blood level (radioimunoensaio, ng / ml) and immunohistochemistry for α -SMA, vimentin and nitrotyrosine. **Statistical analysis:** Results are presented as mean \pm SD. ANOVA + Newman-Keuls test or Kruskal-Wallis test + Dunn. Statistical significance was set at $P < 0.05$. **Results:** The group that used CsA decreased in GFR (CsA/SC $0,39 \pm 0,03$ vs VH $0,83 \pm 0,15$ vs CsA/S

0,53 ± 0,05; ***p<0,001), the RBF (CsA/SC 3,9 ± 0,4 vs VH 6,7 ± 1,0 vs CsA/S 3,8 ± 0,6; p < 0,001) and increased RVR (CsA/SC 26 ± 2 vs VH 17 ± 3 vs CsA/S 27 ± 3; p < 0,001). There was also an increase of interstitial fibrosis (CsA/SC 17 ± 3 vs VH 3 ± 2 e CsA/S 21 ± 8 vs VH 3 ± 2; p<0,001), expression of tubulointerstitial α -SMA (CsA/SC 1,8 ± 0,3 vs VH 0,8 ± 0,3 vs CsA/S 1,7 ± 0,4; p<0,001) and periglomerular α -SMA (CsA/SC 1,0 ± 0,4 vs VH 0,3 ± 0,3, p < 0,001, CsA/S 0,5 ± 0,1 vs VH 0,3 ± 0,1; p<0,05) and expression of vimentin (CsA/SC 0,4 ± 0,4 vs VH 0,0 ± 0,0; p < 0,05 e CsA/S 0,5 ± 0,6 vs VH 0,0 ± 0,0; p < 0,01) and nitrotyrosine (CsA/SC 3 ± 0,3 vs VH 2,3 ± 0,4; p<0,01). With the use of tobacco, worsened in the fall of GFR (CsA/SC 0,4 ± 0,03 vs CsA/S 0,5 ± 0,0; *p<0,05), increased expression of α -SMA periglomerular (CsA/SC 1,0 ± 0,4 vs CsA/S 0,5 ± 0,1; p<0,01) and nitrotyrosine (CsA/SC 3 ± 0,3 vs CsA/S 2 ± 0,2; p<0,05). **Conclusion:** In conclusion, CS aggravated significantly CsA-induced GFR impairment, periglomerular structural lesion and oxidative stress in a rat model of CsA nephrotoxicity.

Key-words: 1. Cyclosporine; 2. Nephrotoxicity; 3. Rats; 4. Cigarette.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor utilizado como terapia profilática anti-rejeição. Sendo uma substância lipossolúvel, é prontamente absorvida e distribuída, alcançando concentrações teciduais elevadas.⁽¹⁻³⁾ Foi descoberta por Borel, na década de 70, durante o estudo de fármacos antifúngicos e observou-se que a CsA tinha pequena atividade para este fim, mas possuía notável efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos.⁽⁴⁻⁵⁾ A partir dessas observações, a droga foi aprovada para uso clínico na década de 80.

O uso clínico da CsA revolucionou o campo dos transplantes de órgãos, reduzindo significativamente a morbidade e a incidência de rejeição, especialmente em transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea. Vários trabalhos mostraram que o fármaco era efetivo também no tratamento das doenças auto-imunes, como uveíte, psoríase, asma brônquica, artrite reumatóide, lúpus eritematoso e síndrome nefrótica de diversas etiologias.⁽⁶⁻¹¹⁾ Sua utilização aumentou a taxa de sobrevivência do tecido transplantado e a qualidade de vida dos pacientes.⁽¹²⁻¹⁴⁾ A grande utilização da CsA na prática clínica atual faz com que um número crescente de pacientes seja exposto ao fármaco.

A atividade imunossupressora da CsA tem efeito inibitório sobre a proliferação dos clones de células T, atuando em dois locais diferentes. O principal efeito é a inibição da via de transcrição para a síntese de linfocinas, especialmente a interleucina-2 (IL-2). A droga pode também inibir a expressão

de receptores para a IL-2 nas células que respondem a esta linfocina. ⁽²⁾ O efeito inibitório sobre a produção de IL-2 deve-se à ação relativamente seletiva sobre a transcrição do gene desta interleucina. A interação entre o antígeno e o receptor das células T aumenta o cálcio intracelular pela via do trifosfato de inositol. O cálcio liga-se a calmodulina, estimulando a calcineurina, uma fosfatase cálcio-dependente, que promove a desfosforilação do componente citosólico do NFTA (fator nuclear dos linfócitos T ativados). Consequentemente, o NFTA entra no núcleo e forma complexos com os componentes nucleares, necessários à ativação completa das células T, incluindo a ativação dos genes para a formação da IL-2 e outras linfocinas. A CsA liga-se a uma proteína citosólica denominada ciclofilina; esse complexo liga-se à calcineurina, inibindo a atividade enzimática da calcineurina. Ocorre, conseqüentemente, o bloqueio da desfosforilação do fator nuclear citosólico dos linfócitos T ativados (NFTAc), o qual não entra no núcleo da célula, interferindo, assim, na ativação da célula T e na produção de IL-2 e de outras linfocinas. ⁽²⁻³⁾

Com a inibição da calcineurina, outros genes, além da IL-2, sofrem alterações na sua transcrição, como os de outras interleucinas, do receptor para IL-2, da sintase do óxido nítrico (NOS), do fator β transformador do crescimento (TGF- β), da endotelina, do colágeno I e II. É possível que a inibição da calcineurina, que bloqueia a resposta imune mediada por células contra o tecido transplantado, ocorra em outros genes ao mesmo tempo, podendo desencadear uma seqüência de eventos indesejáveis que resultarão na toxicidade renal. ⁽¹⁵⁾

Embora o uso da CsA seja largamente difundido, sabe-se que sua utilização causa importantes efeitos adversos, entre eles a síndrome urêmica, hipertensão, distúrbios eletrolíticos, dislipidemia, hiperplasia gengival, hipertricose, aumento do risco de eventos cardiovasculares e nefrotoxicidade.^(12,14)

O efeito tóxico mais grave e limitante do uso da CsA é a nefrotoxicidade, que pode causar comprometimento renal crônico evolutivo.⁽³⁾ A nefrotoxicidade induzida pela CsA pode manifestar-se como uma disfunção renal aguda ou uma nefropatia crônica. Na fase aguda observa-se o declínio progressivo e severo da taxa de filtração glomerular, com vasoconstrição arteriolar aferente, que também se observa em pequenas artérias adjacentes, incluindo os capilares glomerulares.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Ocorre, neste caso, uma anormalidade renal reversível por um desbalanço entre os mediadores vasoconstritores e os vasodilatadores, com aumento da resistência vascular renal e diminuição do fluxo sanguíneo renal.⁽¹²⁾ O mecanismo preciso dessa vasoconstrição permanece indeterminado, e existe um grande interesse dos pesquisadores em determinar qual ou quais mecanismos estão envolvidos na nefrotoxicidade aguda causada pelo uso da CsA. Existem vários possíveis mediadores, porém o bloqueio isolado de nenhum deles foi capaz de proteger completamente a função renal. A patogênese da vasoconstrição causada pela CsA é complexa e multifatorial, ocorrendo por meio da lesão endotelial e do desequilíbrio entre sistemas vasodilatadores e vasoconstritores.⁽¹⁸⁾

Os mediadores que têm sido implicados nesse efeito vasoconstritor são o aumento da atividade do sistema nervoso simpático,⁽¹⁹⁾ o aumento da liberação

renal e sistêmica da endotelina,⁽²⁰⁾ o aumento da produção de tromboxano A₂, a redução de prostaglandinas vasodilatadoras,⁽²¹⁻²⁴⁾ perturbações no relaxamento vascular dependente de óxido nítrico,⁽²⁵⁻²⁶⁾ a ativação do sistema renina-angiotensina, o fator ativador de plaquetas, a geração de radicais livres de oxigênio, a adenosina, o efeito direto da droga na musculatura vascular, entre outros.⁽²⁷⁻²⁸⁾

Enquanto a nefrotoxicidade aguda é do tipo funcional e reversível, a crônica é caracterizada por alterações histológicas típicas como fibrose tubulointersticial irreversível e hialinose da parede da arteríola aferente.⁽¹²⁻¹⁴⁾ O uso crônico da CsA determina alterações renais caracterizadas por atrofia tubular, dilatação tubular e fibrose intersticial irreversível com aspecto em faixas, comprometendo os raios medulares e, progressivamente, o córtex renal, geralmente acompanhado por alterações na função renal. Ocorrem alterações das túnicas média, muscular e íntima da arteríola aferente e de pequenas artérias, desde depósitos nodulares de material hialino até necrose da parede, com conseqüente diminuição do lúmen arteriolar. A nefrotoxicidade crônica causada pelo uso da CsA foi descrita em transplantados renais ou não renais, e em pacientes com doença auto-imune que receberam a droga por períodos que variam de seis meses ou mais.⁽²⁹⁻³⁰⁾ Com a interrupção da administração da CsA, observa-se a melhora da filtração glomerular, mas não ocorre a reversão das alterações túbulo intersticiais estruturais.⁽³⁰⁻³²⁾

O desenvolvimento de um modelo de nefrotoxicidade crônica por CsA em ratos, por meio da manobra de restrição de sal na dieta e da utilização de doses da droga próximas àquelas utilizadas em pacientes, permitiu importantes

avanços na compreensão dos possíveis mecanismos da gênese dessa lesão.⁽³¹⁾ Com este modelo, evidenciou-se que a fibrose intersticial produzida pela CsA pode ocorrer mesmo sem alterações de fluxo plasmático renal e que macrófagos e angiotensina II são fatores essenciais para a sua gênese. Através de estudos, principalmente experimentais, observou-se que existe uma dissociação entre os mecanismos causadores das alterações hemodinâmicas glomerulares e os das lesões estruturais desencadeadas pelo uso crônico da CsA.^(3,33-34)

Pacientes em diálise peritoneal, hemodialise ou transplantados que tinham ainda fatores de risco associados tais como idade, *diabets mellitus*, controle da pressão arterial inadequado, dislipidemia e o tabagismo apresentaram mais complicações cardiovasculares e falência renal crônica do que pacientes livres destes fatores de risco.⁽³⁵⁾

Segundo estatísticas da Organização Mundial da Saúde, o número de fumantes no mundo é de um bilhão e duzentos milhões de pessoas (aproximadamente 47% dos homens e 12% das mulheres do mundo fumam). No Brasil este número chega a um terço da população adulta, sendo 11,2 milhões de mulheres e 16,7 milhões de homens.⁽³⁶⁾ Estes dados permitem inferir que uma parcela das pessoas que fazem uso de CsA são possivelmente tabagistas. De fato, estudos relatam que uma parcela dos pacientes tabagistas continuou fumando após serem submetidos a transplantes de órgãos,⁽³⁷⁻³⁹⁾ e que a taxa de mortalidade em transplantados renais fumantes é o dobro.⁽⁴⁰⁾

O hábito de fumar é um fator de risco renal independente. Reduz a taxa de filtração glomerular, aumenta a resistência vascular renal e deteriora a

função renal.⁽⁴¹⁾ É fator de risco também na progressão de doenças renais crônicas,⁽⁴²⁾ com diminuição da função renal nos fumantes mesmo quando a hipertensão arterial foi controlada,⁽⁴³⁾ o mesmo valendo para progressão da nefropatia diabética, que tem sua taxa dobrada nos fumantes,⁽⁴⁴⁾ pelo aumento da produção de TGF- β_1 , que está relacionado a progressão da nefropatia diabética.⁽⁴⁵⁾

O cigarro contém mais de 4.500 substâncias, distribuídas como fase gasosa e fase particulada. O constituinte mais importante da fase gasosa é o nitrogênio, numa proporção de 55 a 72% do total. Em seguida aparecem o oxigênio com 9,2 a 14,3%, o gás carbônico com 6,9 a 13,4% e o monóxido de carbono com 1,9 a 6,3%. Outras 500 substâncias (benzeno, amônia, tolueno, acetaldeído, acroleína etc) encontram-se na fase gasosa do cigarro. A fase particulada contém, pelo menos, 3.500 outras substâncias (alcatrão, nicotina, colesterol, fenol, ácido fórmico, ácido acético, chumbo, cádmio, zinco, níquel etc). O tabaco contém, ainda, substâncias radioativas tais como o rádio-226 e polônio-210. Os fertilizantes fosfatados são as principais fontes destes radioelementos no tabaco.⁽⁴⁶⁾

A queima de um cigarro produz monóxido de carbono e dezenas de outros produtos tóxicos, responsáveis pela alteração da oxigenação dos tecidos, além de liberar a nicotina, uma amina terciária volátil capaz de estimular, deprimir ou perturbar o sistema nervoso central e todo o organismo, dependendo da dose e da frequência com que é utilizada.⁽⁴⁷⁾

O fumo, especialmente a nicotina, causa alterações importantes como ativação do sistema nervoso simpático,⁽⁴⁸⁾ aumento da pressão arterial,⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾

geração de radicais livres, efeitos citotóxicos, dano celular endotelial e apoptose,⁽⁴⁸⁾ alteração da hemodinâmica renal, ativação do sistema renina-angiotensina e do sistema endotelina.⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾ Também causa alterações morfológicas renais como glomeruloesclerose, dano tubulointersticial⁽⁴⁹⁾ e danos vasculares,^(49,52) assim como aumento na concentração de creatinina sangüínea, na excreção urinária de albumina e de endotelina.⁽⁴⁹⁾ E, em pacientes com falência renal moderada a severa, houve diminuição da eliminação de nicotina, sendo encontradas concentrações plasmáticas mais altas de nicotina e cotinina.⁽⁵³⁾

Uma vez que a CsA exerce efeitos nefrotóxicos,^(3,16-17) o cigarro causa alterações renais,^(41-42,49) e ainda considerando que há uma diminuição da eliminação da nicotina em indivíduos com falência renal moderada a severa,⁽⁵³⁾ e que há poucos estudos sobre a interação desses dois fatores, torna-se necessário aprofundar o conhecimento dessa associação.

Este estudo trabalhou com a hipótese de que o cigarro, fator de risco independente para lesão renal, pode potencializar a nefrotoxicidade causada pela CsA.

1.1. Objetivo

Avaliar os efeitos da exposição prévia à fumaça do cigarro sobre as alterações renais funcionais e estruturais induzidas pela CsA em um modelo experimental de nefrotoxicidade crônica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e Dieta

Foram utilizados ratos machos Munich-Wistar com peso inicial variando de 180 a 200g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina – Autarquia Estadual de São José do Rio Preto. O projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, sob o número 630306 (Anexo 1).

Os animais receberam água *ad libitum* durante todo o experimento. Nas primeiras quinze semanas, a dieta consistiu em ração normoproteica (Labina – Purina). Do início da 16ª semana até o final do experimento (cinco semanas), os animais receberam dieta hipossódica, protocolo adequado para se reproduzir um quadro de nefrotoxicidade semelhante ao observado em pacientes sob uso de ciclosporina.⁽³¹⁾ Esta dieta foi obtida utilizando-se arroz cozido em água e adicionado suplemento de aminoácidos, vitaminas e minerais (Aminomix Pet, Vetnil Ind. Com. Prod. Veterinários Ltda.), na proporção aproximada de 65g de arroz para 1g do suplemento.

2.2. Exposição ao Fumo

Os ratos foram expostos ao fumo passivo por 10 minutos, duas vezes ao dia, por 20 semanas, em grupos de 10 animais, três cigarros por exposição. Utilizou-se uma câmara de fumo, composta de uma caixa de madeira com uma

das laterais de vidro e uma tampa removível, com dimensões de 49 cm de comprimento, 38 cm de largura e 40 cm de altura para acomodar os ratos. Um compressor com fluxo contínuo para o frasco contendo os cigarros bombeou a fumaça para dentro da caixa.⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾ O cigarro escolhido foi de teor de alcatrão 10 mg, nicotina 0,8 mg e monóxido de carbono 10 mg. O grupo de ratos não fumantes (SHAM) foi colocado na câmara sem exposição à fumaça pelo mesmo período de tempo. No início da 16ª semana, todos os ratos foram colocados sob dieta hipossódica, e no início da 17ª semana, iniciou-se o tratamento com ciclosporina ou veículo, conforme o grupo.

2.3. Tratamento de Ciclosporina A

A CsA foi dissolvida em álcool absoluto (12,5%), e diluída em óleo de oliva (87,5%). A droga foi injetada por via subcutânea na dose de 2,5 mg/Kg de peso corporal/dia por 28 dias. O veículo (VH), contendo óleo de oliva e álcool, foi injetado de forma isovolumétrica nos animais do grupo controle, no mesmo esquema de tratamento.

2.4. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos, 10 ratos/grupo: ratos tratados com CsA na dose de 2,5 mg/Kg e câmara com os cigarros (CsA/F), ratos tratados com CsA na dose de 2,5 mg/Kg e câmara sem os cigarros

(CsA/S), ratos tratados com veículo e câmara com os cigarros (VH/F) e ratos tratados com VH e câmara sem os cigarros (VH/S).

2.5. Filtração Glomerular Renal (FGR) - Depuração de Inulina

O procedimento foi realizado 24 horas após a última dose de CsA ou veículo. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de 50 mg/ml/kg de tiopental sódico (0,1ml por 100g de peso corporal).

Após a anestesia, foi realizada traqueostomia, utilizando-se cateter de polietileno PE-240 (Becton Dickinsons, Nova Jersey, EUA). Em seguida, a cateterização (PE-50) da veia jugular direita, para infusão de soluções (solução de inulina e soro fisiológico), a cateterização da artéria carótida esquerda, para medida da pressão arterial média (PAM) e a coleta de amostras de sangue para as dosagens sanguíneas da concentração de inulina plasmática. Na sequência, foi realizada uma incisão mediana para localização da bexiga, efetuando-se uma pequena incisão nesta para canulação com cateter PE-160. A urina foi coletada em tubos, para posterior aferição do volume urinário e das concentrações urinárias de inulina. A uretra foi ligada para evitar perdas de urina. Finalizado o processo cirúrgico, iniciou-se o procedimento da depuração de inulina.

Os animais receberam 1ml da solução de inulina (Sigma, EUA) na concentração de 25 mg/ml (0,3 g em 12 ml de NaCl a 0,9 %), e em seguida receberam lentamente solução fisiológica (5 ml). Foi iniciada então, infusão da solução de inulina, de forma contínua, por meio de bomba de infusão (Harvard

Apparatus, Holliston, MA, EUA), na velocidade de 0,06 ml/min. Neste momento, iniciou-se a contagem de um período de 50 minutos, necessário para o equilíbrio hemodinâmico do animal após a cirurgia. Durante o equilíbrio, a temperatura e pressão arterial do animal foram continuamente monitoradas.

Após 50 minutos de estabilização, a urina foi coletada em tubos previamente pesados e devidamente identificados, por três períodos consecutivos de 20 minutos cada, os quais foram utilizados para o cálculo do volume urinário ($\mu\text{l}/\text{min}$).

Na metade de cada período da coleta de urina, coletou-se 0,3 ml de sangue com heparina, e o sangue retirado foi repostado imediatamente com o mesmo volume de soro fisiológico.

O plasma e a urina foram utilizados para a dosagem da concentração de inulina pelo método da antrona, com o auxílio do espectrofotômetro (Espectrofotômetro BTS 310 – Biosystems, Barcelona, Espanha). Verificou-se a pressão arterial média (PAM) durante todo o procedimento, pela cateterização da artéria carótida acoplada a um transdutor de pressão (Stoelting Co., Illinois, EUA), e verificada por um amplificador (Blood pressure display unit, Stoelting Co., Illinois, EUA). O volume urinário ($\mu\text{l}/\text{min}$) foi determinado pela diferença de peso dos tubos de coleta de urina (peso ao final do período de coleta – peso inicial do tubo). Os dados da depuração da inulina foram calculados em ml/min/100g, representando a média dos três períodos de coleta. Os resultados para a PAM representaram a média de todos os registros obtidos em todo o experimento.

Os dados obtidos foram submetidos à fórmula para o cálculo da depuração de inulina para verificação da taxa de filtração glomerular renal, conforme abaixo:

Depuração de inulina = $(U \text{ (mg/dL)} \times VU \text{ (ml/min)}) / P \text{ (mg/dL)} =$
(ml/min/100g), em que:

U = concentração urinária de inulina

VU = volume urinário

P = concentração plasmática de inulina

2.6. Estudo Hemodinâmico - Fluxo Sangüíneo Renal (FSR), Resistência Vascular Renal (RVR) e Pressão Arterial Média (PAM)

O estudo foi realizado 24 horas após a última injeção de CsA ou veículo. Os ratos selecionados para esta análise foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50mg/ml) na proporção de 0,1ml/100g de peso corporal.

Após a anestesia, realizou-se traqueostomia com cateter de polietileno PE-240 (Becton Dickinsons, Nova Jersey, EUA). Em seguida, realizou-se a cateterização (PE 50) da artéria carótida esquerda para medida da pressão arterial média (PAM), e da veia jugular direita para a expansão volêmica (cateter PE-50). Realizou-se laparotomia mediana, o isolamento do rim esquerdo e do pedículo renal e a dissecação da artéria renal para instalação de

uma *probe* vascular (série R, 1.5 mm, Transonic System, Ithaca, NY, EUA), apropriada para medida direta do fluxo arterial renal em ratos.

Foi administrado, então, cinco ml de solução fisiológica 0,9%, seguidos por infusão contínua desta solução na velocidade de 0,06 ml/min em bomba de infusão (Harvard, EUA). Após o período de 60 minutos de estabilização, foram realizadas as medidas do FSR por meio de fluxômetro por *doppler* (T106, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, EUA) com aplicação de gel condutor (HR Lubricating Jelly, Transonic, Nova York, EUA). O fluxômetro para pesquisa animal utiliza a técnica de ultra-som *Transit-time*, medindo direta e quantitativamente o fluxo de sangue. Foram realizadas quatro medidas contínuas em períodos de 10 minutos, obtendo-se a média dos quatro registros, para cada experimento. A PAM foi avaliada concomitantemente por um transdutor de pressão (Stoelting Co., Illinois, EUA), ligado à artéria carótida e a um amplificador de pressão (Blood pressure display unit, Stoelting Co., Illinois, EUA). A resistência vascular renal (RVR) foi calculada pela fórmula: $RVR = PAM / FSR$ (mmHg/ml/min).

2.7. Dosagem de Ciclosporina A

Ao final dos experimentos de depuração de inulina, foi coletado o total de três ml de sangue dos grupos que receberam CsA (CsA/F e CsA/S), em tubos contendo 0,1ml de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10%, armazenados a -20°C, para determinação dos níveis sanguíneos da CsA. A dosagem de ciclosporina foi realizada pelo Laboratório Central do Hospital de

Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto por meio de radioimunoensaio de duplo anticorpo (Cyclo-Trac SP, Diasorin, Stillwater, USA).

2.8. Análises Bioquímicas e Hematócrito

Os animais foram colocados em gaiola metabólica (Nalgene, Nalge Company, Rochester NY, EUA) ao final do período de tratamento. Após 24 horas na gaiola metabólica, foi verificado o volume da diurese coletada, e a urina foi centrifugada e utilizada para as dosagens bioquímicas.

O animal foi então anestesiado com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50mg/ml); na proporção de 0,1ml a cada 100g de peso corporal. Em seguida, foi realizada a cateterização arterial (PE 50) e coletado o sangue (3ml), para as dosagens bioquímicas.

A urina e o plasma foram usados para as seguintes dosagens: sódio e potássio por meio do analisador de eletrólitos (Mod. 9180, Electrolyte Analyser, AVL Scientific Co., Roswell GA, EUA), creatinina pelo método de picrato alcalino - Jaffé (Synermed-USA) analisada por espectrofotômetro (BTS 310 ByoSystems, Barcelona, Espanha), a osmolalidade em osmômetro pelo ponto de congelamento (Osmette A, Precision Systems, Natick, MA, EUA).

As fórmulas utilizadas para cálculo da fração de excreção de sódio e depuração osmolar foram:

Fração de excreção de sódio (%):

- FeNa = $(UNa / PNa \times 100) / (UCr / PCr)$, em que:

- U_{Na} e P_{Na} = concentração urinária e plasmática de sódio (mmol/L)
- U_{Cr} e P_{Cr} = concentração urinária e plasmática de creatinina (mg/dL)

Depuração osmolar (ml/min):

- $CO_{sm} = (U_{osm} \times V) / P_{osm}$, em que:

- U_{osm} = osmolalidade urinária (mOsm/kg)
- V = volume urinário (ml)
- P_{osm} = osmolalidade plasmática

O hematócrito foi determinado pelo método do micro-hematócrito.

2.9. Análise Histológica

Após remoção da cápsula renal, o rim foi seccionado longitudinalmente em duas metades. O material foi fixado em solução de formaldeído a 9% em soro fisiológico por dois dias, conservado em álcool 70%, e incluído em parafina. Secções de 5 µm foram montadas e numeradas em lâminas, e o tecido corado por tricrômio de Masson. A graduação morfométrica para fibrose intersticial foi realizada nas áreas corticais em microscopia de luz (objetiva de 40 vezes) por meio do Sistema de Merz.⁽⁵⁶⁾

Cálculo da fibrose intersticial = (%) = $Pp/Pt \times 100$, em que,

Pp = número de pontos parciais (pontos sobre tecido conjuntivo);

Pt = número de pontos totais (pontos do sistema teste, neste caso igual a 36, sistema teste idealizado por Merz).⁽⁵⁶⁾

A análise foi conduzida por um único avaliador, que desconhecia a identificação das amostras.

2.10. Estudo Imuno-histoquímico

Após remoção da cápsula renal, o rim foi seccionado transversalmente em três fatias de aproximadamente três mm. O material foi fixado em solução de formaldeído a 9% em soro fisiológico por dois dias e conservado em álcool 70%. As lâminas utilizadas para aderência dos cortes foram previamente submetidas ao processo de silanização (organosilano 2% em acetona PA). Secções finas de 5 μ m foram montadas e numeradas em lâminas.

O procedimento de imuno-histoquímica foi realizado pela pós-graduanda no Laboratório da Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, conforme técnica já descrita.⁽⁵⁷⁾ Os fragmentos foram submetidos às reações para nitrotirosina, α -SMA (alfa-actina) e vimentina.

Foram usados os seguintes anticorpos primários:

- anti-nitrotirosina policlonal, Upstate, Lake Placid, NY, USA;
- anti- α -SMA e anti-vimentina, monoclonal, Dako, Dinamarca.

A parafina dos fragmentos foi eliminada por imersão em três banhos sucessivos de 5 minutos cada em xilol. Em seguida, os fragmentos foram

hidratados com imersões consecutivas: 5 minutos em álcool 100%, 4 minutos em álcool 95%, 1 minuto em álcool 75% e 1 minuto em água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi induzido procedendo-se ao preparo de uma solução de 196 ml de água destilada adicionada de dois ml de azida sódica 10% e dois ml de água oxigenada 30%. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso, sendo os fragmentos mergulhados na mesma por 10 minutos. Ao final, os fragmentos foram imersos em solução de PBS por 5 minutos.

Para a análise de nitrotirosina, utilizou-se uma etapa prévia com adsorção dos fragmentos em soro de cabra antes da incubação com o anticorpo primário. Para tanto, cada fragmento de tecido foi incubado 30 minutos em temperatura ambiente com 50 μ l de soro de cabra diluído 1:10 em solução PBS + BSA 1% + saponina 2%. Na etapa de adição do anticorpo primário, a solução com soro de cabra não é lavada do fragmento.

A incubação do anticorpo primário foi obtida com a adição de 50 μ l de anticorpo primário em cada fragmento de tecido. A diluição dos anticorpos foi em solução PBS + BSA 1%, conforme abaixo:

- 1/400 para nitrotirosina;
- 1/500 para vimentina;
- 1/1000 para α -SMA.

As reações nitrotirosina e vimentina foram incubadas por 60 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação da α -SMA foi incubada durante a noite a 4°C (em geladeira). Ao término destes períodos, os

fragmentos foram submersos duas vezes consecutivas em PBS por 5 minutos cada.

O próximo passo foi a incubação dos cortes das reações de α -SMA e vimentina com 50 μ l de anticorpo secundário monoclonal biotinado de coelho anti-IgG de camundongo (Dako, Dinamarca), diluído 1/200 em solução PBS + BSA 1%, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Para a reação da nitrotirosina utilizou-se 50 μ l de anticorpo policlonal de coelho (Dako, Dinamarca), diluído em solução PBS + BSA 1% a 1/800, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Ao término, os fragmentos foram novamente submersos duas vezes consecutivas em PBS por 5 minutos cada.

Trinta minutos antes do uso, foi preparado um complexo avidina-biotina (Vector Laboratories, CA, USA) na proporção de 15 μ l de avidina e 15 μ l de biotina para 1000 μ l de PBS + BSA 1%. Cinquenta μ l deste complexo foi colocado sobre os cortes, com incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Ao término, os fragmentos foram imersos duas vezes consecutivas em PBS por 5 minutos cada.

O corante utilizado foi o DAB (3,3-diaminobenzidina, Sigma): 10 mg diluídos em um ml de solução tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 7,6). A solução foi mantida protegida da luz (com papel alumínio), e se preparada no dia anterior, conservada em congelador. Ao manipulá-la, tomou-se a precaução de usar luvas de proteção e avental, uma vez que a solução é carcinogênica.

Uma segunda solução foi preparada com 20,4 ml da solução de DAB de 10 mg/ml, adicionada de 219 ml de tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 7,6) e 1,32 ml de cloreto de níquel 8%. Esta solução foi colocada em 900 μ l de água

oxigenada 3%, e dentro de um minuto os cortes foram mergulhados e incubados a 37°C por 10 minutos. A solução de água oxigenada 3% foi preparada protegida da luz (com papel alumínio) somente pouco antes do uso. Ao término, os cortes foram imersos em água destilada por 2 minutos.

Em seguida, procedeu-se a contra-coloração, mergulhando os fragmentos em corante metilgreen por 1 minuto. Após, foram mergulhados em etanol 95% por duas vezes e depois uma vez em etanol 100%. Procedeu-se então com um primeiro banho de xilol por 1 minuto, seguido de dois banhos de xilol de 2 minutos cada.

Finalizando, os fragmentos receberam solução Permount e lamínulas, sendo mantidos dentro do banho de xilol durante a montagem para evitar o ressecamento. Depois da montagem, aguardou-se 15 minutos para a secagem e leitura.

Os fragmentos foram analisados de modo semi-quantitativo, por um único avaliador que desconhecia o tratamento dos animais, conforme método anteriormente descrito.⁽⁵⁷⁾ Na objetiva de 40 vezes (0,245 mm²), atribuiu-se score 0 a 4 para a zona cortical renal. Cada score foi atribuído analisando-se a alteração de coloração quanto à extensão do tecido (não por sua intensidade), dependendo da porcentagem de campos afetados (coloração positiva), sendo:

0 = coloração ausente ou extensão menor que 5%;

1 = 5-25%;

2 = 25-50%;

3 = 50-75%;

4 = 75-100%.

No caso da análise da α -SMA, as áreas periglomerulares foram analisadas separadamente das regiões intersticiais. O resultado para cada animal foi obtido pelo cálculo da média das leituras em toda a extensão da área cortical de cada fragmento.

Este método de análise semi-quantitativo tem sido largamente empregado e é reproduzível entre diferentes observadores.

2.11. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos previamente à análise descritiva para determinação da normalidade. Para amostras com distribuição normal, utilizou-se Análise de Variância (ANOVA) para amostras não repetidas, seguida de teste de Newman-Keuls. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para amostras com distribuição não normal. O nível sanguíneo de CsA nos grupos com fumo e sem fumo foi comparado pelo teste *t* bicaudal de Student para amostras independentes. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos dos animais tratados com VH (expostos ou não ao fumo) foram similares ($p > 0,05$) e apresentados num grupo único. As médias individuais dos grupos estão apresentadas no apêndice.

Tabela 1. Função e Hemodinâmica renal.

Parâmetros	Grupos		
	VH	CsA/S	CsA/F
FGR (ml/min/100g)	0,83±0,15	0,53 ± 0,05***	0,39 ±0,03*** •
FSR (ml/min)	6,7 ± 1,0	3,8 ± 0,6***	3,9 ± 0,4***
RVR (mmHg/ml/min)	16,8 ± 3,1	26,7 ± 3,2***	26,1 ± 2,5***
PA (mmHg)	138 ± 12	118 ± 13***	123 ± 9***
VU 24 h (ml)	10,6 ± 5,2	17,6 ± 5,2***	19,5 ± 5,3***

Valores apresentados como média ± desvio padrão.

VH = soma dos grupos veículo + fumo e veículo sem fumo, CsA/S = grupo ciclosporina sem fumo, CsA/F = grupo ciclosporina + fumo.

Valor-p conforme abaixo:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, CsA/S vs VH e CsA/F vs VH

• $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, CsA/F vs CsA/S

FGR = filtração glomerular renal; FSR = fluxo sanguíneo renal; RVR = resistência vascular renal; PA = pressão arterial; VU 24h = volume urinário em 24 horas.

3.1. Filtração Glomerular Renal (Tabela 1)

Os grupos CsA apresentaram queda da FGR em relação ao veículo (CsA/F 0,39±0,03 vs VH 0,83 ± 0,15 vs CsA/S 0,53±0,05; *** $p < 0,001$). A queda na FGR foi agravada pelo fumo (CsA/F 0,39±0,03 vs CsA/S 0,53±0,05; * $p < 0,05$).

3.2. Hemodinâmica Renal: Fluxo Sanguíneo Renal (FSR), Resistência Vascular Renal (RVR), Pressão Arterial Média (PAM) e VU (24h)
(Tabela 1)

Os animais tratados com CsA tiveram o FSR diminuído (CsA/F $3,91 \pm 0,41$ vs VH $6,68 \pm 1,0$ vs CsA/S $3,81 \pm 0,59$; $p < 0,001$). Quando comparados os grupos CsA com fumo e sem fumo, os resultados não foram significantes (CsA/F $3,91 \pm 0,41$ vs CsA/S $3,81 \pm 0,59$; $p > 0,05$).

A RVR comportou-se de forma semelhante ao FSR, com diferença significativa comparando os grupos CsA e VH (CsA/F $26,08 \pm 2,47$ vs VH $16,75 \pm 3,13$ vs CsA/S $26,72 \pm 3,17$; $p < 0,001$), porém sem interferência do fumo (CsA/F $26,08 \pm 2,47$ vs CsA/S $26,72 \pm 3,17$; $p > 0,05$).

A PAM apresentou diferença significativa nos grupos CsA vs VH, com queda nos grupos CsA (CsA/F $122,67 \pm 9,22$ vs VH $137,9 \pm 11,6$; $p < 0,01$ e CsA/S $118,51 \pm 12,70$ vs VH $137,9 \pm 11,6$; $p < 0,001$). Porém, não houve diferença entre os grupos com e sem o fumo (CsA/F $122,67 \pm 9,22$ vs CsA/S $118,51 \pm 12,70$; $p > 0,05$).

O volume urinário (VU) em 24 horas foi maior nos grupos que receberam CSA, com ou sem fumo, comparado ao que recebeu veículo: CsA/F $19,5 \pm 1,7$ vs VH $10,6 \pm 5,22$, $p < 0,001$ e CsA/S $17,6 \pm 1,6$ vs VH $10,6 \pm 5,22$, $p < 0,01$. Não houve diferença entre os grupos CsA/F vs CsA/S ($p > 0,05$).

Tabela 2. Peso, análises bioquímicas e hematócrito.

Parâmetros	Grupos		
	VH	CsA/S	CsA/F
PIF (g)	271 ± 22	263 ± 16	261,4 ± 23
PIC (g)	325 ± 23	326 ± 20	313 ± 28
PDE (g)	324 ± 26	313 ± 25	308 ± 25
Osm _U (mOsm/Kg)	383 ± 131	192 ± 36***	191 ± 36***
Fe _{Na} (%)	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,0
Fe _K (%)	2,5 ± 3,3	0,4 ± 1,0	4,3 ± 3,4*
CsA sanguínea (ng/ml)	-	1.601 ± 577	1.888 ± 334
Hematócrito (%)	45 ± 3	42 ± 4	44 ± 5

Valores apresentados como média ± desvio padrão.

VH = soma dos grupos veículo + fumo e veículo sem fumo, CsA/S = grupo ciclosporina sem fumo, CsA/F = grupo ciclosporina + fumo.

Valor-p conforme abaixo:

*p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001, CsA/S vs VH e CsA/F vs VH

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, CsA/F vs CsA/S

PIF = peso no início do fumo ou sham; PIC = peso no início do tratamento com CsA ou VH; PDE = peso no dia do experimento; Osm_U = osmolalidade urinária; Fe_{Na} = fração de excreção de sódio; Fe_K = fração de excreção de potássio.

3.3. Peso (Tabela 2)

Houve perda de peso durante o período de tratamento, independente do fumo ou da CsA. No entanto, ao comparar os grupos entre si, não houve diferença significativa entre o peso no início e no final do tratamento com CsA ou VH (p>0,05).

3.4. Dosagem de Ciclosporina no Sangue (SCsA) (Tabela 2)

A concentração sanguínea da ciclosporina foi semelhante entre os grupos com fumo e sem fumo (CsA/F $1.600,93 \pm 577,39$ vs CsA/S $1.887,50 \pm 333,84$, ng/ml; $p > 0,05$).

3.5. Análises Bioquímicas e Hematócrito (Tabela 2)

A osmolalidade urinária (UOsm) foi menor nos grupos CsA comparados ao grupo veículo, independente do fumo (CsA/F $190,7 \pm 36$ vs VH $382,59 \pm 130,8$ vs CsA/S $191,6 \pm 35$; $p < 0,001$. Não houve diferença entre os grupos CsA/F vs CsA/S ($p > 0,05$).

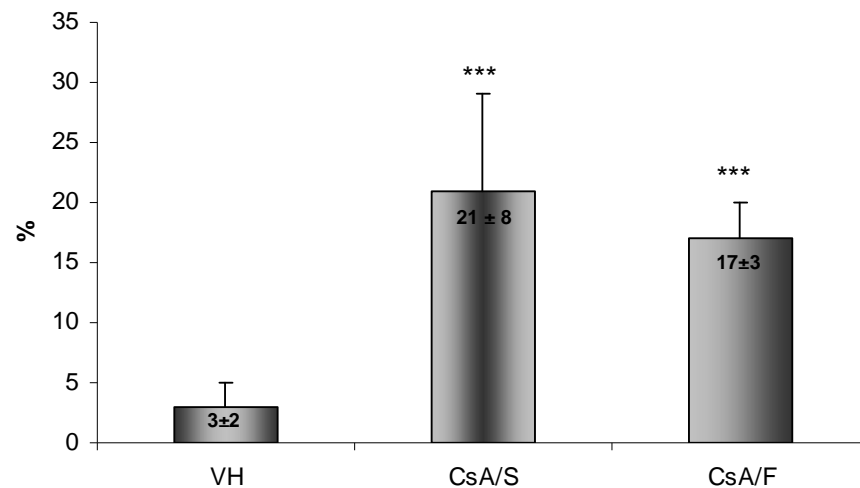
A fração de excreção de sódio (Fe_{Na}) foi similar em todos os grupos analisados ($p > 0,05$).

A fração de excreção de potássio (Fe_K) apresentou diferença apenas quando comparados os grupos CsA/S vs CsA/F, sendo que o grupo que fumou excretou mais potássio do que o grupo que não fumou (CsA/F $4,3 \pm 3,4$ vs CsA/S $0,39 \pm 1,05$, $p < 0,05$).

O Hematócrito foi similar nos grupos estudados (CsA/F $44,38 \pm 4,9$ vs CsA/S $42,2 \pm 3,6$ vs VH $45 \pm 2,7$; $p > 0,05$).

3.6. Fibrose Intersticial (Figura 1)

Na análise histológica, a porcentagem de fibrose intersticial (FI) foi similar nos dois grupos tratados com CsA: CsA/F 17 ± 3 vs CsA/S 21 ± 8 ; $p > 0,05$. Houve diferença significativa quando comparados os grupos CsA vs VH, independente do fumo (CsA/F 17 ± 3 vs VH 3 ± 2 e CsA/S 21 ± 8 vs VH 3 ± 2 ; $p < 0,001$).



($p < 0,001$ ***, CsA/S vs VH e CsA/F vs VH)

Figura 1. Fibrose Intersticial Renal (FI), após 20 semanas de Fumo ou Sham e 28 dias de CsA ou VH.

3.7. Imuno-histoquímica (Figuras 2-8)

A expressão de α -SMA túbulo intersticial (TI) foi maior nos grupos CsA do que no grupo VH, independente do fumo (CsA/F $1,8\pm 0,3$ vs VH $0,77\pm 0,3$ vs CsA/S $1,7\pm 0,4$; $p < 0,001$ e CsA/F $1,8\pm 0,3$ vs CsA/S $1,7\pm 0,4$; $p > 0,05$) (Figuras 2 e 4).

A expressão de α -SMA periglomerular apresentou-se maior nos grupos CsA em relação ao veículo (CsA/F $1,0\pm 0,4$ vs VH $0,27\pm 0,3$, $p < 0,001$, CsA/S $0,52\pm 0,1$ vs VH $0,27\pm 0,1$; $p < 0,05$). Quando comparado fumo e sem fumo, o grupo fumo teve uma expressão maior (CsA/F $1,0\pm 0,4$ vs CsA/S ; $p < 0,01$) (Figuras 3 e 4).

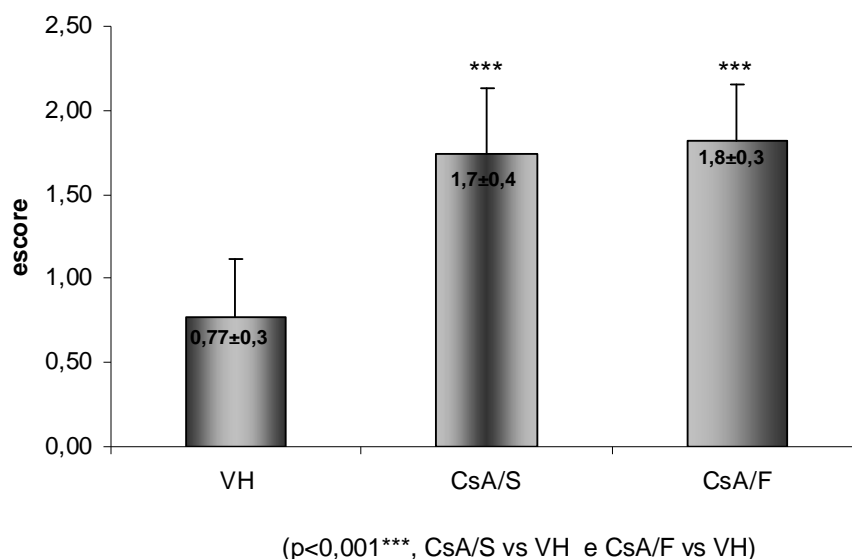
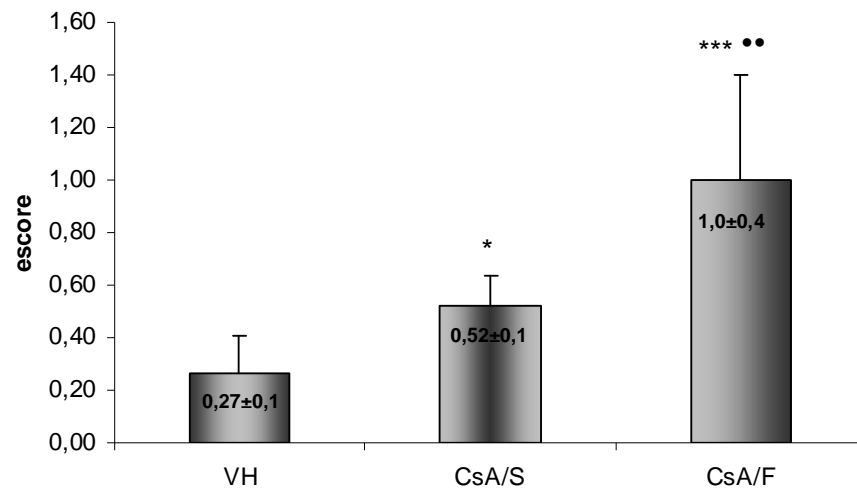


Figura 2. Expressão de α -SMA túbulo intersticial após 20 semanas de Fumo ou Sham e 28 dias de CsA ou VH.



($p < 0,001$ ***; $p < 0,05$ *, CsA/S vs VH e CsA/F vs VH; $p < 0,01$ ** , CsA/F vs CsA/S).

Figura 3. Expressão de α -SMA periglomerular após 20 semanas de Fumo ou Sham e 28 dias de CsA ou VH.

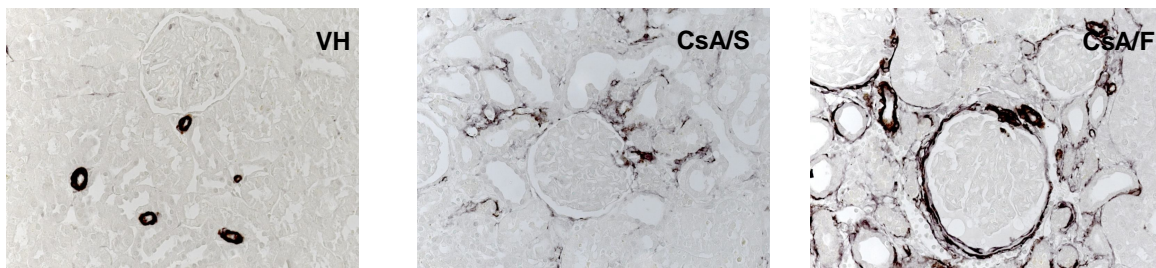
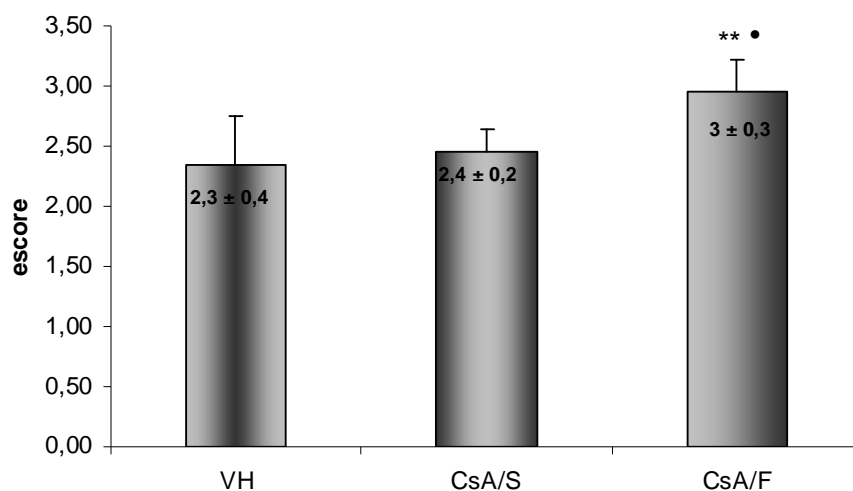


Figura 4. Imunolocalização da Alfa -actina no córtex renal de ratos tratados com VH, CsA ou CSA+F (objetiva de 40 x).

A expressão da nitrotirosina foi maior no grupo que associou ciclosporina e fumo quando comparado aos demais grupos (CsA/F $3 \pm 0,3$ vs VH $2 \pm 0,4$; $p < 0,01$ e CsA/F $3 \pm 0,3$ vs CsA/S $2 \pm 0,2$; $p < 0,05$). Houve, portanto, um aumento na expressão da nitrotirosina nos animais fumantes. Não houve diferença entre CsA/S $2,4 \pm 0,2$ vs VH $2,3 \pm 0,4$; $p > 0,05$. (Figuras 5 e 6).



($p < 0,01$ ** CsA/F vs VH e $p < 0,05$ •, CsA/F vs CsA/S)

Figura 5. Expressão de nitrotirosina após 20 semanas de Fumo ou Sham e 28 dias de CsA ou VH.

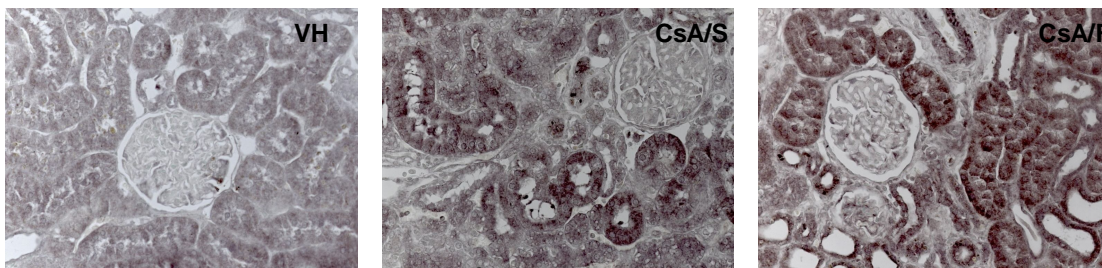


Figura 6. Imunolocalização da nitrotirosina no córtex renal de ratos tratados com VH, CsA ou CSA+F (objetiva de 40 x).

A expressão de vimentina foi observada apenas nos grupos CsA, sem interferência do fumo (CsA/F $0,44 \pm 0,4$ vs CsA/S $0,49 \pm 0,6$; $p > 0,05$, CsA/F $0,44 \pm 0,4$ vs VH $0,0 \pm 0,0$; $p < 0,05$ e CsA/S $0,49 \pm 0,6$ vs VH $0,0 \pm 0,0$; $p < 0,01$) (Figuras 7 e 8).

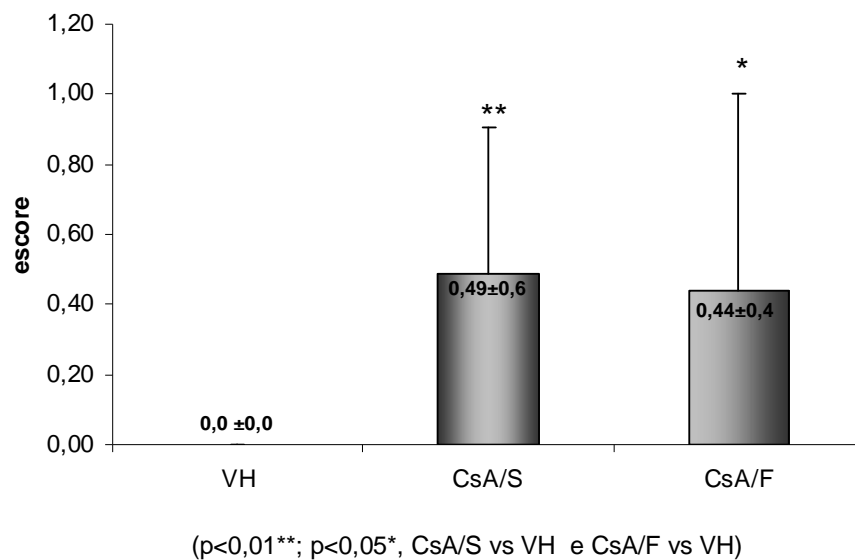


Figura 7. Expressão de Vimentina após 20 semanas de Fumo ou Sham e 28 dias de CsA ou VH

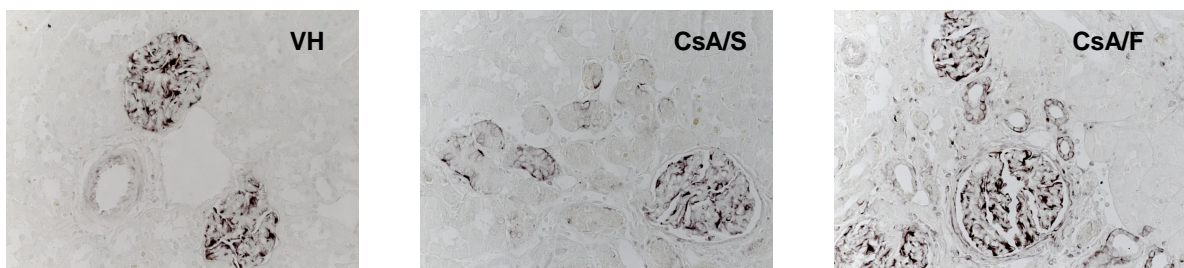


Figura 8. Imunolocalização da Vimentina no córtex renal de ratos tratados com VH, CsA ou CSA+F (objetiva de 40 x).

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A exposição ao fumo passivo prévio em um modelo de nefrotoxicidade crônica em ratos potencializou a lesão renal funcional, estrutural e o estresse oxidativo induzidos pela ciclosporina. De fato, a associação do cigarro e da CsA causou queda mais acentuada da FGR e intensificou a expressão renal da nitrotirosina e da α -SMA periglomerular comparado a CsA sozinha.

O efeito nefrotóxico em ratos, semelhante aos pacientes tratados com CsA, é conseguido utilizando-se a dieta hipossódica.^(3,31) Uma das ações da CsA sobre o rim é a ativação do sistema renina-angiotensina⁽¹²⁾ e a dieta pobre em sal potencializa essa ativação, uma vez que a depleção de sódio também é um gatilho para a ativação do SRA.^(33,58) Assim, a associação da dieta hipossódica ao tratamento de CsA permite que os efeitos do fármaco sobre o rim possam ser visualizados num período mais curto de tratamento.^(31,58) Neste estudo também foi utilizada a dieta hipossódica com arroz cozido em água e suplementado com aminoácidos e vitaminas. A baixa osmolalidade urinária e a diminuição da F_{eNa} dos animais comprovou a eficácia da dieta, como em outras publicações utilizando o mesmo modelo.⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾

Vários estudos experimentais demonstram que a utilização de CsA causa queda da FGR e do FSR^(3,16-17) e desenvolvimento de fibrose intersticial.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Neste estudo, a CsA foi administrada por 28 dias em ratos, e também foi observado fibrose tubulointersticial relacionada ao uso da CsA, queda da FGR e do FSR e aumento da RVR.

A nefrotoxicidade induzida pela CsA pode manifestar-se com declínio progressivo e severo da taxa de filtração glomerular, com vasoconstrição

arteriolar aferente, em pequenas artérias adjacentes e dos capilares glomerulares.⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ O uso crônico da CsA determina alterações renais caracterizadas por atrofia tubular e fibrose intersticial irreversível, comprometendo os raios medulares e o córtex renal, geralmente acompanhado por alterações na função renal.⁽²⁹⁻³⁰⁾

A nefrotoxicidade causada pelo uso da CsA foi descrita em transplantados renais ou não renais, e em pacientes com doença auto-imune que receberam a droga por períodos que variam de seis meses ou mais.⁽²⁹⁻³⁰⁾ Muitos pacientes que apresentam falência renal crônica têm outros fatores de risco associados, tais como idade, *diabets mellitus*, hipertensão, dislipidemia e o tabagismo.⁽³⁵⁾

O tabagismo é considerado um fator de risco renal independente, presente em muitos pacientes que utilizam a CsA,⁽³⁸⁻³⁹⁾ e está implicado na progressão de doenças renais crônicas.^(42,49,51-52) Foi constatado que colabora para a perda do enxerto do transplantado renal,^(39,61) para a redução da taxa de filtração glomerular, o aumento da resistência vascular renal, deteriorando a função renal,⁽⁴¹⁾ induzindo a proteinúria.⁽⁶²⁾ Existe uma correlação entre a diminuição da sobrevivência do paciente após o transplante e o tabagismo.^(39,63)

No presente estudo associou-se CsA e fumo passivo, por meio de câmara de fumo com cigarros, em ratos, para verificar a influência do fumo na nefrotoxicidade causada pela CsA. Pode-se observar que o fumo foi fator agravante na queda da função renal, com diminuição da FGR nos animais tratados com CsA. Estes resultados são consistentes aos observados em estudos anteriores.^(41,43,64)

Em recente estudo foi associado CsA e nicotina em tecido renal, e concluiu-se que ambos possuem efeitos nocivos independentes sobre a função renal, e que a interação CsA-nicotina causa dano adicional sobre a resposta vasodilatadora renal induzida pela isoprenalina.⁽⁶⁴⁾ Estes resultados, associados aos observados no presente estudo, permite inferir que a ação deletéria do cigarro sobre a ação da CsA possivelmente esteja relacionada a mecanismos vasoconstritores adicionais sobre a função renal.

A nicotina, um dos componentes do cigarro, relaciona-se a proliferação de células mesangiais, aumenta a síntese de fibronectina, está envolvida na progressão da doença renal crônica e aumenta a produção de radicais livres,⁽⁶⁵⁾ induzindo estresse oxidativo e inflamação vascular com formação de placas ateroscleróticas.⁽⁶⁶⁾

Existem inúmeras evidências da participação do estresse oxidativo na nefrotoxicidade da CsA.⁽⁶⁷⁻⁷¹⁾ A nitrotirosina é um metabólito da nitração da tirosina produzido na formação de peroxinitrito em reações de estresse oxidativo,⁽⁷²⁻⁷⁴⁾ consistindo também numa indicação indireta da presença de NO e da presença de estresse oxidativo, e sua produção está aumentada na exposição à CsA.^(72,74-77)

Neste estudo também foi avaliado o estresse oxidativo por meio da expressão de nitrotirosina, sendo observado o aumento de sua expressão na exposição à CsA, confirmando os resultados observados em estudos anteriores.^(71,72,74-77) Os animais expostos ao fumo associado à CsA apresentaram maior expressão de nitrotirosina, demonstrando que o fumo potencializa o estresse oxidativo causado pela CsA.

Vimentina e α -SMA são proteínas do citoesqueleto celular. A vimentina é integrante dos filamentos intermediários que compõem um sistema de estruturas filamentosas, formando a rede estrutural que conecta as membranas celulares, organelas citoplasmáticas e o núcleo.⁽⁷⁸⁾ No tecido renal sadio, a vimentina pode ser visualizada em células musculares lisas arteriais, nos glomérulos e nos poucos fibroblastos presentes no interstício renal, não se observando vimentina nos túbulos. A α -SMA é um microfilamento de actina, e no tecido renal sadio é encontrada somente em células musculares lisas arteriais.^(57,79-82) Em situações de lesão, a expressão destes fatores é alterada. Assim, a célula tubular renal pode modificar o seu fenótipo, adotando características de células mesenquimais, como miofibroblastos (principais células envolvidas na produção de matriz), por meio de um processo denominado transição epitélio-mesenquimal ou EMT.^(79,83-84) A EMT ocorre normalmente em células embrionárias e tumorais, mas também pode acontecer durante as alterações estruturais observadas na nefrotoxicidade da CsA. As células tubulares proximais são alvos diretos deste fármaco, alterando o seu fenótipo e adquirindo características de fibroblastos, o que contribui para o desenvolvimento da fibrose intersticial.⁽⁸⁵⁾ Ocorre alongamento celular, fragmentação e rearranjo do citoesqueleto e rompimento juncional, mediados por TGF- β_1 .⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾

Vimentina e α -SMA são alguns dos fatores usados como marcadores no desenvolvimento deste processo. A vimentina é considerada um marcador de célula mesenquimal, e passa a se expressar em células tubulares, indicando dano tubular proximal, podendo também aumentar no interstício renal. A α -

SMA é considerada um marcador de miofibroblasto e passa a se expressar em miofibroblastos do interstício renal e em células mesangiais ativadas.^(57,79-82)

No presente estudo, a expressão renal de vimentina e de α -SMA aumentou na exposição à CsA, em conformidade ao já observado em estudos anteriores.^(67,71,75,88-91) Estes dados confirmam a agressão da CsA às células tubulares proximais, evidenciada pelo aumento da expressão de vimentina, e o desenvolvimento de fibrose intersticial também observado neste estudo.

A exposição ao fumo não alterou a expressão destes fatores, com exceção do aumento da expressão da α -SMA periglomerular. É possível que este dano glomerular adicional causado pelo fumo tenha contribuído para a filtração glomerular menor observada nos animais expostos ao cigarro.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que a exposição ao fumo agrava a nefrotoxicidade causada pela CsA. Esta ação parece estar relacionada aos efeitos vasoconstritores e indutores de estresse oxidativo do fumo, potencializando a vasoconstrição e o estresse oxidativo causados pela CsA. Estes efeitos associados ao dano adicional causado pelo fumo à estrutura glomerular, agravam a queda da função renal causada pela CsA.

Com isso, pacientes que receberão ou já estão em tratamento com este fármaco deverão ser intensamente advertidos para abandonar o cigarro ou não iniciar o hábito, além de evitar a exposição ao fumo passivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calabresi P, Parks Jr RE. Agentes antiproliferativos e drogas usadas na imunossupressão. In: Goodman LS, Gilman AG, Editores. As bases farmacológicas da terapêutica. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1987. p. 817-856.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Editores. Farmacologia. 3^aed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1997. p.206-207
3. Vieira Jr JM, Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation* 1999; 68 (11):1746-53.
4. Borel JF. Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 1976; 31:631-41.
5. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animal. *Immunology* 1977; 32:1017-25.
6. Cattran DC, Greenwo DC, Ritchie S, Bernstein K, Churchil DN, Clark WF, *et al.* Controlled trial of cyclosporine in patients with progressive membranous nephropathy. Canadian glomerulonephritis study group. *Kidney Int* 1995; 47:1130-35.
7. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 1993; 45:953-1040.

8. Gregory MJ, Smoyer WE, Sedman A, Kershaw DB, Valentini RP, Johnson K, *et al.* Long-term cyclosporine therapy for pediatric nephrotic syndrome: a clinical and histologic analysis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:543-49.
9. Habib R, Niaudet P. Comparison between pre- and post treatment renal biopsies in children receiving ciclosporine for idiopathic nephrosis. *Clin Nephrol* 1994; 42:141-46.
10. Palestine AG, Austin HA, Balow JE, Antonovych TT, Sabnis SG, Pneuuss HG, *et al.* Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. *N Engl J Med* 1986; 314:1293-98.
11. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, Eng E, *et al.* Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1995; 48(2):439-48.
12. Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM. Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin in Nephrol* 2003; 23(5):465-76.
13. Fellström B. Advances in cyclosporine therapy-cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Supl 1):S220-3.
14. Li C, Lim WS, Sun BK, Yang CW. Chronic cyclosporine nephrotoxicity: New Insights and Preventive Strategies. *Yonsei Med J* 2004; 45(6):1004-16.
15. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Lewis CC, Patrick GH, Anjana R. Affinity driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than ciclosporine A . *Science* 1999; 285:2129-2133.

16. English J, Evan A, Houehton DC, Bennett WM. Cyclosporine induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 1987; 44:135-41.
17. Potier M, Wolf A, Cambar J. Comparative study of cyclosporine A, cyclosporine G, and the novel cyclosporine derivative IMM 125 in isolated glomeruli and cultured rat mesangial cells: A morphometric analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:1406-1411.
18. Vieira Jr JM, Burdmann EA. Nefrotoxicidade por ciclosporina. In: Cruz J, Barros RT, Editores. *Atualidades em Nefrologia 4*. São Paulo: Sarvier; 1996. p.291-300.
19. Lyson T, McMullan DM, Ermel LD, Morgan BJ, Victor RG. Mechanism of cyclosporine-induced sympathetic activation and acute hypertension in rats. *Hypertension* 1994; 23:667-75.
20. Klintman G, Althoff P, Apleby G, Segerbrandt E. Renal function in a newborn baby delivered of a renal transplant patient taking cyclosporine. *Transplantation* 1984; 38(2):198.
21. Bennett WM, Burdmann EA, Andoh TF, Houghton DC, Lindsley J, Elzinga LW. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:141-45.
22. Coffman TM, Carr DR, Yarger WE, Klotman PE. Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1987; 43:282-85.

23. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzi G. Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *Am J Physiol* 1986; 251:F581-F587.
24. Smeeters C, Chaland P, Giroux L, Moutquin JM, Etienne P, Douglas F, *et al.* Prevention of acute cyclosporine A nephrotoxicity by a thromboxane synthetase inhibitor. *Transplant Proc* 1988; 20:658-64.
25. Assis SM, Monteiro JL, Seguro AC. L-Arginine and allopurinol protect against cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1997; 63:1070-73.
26. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, Lopez P, Mendoza S, Garcia-Torres R, *et al.* Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1994; 46:773-79.
27. Burdmann EA, Yu L, Andoh TF, Perico N, Bennett WM. Calcineurin inhibitors and sirolimus. In: De Broe ME, Porter GA, Bennett WM, Verpooten GA, Editores. *Clinical Nephrotoxins*. 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers; 2002; 403-58.
28. Burdmann EA, Vieira Jr JM, Vidal EC. Nefropatia crônica e túbulo intersticial. In: Riella MC, Editores. *Princípios de nefrologia e distúrbios eletrolíticos*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2003. p, 466-69.
29. Bennett WM, De Mattos A, Meyer MM, Andoh TF, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: The Achilles heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996; 50:1089-1100.
30. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 1995; 48:S63-S69.

31. Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4(2):214-21.
32. Hamahira K, Lijima K, Tanaka R, Nakamura H, Yoshikawa N. Recovery from cyclosporine-associated arteriopathy in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrology* 2001; 16:723-727.
33. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA, Coffman TM, *et al.* Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol* 1995; 269(4 Pt 2):F491-9.
34. Yong EW, Ellis CN, Messana JM, Johson KJ, Leichtman AB, Mihatsch MJ, *et al.* Prospective study of renal structure and function in psoriasis patients treated with cyclosporin. *Kidney Int* 1994; 46:1216-22.
35. Jungers P, Massy ZA, Khoa NT, Fumeron C, Labruine M, Lacour B. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:2597-602.
36. Gomes FBC. Conseqüências do tabagismo para a saúde. Brasília (DF): Câmara dos Deputados; 2003 [citado 2005 Out 28]. Disponível em www2.camara.gov.br/publicações/estnottec/tema19/pdf/309518.pdf.
37. Fernández-Miranda C, Sanz M, dela Calle A, Loinaz C, Gómez R, Jiménez C, *et al.* Cardiovascular risk factors in 116 patients 5 years or more after liver transplantation. *Transplant. Int* 2002;15:556-62.

38. Böhlke M, Marini SM, Rocha M, Gomes RH, Terhorst L, Barcellos FC. Reabilitação e qualidade de vida após o transplante renal. *JBT* 2003; 6(3):1-4.
39. Nina Zitt, Barbara Kollerits, Ulrich Neyer, Walter Mark, Dorothea Heining, Gert Mayer, *et al.* Cigarette smoking and chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 3034–3039.
40. Arend SM, Mallat MJK, Westendorp RJW, van der Woude FJ, van Es LA. Patient survival after renal transplantation: More than 25 years follow-up. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997; 12:1672–9.
41. Ritz E, Benck U, Franek E, Keller C, Seyfarth M, Clorius JJ. Effects of smoking on renal hemodynamics in healthy volunteers and in patients with glomerular disease. *Am Soc Nephrol* 1998; 9:1798-804.
42. Orth SR, Stöckmann A, Conradt C, Ritz E, Ferro M, Kreuzer W, *et al.* Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men primary renal disease. *Kidney Int* 1998; 54(3):926-31.
43. Regalado M, Yang S, Wesson DE. Cigarette smoking is associated with augmented progression of renal insufficiency in severe essential hypertension. *Am J Kidney Diseases* 2000; 35(4):687-94.
44. Chuahirun T, Wesson DE. Cigarette smoking predicts faster progression of type 2 established. *Am J Kidney Diseases* 2002; 39(2):376-382.
45. Mur C, Clària J, Rodela S, Lario S, Campistol JM, Titos E, *et al.* Cigarette smoke concentrate increases 8-epi-PGF2 α and TGF- β 1 secretion in rat mesangial cells. *Life Sciences* 2004; 75:611-621.

46. Jardim JR, Oliveira JCA, Tabagismo. Disponível em: <<http://www.pneumoatual.com.br/> 2003>. Acessado em: 18/01/2006.
47. Henningfield JE, Keenan RM. Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J Consult Clin Psychol* 1993; 61: 743-50.
48. Orth SR, Viedt C, Ritz E. Adverse effects of smoking in the renal patient. *Tohoku J Exp Med* 2001; 194:1-15.
49. Odoni G, Ogata H, Viedt C, Amann K, Ritz E, Orth SR. Cigarette smoke condensate aggravates renal injury in the renal ablation model. *Kidney Int* 2002; 61(6):2090-8.
50. Gambaro G, Verlato F, Budakovic A, Casara D, Saladini G, Prete D Del, *et al.* Renal Impairment in Chronic Cigarette Smokers. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 1:A72.
51. Orth SR. Effects of smoking on systemic and intrarenal hemodynamic: Influence on Renal Function. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:S58-S63.
52. Lhotta K, Rumpelt HJ, König P, Mayer G, Kronenberg F. Cigarette smoking and vascular pathology in renal biopsies. *Kidney Int* 2002; 61(2):648-54.
53. Molander L, Hansson A, Lunell E, Alaintalo L, Hoffmann M, Larsson R. Pharmacokinetics of nicotine in kidney failure. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2000; 68(3):250-260.
54. Saad PCB, Cury PM. Efeitos da associação do beta-caroteno, alfa-tocoferol e do fumo no câncer de pulmão [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2006.

55. Culhaci N, Meteoglu I, Dundar M, Kocak I. Histopathological evaluation of renal vascular changes in rats exposed to passive smoking. *Pathology Oncology Research* 2005; 11(2):121-4.
56. Merz WA. Distance measurement of directed structures in the microscope and its use in the determination of surface and volume relationship in bone tissue. *Mikroskopie* 1968; 22(5):132-42.
57. Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, *et al.* Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 2000; 57:167-82.
58. Elzinga LW, Rosen S, Burdmann EA, Hatton DC, Lindsley J, Bennett W. The role of renal sympathetic nerves in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* 2000; 69(10):2149-53.
59. Burdmann EA, Andoh TF, Lindsley J, Russell J, Bennett WM, Porter G. Urinary enzymes as biomarkers of renal injury in experimental nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Renal Fail* 1994; 16(1):161-8.
60. Burdmann EA, Andoh TF, Rosen S, Lindsley J, Munar MY, Elzinga LW, *et al.* Experimental nephrotoxicity, hepatotoxicity and pharmacokinetics of cyclosporin G versus cyclosporin A. *Kidney Int* 1994; 45:684-91.
61. Kheradmand A, Shahbazian H. The role of pretransplant smoking on allograft survival in kidney recipients. *Urology Journal (Printed in IRAN)*. 2005; 1(2):36-39.

62. Halimi JM, Giraudeau B, Vol S, Cace'S E, Nivet H, Lebranchu Y, *et al.* Effects of current smoking and smoking discontinuation on renal function and proteinuria in the general population. *Kidney Int* 2000; 58:1285–1292.
63. Cosio FG, Falkenhain ME, Pesavento TE, Yim S, Alamir A, Henry ML, *et al.* Patient survival after renal transplantation: The impact of smoking. *Clin Transplant* 1999; 13(4):336-41.
64. Gowilly SME, Ghazal ARM, Gohar EY, Mas MME. Exacerbation by nicotine of the cyclosporine a-induced impairment of β -adrenoceptor-mediated renal vasodilation in rats. *Clinical and Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:1164-1171.
65. Jaimes EA, Tian RX, Raji L. Nicotine: the link between cigarette smoking and the progression of renal injury? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 292:H76-H82.
66. Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, *et al.* Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H130–H139.
67. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol* 2006; 21:301-16.
68. Josephine A, Amudha G, Veena CK, Preetha SP, Varalakshmi P. Oxidative and nitrosative stress mediated renal cellular damage induced by cyclosporine A: role of sulphated polysaccharides. *Biol Pharm Bull* 2007;30(7):1254-9.

-
69. Capasso G, Di Gennaro CI, Ragione FD, Manna C, Ciarcia R, Florio S, *et al.* *In vivo* effect of the natural antioxidant hydroxytyrosol on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:1186-95.
 70. Ghaznavi R, Zahmatkesh M, Kadkhodae M, Mahdavi-Mazdeh M. Cyclosporine effects on the antioxidant capacity of rat renal tissues. *Transplant Proc* 2007; 39:866-7.
 71. Carlos CP, Mendes GEF, Miquelin AR, Luz MAM, Silva CGA, van Rooijen N, *et al.* Macrophage Depletion Attenuates Chronic Cyclosporine A Nephrotoxicity. *Transplantation* 2010; 89(11):1362-70
 72. Amudha G, Josephine A, Sudhakar V, Varalakshmi P. Productive effect of lipoic acid on oxidative and peroxidative damage in cyclosporine A-induced renal toxicity. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(11):1442-9.
 73. Soares TJ, Volpini RA, Francescato HDC, Costa RS, da Silva CGA, Coimbra TM. Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury. *Life Sci* 2007; 81:647-56.
 74. Navarro-Antolin J, Redondo-Horcajo M, Zaragoza C, Alvarez-Barrientos A, Fernández AP, León-Gómez E, *et al.* Role of peroxynitrite in endothelial damage mediated by cyclosporine A. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(3):394-403.
 75. Djamali A, Vidyasagar A, Adulla M, Hullett D, Reese S. Nox-2 is a modulator of fibrogenesis in kidney allografts. *Am J Transplant* 2009; 9:74-82.
 76. Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B, *et al.* Therapeutic role of TGF- β -neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy:

- morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:377-88.
77. Louhelainen M, Merasto S, Finckenberg P, Lapatto R, Cheng ZJ, Mervaala EM. Lipoic acid supplementation prevents cyclosporine-induced hypertension and nephrotoxicity hypertensive rats. *Hypertens* 2006; 24(5):947-56.
78. Machado GF, Figueiredo F. Revisão: filamentos intermediários. *Medicina* 1996; 29:104-13.
79. Matos ACC, Franco MF, Moura LAR, Moreira FR, Filho APS. A expressão de vimentina é um preditor de disfunção renal após o transplante renal. *Einstein* 2007; 5(2):153-60.
80. Alpers CE, Hudkins KL, Floege J, Johnson RJ. Human renal cortical interstitial cells with some features of smooth muscle cells participate in tubulointerstitial and crescent glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5(2):201-9.
81. Floege J, Alpers CE, Sage EH, Pritzl P, Gordon K, Johnson RJ, *et al.* Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo. Expression of antiadhesive proteins and cytoskeletal changes. *Lab Invest* 1992; 67(4):487-97.
82. Grone HJ, Weber K, Grone E, Helmchen U, Osborn M. Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. *Am J Pathol* 1987; 129(1):1-8.
83. Strutz F, Zeisberg M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *Am J Soc Nephrol* 2006; 17:2992-8.

84. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Inv* 2003; 112(12):1776-84.
85. Slattery C, McMorrow T, Ryan MP. Overexpression of E2A proteins induces epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells suggesting a potential role in renal fibrosis. *Febs Lett* 2006; 580(17):4021-30.
86. Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 2005; 167(2):395-407.
87. McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(10):2215-25.
88. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, *et al.* Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48(2):431-8.
89. Sabry A, El-Husseini A, Sheashaa H, Abdel-Shafy E, El-Dahsahn K, Abdel-Rahim M, *et al.* Colchicine vs. omega-3 fatty acids for prevention of chronic cyclosporine nephrotoxicity in Sprague Dawley rats: an experimental model. *Arch Med Res* 2006; 37(8):933-40.
90. Lloberas N, Torras J, Alperovich G, Cruzado JM, Giménez-Bonafé P, Herrero-Fresneda I, *et al.* Different renal toxicity profiles in the association of cyclosporine and tacrolimus with sirolimus in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(10):3111-9.

91. Bakker RC, Koop K, Sijpkens YW, Eikmans M, Bajema IM, Heer ED, *et al.* Early interstitial accumulation of collagen type I discriminates chronic rejection from chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2142-9.

7. APÊNDICES

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Médias individuais dos grupos VH/S e VH/F.

Tabela 3. Função e hemodinâmica renal.

Parâmetro	Grupos	
	VH/S	VH/F
FGR (ml/min/100g)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2
FSR (ml/min)	6,5 ± 1,0	6,8 ± 1,1
RVR (mmHg/ml/min)	16,8 ± 2,3	16,7 ± 4,0
PA (mmHg)	134,5 ± 12,9	141,4 ± 9,6
VU 24 h (ml)	10,3 ± 4,7	11,0 ± 6,1

Valores apresentados como média ± desvio padrão. (p>0,005)

VH/S = veículo sem fumo; VH/F = veículo com fumo; FGR = filtração glomerular renal; FSR = fluxo sanguíneo renal; RVR = resistência vascular renal; PA = pressão arterial; VU 24h = volume urinário em 24 horas.

Tabela 4. Peso, análises bioquímicas e hematócrito.

Parâmetro	Grupos	
	VH/S	VH/F
PIF (g)	267 ± 14	275 ± 28
PIC (g)	327,0 ± 17	325,0 ± 29
PDE (g)	323 ± 17	325 ± 34
Osm _U (mOsm/Kg)	399,4 ± 125	363,62 ± 143
Fe _{Na} (%)	0,25 ± 0,04	0,017 ± 0,01
Fe _K (%)	2,2 ± 2,9	2,7 ± 3,9
Hematócrito (%)	45,1 ± 2,9	45,0±2,7

Valores apresentados como média ± desvio padrão. ($p > 0,05$)

VH/S = veículo sem fumo; VH/F = veículo com fumo; PIF = peso no início do fumo ou sham; PIC = peso no início do tratamento com CsA ou VH; PDE = peso no dia do experimento; Osm_U = osmolalidade urinaria; Fe_{Na} = fração de excreção de sódio; Fe_K = fração de excreção de potássio.

Tabela 5. Análise histológica e imunohistoquímica.

Parâmetro	Grupos	
	VH/S	VH/F
FI (%)	1 ± 0,9	3 ± 2
α-SMA túbulo intersticial	0,7±0,3	0,9±0,3
α-SMA periglomerular	0,2±0,1	0,3±0,1
Nitrotirosina	2,2±0,3	2,5±0,5
Vimentina	0,0±0	0,0±0

Valores apresentados como média ± desvio padrão. ($p > 0,05$)

VH/S = veículo sem fumo; VH/F = veículo com fumo; FI = fibrose intersticial;

8. ANEXO**Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.**

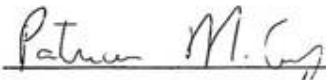
<p>Comissão de Ética na Experimentação Animal</p> <p>CEEA FAMERP</p>	<p><i>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto</i></p> <p>Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA</p> <p>FAMERP Autarquia Estadual - Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090 000 FAX 2276404 S.J.R.P - SP</p>
---	--

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto de pesquisa intitulado "Efeito do cigarro na nefrotoxicidade causada pela Ciclosporina A." (Prot. FAMERP 630306) sob responsabilidade do Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann, por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovado pela CEEA-FAMERP.

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

São José do Rio Preto, 18 de Janeiro de 2006.



Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury
Presidente CEEA - FAMERP