



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

Ida Maria Maximina Fernandes-Charpiot

**Efeito da Metilprednisolona na Lesão de Isquemia
e Reperusão Renal**

**São José do Rio Preto
2011**

*Ao meu amado marido **Charles***

*Aos meus pais **Atilio e Alice***

*À minha querida enteada **Hilary***

*Aos meus irmãos **Francisco, Osmar, Aldo, Dirceu e Atílio***

Pelo amor, compreensão e apoio constantes.

*E a **DEUS***

Pela minha vida e pela oportunidade e inspiração de ser produtiva.

Ida Maria Maximina Fernandes-Charpiot

**Efeito da Metilprednisolona na Lesão de Isquemia
e Reperusão Renal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann

São José do Rio Preto
2011

Fernandes-Charpiot, Ida Maria Maximina

Efeito da metilprednisolona na lesão de isquemia e reperfusão renal / Ida Maria Maximina Fernandes-Charpiot

São José do Rio Preto, 2011

75 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann

1. Lesão isquemia/reperfusão; 2. Insuficiência renal aguda isquêmica;
3. Metilprednisolona; 4. Rim.

Ida Maria Maximina Fernandes-Charpiot

**Efeito da Metilprednisolona na Lesão de Isquemia
e Reperusão Renal**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Emmanuel de Almeida Burdmann

2º Examinador: Carla Patrícia Carlas

3º Examinador: André Luís Balbi

4º Examinador: José Paulo Cipullo

5º Examinador: Emerson Quintino de Lima

**Suplentes: Etienne Maria Vasconcellos de Macedo
Ricardo Luiz Dantas Machado**

São José do Rio Preto, 12/ 12/ 2011

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimento especial.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Epígrafe.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	01
1.1. Injúria Renal Aguda.....	02
1.2. Injúria Renal Aguda Isquêmica.....	03
1.2.1. Definição.....	03
1.2.2. Sítio de Lesão e Patogenia.....	04
1.3. Inflamação na IRA Isquêmica.....	07
1.3.1. Ativação Endotelial.....	07
1.3.2. Ativação Tubular.....	08
1.3.3. Células Inflamatórias.....	09
1.3.3.1. Neutrófilo.....	09
1.3.3.2. Macrófago.....	09
1.3.3.3. Células Dendríticas.....	10
1.3.3.4. Linfócito.....	10
1.3.4. Citocinas e Quimiocinas.....	11

1.3.4.1. Citocinas.....	12
1.3.4.2. Quimiocinas.....	13
1.4. Metilprednisolona.....	13
1.4.1. Efeitos da Metilprednisolona na Lesão de Isquemia/ Reperusão.....	14
1.5. Objetivo.....	16
2. Material e Métodos.....	17
2.1. Animais.....	18
2.2. Pré-Operatório.....	18
2.3. Técnica Operatória (primeiro procedimento cirúrgico).....	19
2.4. Delineamento do Estudo.....	20
2.5. Estudo da Fração de Excreção de Sódio e da Osmolalidade Urinária.....	21
2.6. Estudo da Função Renal (segundo procedimento cirúrgico).....	22
A. Traqueostomia.....	22
B. Acesso Vascular e Cistostomia.....	23
C. Depuração de Inulina.....	23
D. Aferição da Pressão Arterial.....	24
2.7. Análise Imuno-histoquímica.....	24
A. Perfusão Renal e Armazenamento.....	24
B. Imuno-histoquímica.....	25
C. Avaliação dos Resultados de Imuno-histoquímica.....	26
2.8. Análise Histológica.....	27
2.9. Análise Estatística.....	28

3. Resultados.....	29
3.1. Peso.....	30
3.2. Volume Urinário de 24 horas.....	31
3.3. Pressão Arterial.....	32
3.4. Filtração Glomerular.....	33
3.5. Fração de Excreção de Sódio.....	34
3.6. Osmolalidade Urinária.....	35
3.7. Histopatologia.....	36
3.8. Imuno-histoquímica.....	40
3.8.1. Neutrófilo.....	40
3.8.2. Macrófago.....	42
3.8.3. Linfócito.....	44
3.8.4. Fator Nuclear Kappa – B (NFκ-B).....	46
4. Discussão.....	49
5. Conclusões.....	58
6. Referências Bibliográficas.....	60
7. Apêndice.....	70
8. Anexos.....	73

Ao Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann, pela amizade, orientação e inestimável estímulos dados durante a realização deste trabalho.

- ✓ Ao **Curso de Pós-graduação da FAMERP**, na pessoa do **Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile**, que proporcionou a realização deste trabalho.

- ✓ Aos funcionários da **Pós-graduação da FAMERP Fabiana Cristina Godoy, José Antônio Silistino, Luiz Henrique Oliveira Ferreira e Rosimere Cleide Souza Desidério**, pelo carinho com o qual sempre me auxiliaram nessa jornada.

- ✓ À **Faculdade de Medicina da São José do Rio Preto – FAMERP**, na pessoa do Excelentíssimo Diretor **Dr. Humberto Liedtke Junior**, pelo apoio sempre presente.

- ✓ Ao **Departamento de Medicina I FAMERP/FUNFARME**, representado pelo **Dr. Sérgio Mussi Guimarães** e à **Disciplina de Nefrologia – FAMERP**, representada pelo **Dr. Mario Abbud-Filho**, pelo apoio constante.

- ✓ À **Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFRME**, na pessoa do Diretor Administrativo **Dr. Jorge Fares** e do Diretor Executivo **Dr. Horácio José Ramalho**, pela cooperação.

- ✓ Ao **Dr. Mario Abbud-Filho**, pela amizade, valioso incentivo e apoio inestimável na execução deste trabalho.

- ✓ À **Dra. Maria Alice Sperto Ferreira Baptista**, pelo apoio e pela colaboração na análise histológica.

- ✓ À **Dra. Glória Elisa Florido Mendes**, por sua indispensável colaboração, treinamento e apoio nos experimentos realizados no Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

- ✓ À **Dra. Heloisa Cristina Caldas**, pela amizade, estímulo constante e imensurável apoio durante todo trabalho.

- ✓ A **Profa. Dra. Terezila Coimbra**, por ter viabilizado a realização da imunohistoquímica.

- ✓ Ao **Dra. Heloisa Francescato**, pela paciência, apoio e treinamento na imunohistoquímica.

- ✓ À **Dra. Ana Regina Chinelato-Fernandes**, pelo apoio incondicional, companheirismo e auxílio na metodologia científica.

- ✓ Às colegas do Laboratório de Fisiologia Renal da FAMERP, **Bárbara Costa e Monique Martinez**, pelo companheirismo e pela realização de dosagens bioquímicas.

- ✓ À matemática **Luna Hidalgo**, pelo auxílio na análise estatística.

- ✓ Aos colegas, **Carla Graça e Alessandro Catelan**, do Laboratório de Investigação Neuromuscular da FAMERP, pela amizade, apoio e colaboração.

- ✓ A todos os colegas do **Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia** da FAMERP, representados pela **Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, Marcela Augusta de Souza Pinhel e Greciane Silva Florin**.

- ✓ Ao **Biotério da FAMERP**, em especial aos funcionários: **Sr. Pedro de Freitas e Sra. Dália**, pela ajuda no cuidado e acesso aos animais.

- ✓ Aos **Animais de Laboratório** que viabilizam os trabalhos experimentais permitindo o avanço da Ciência Médica e o melhor cuidado dos pacientes.

Aprendendo algo novo todo dia,

é o que a vida realmente é.

Thomas Arthur Manhart

Figura 1.	Local de lesão da IRA isquêmica: faixa externa da medula renal (seta contínua), segmento S3 do túbulo proximal (seta pontilhada)....	04
Figura 2.	Cascata da patogenia da IRA isquêmica.....	06
Figura 3.	Esquematização do “cross-talk” entre as células envolvidas na resposta à lesão de isquemia e reperfusão.....	12
Figura 4.	Delineamento do estudo.....	21
Figura 5.	Histograma das médias de pesos dos ratos.....	30
Figura 6.	Histograma das médias dos volumes urinários dos ratos.....	31
Figura 7.	Histograma das médias da pressão arterial média dos ratos.....	32
Figura 8.	Histograma representando as médias de taxa de filtração.....	33
Figura 9.	Histograma representando a fração de excreção de sódio.....	34
Figura 10.	Histograma representando a osmolalidade urinária.....	35
Figura 11.	Histograma representando os escores das alterações histológicas.....	38
Figura 12.	Fotomicrografias da medula renal de ratos dos grupos Sham, Veic-I/R e MP-I/R, respectivamente em HE x200 (A,B,C) e em HE x400 (D,E,F). Necrose tubular aguda (NTA) focal-setas (B), moderada dilatação tubular e alterações degenerativas epiteliais agudas (ADEA) (E) no grupo Veic-I/R. Discreta ADEA e dilatação tubular no grupo MP-I/R (C,F). Ausência de NTA nos grupos Sham e MP-I/R (A,C).....	39
Figura 13.	Histograma da média de células positivas para neutrófilo na medula externa, glomérulos e interstício do córtex renal.....	41
Figura 14.	Histograma da média de células ED-1 positivas na medula externa, glomérulo e interstício do córtex renal.....	43
Figura 15.	Histograma da média de linfócitos na medula externa, interstício e glomérulos do córtex renal.....	45
Figura 16.	Histograma das médias dos escores para NFκB na medula externa, no córtex renal.....	47
Figura 17.	Preparação imuno-histoquímica, dos grupos Sham, Veic-I/R e MP-I/R, com anticorpo anti-ED-1 (A,B,C), anti-granulócitos (D,E,F), anti-linfócitos (G,H,I) e anti-NFκ-B (J,K,L), na medula externa renal.....	48

Figura 18. Efeito da metilprednisolona na depuração de inulina (mL/min/100g)
em 2 e 7 dias após lesão de I/R..... 74

Tabela 1.	Relação de citocinas, quimiocinas e células envolvidas na resposta inflamatória desencadeada pela lesão de isquemia e reperfusão.....	11
Tabela 2.	Histologia renal nos grupos Sham, Veic-I/R e MP-I/R.....	37
Tabela 3.	Análise quantitativa de células positivas para granulócitos na medula externa, interstício e córtex renal.....	41
Tabela 4.	Análise quantitativa de células ED-1 positivas na medula externa, interstício e córtex renal.....	42
Tabela 5.	Análise quantitativa de linfócitos na medula externa, glomérulos e interstício do córtex renal.....	44
Tabela 6.	Análise da média de escores para NFκB na medula externa e córtex renal.....	46

ADEA	- Alterações degenerativas epiteliais agudas
Ag	- Antígeno
AKI	- “ <i>Acute kidney injury</i> ”
AKIN	- “ <i>Acute Kidney Injury Network</i> ”
Alpha-MSH	- Hormônio alfa estimulador dos melanócitos
ANOVA	- Análise de variância
APCs	- Células apresentadoras de antígenos
BSA	- Albumina de soro bovino
C	- Celsus
C3A	- Componente 3ª do complemento
Ca ⁺⁺	- Cálcio
CEEA	- Comissão de Ética na Experimentação Animal
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	- Ciclooxigenase
Crry	- “ <i>Complement Receptor 1-Related protein y</i> ”
Cr _p	- Creatinina plasmática
Cr _u	- Creatinina urinária
DAB	- 3,3-diaminobenzidina
DC	- Células dendríticas
DP	- Desvio padrão

DT	- Dilatação tubular
EI	- Edema intersticial
EV	- Espessamento dos vasos
EUA	- Estados Unidos da América
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FENa	- Fração de excreção de sódio
FSR	- Fluxo sanguíneo renal
FUNFARME	- Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
IL	- Interleucina
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular
INF	- Interferon
iNOS	- Óxido nítrico induzível
IR	- Isquemia renal
I/R	- Isquemia/reperfusão
IRA	- Injúria renal aguda
IRF-1	- Fator regulatório de interferon-1
KIM-1	- “ <i>Kidney Injury Molecule-1</i> ”
Lo	- Linfócito
Mo	- Macrófago

MCP-1	- Molécula de adesão intercelular
ME	- Medula renal externa
MEAAH	- Porção medular do segmento espesso do ramo ascendente da alça de Henle
MHC	- Complexo maior de histocompatibilidade
MIP-1 α	- Proteína inflamatória de macrófago - 1 α
MP	- Metilprednisolona
MP-I/R	- Grupo metilprednisolona e isquemia renal
No	- Neutrófilo
Na ⁺	- Sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
Na _p	- Sódio plasmático
Na _u	- Sódio urinário
NF- κ B	- Fator-kapa-B nuclear
NS	- Não significativa
NTA	- Necrose tubular aguda
O ₂	- Oxigênio
OAR	- Oclusão completa da artéria renal
ON	- Óxido nítrico
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato

RANTES	- “ <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i> ”
RFG	- Ritmo de filtração glomerular
RIFLE	- “ <i>Risk, Injury, Failure, Loss, End stage renal disease</i> ”
RG	- Retração glomerular
SF	- Solução de cloreto de sódio
STAT	- “ <i>Signal Transducers and Activators of Transcription protein</i> ”
TGF	- Fator de crescimento tumoral
TRLs	- Receptores “ <i>toll-like</i> ”
TNF	- Fator de necrose tumoral
TxF	- Transplante de fígado
UK	- “United Kingdom”
USP	- Universidade de São Paulo
Veic-I/R	Grupo veículo com isquemia renal
VI	- Via intravenosa
vs.	- Versus

Introdução: A isquemia renal é a causa mais importante de injúria renal aguda (IRA) hospitalar. A metilprednisolona (MP) tem se mostrado protetora contra a lesão de isquemia/reperfusão (I/R) em fígado e coração. **Objetivo:** Estudar o possível efeito protetor da MP na lesão de I/R renal. **Métodos:** Ratos machos Wistar foram tratados com 30mg/kg, por via intravenosa, de MP ou solução de NaCl 0,9%, 1 hora antes de isquemia renal (IR) unilateral de 30 min. Os animais foram divididos em três grupos (n de 8 em cada grupo): Sham (cirurgia sham sem IR), Veículo (Veic)-I/R (infusão de solução de NaCl 0,9% seguida por IR), e MP-I/R (infusão de MP seguida por IR). O RFG (depuração de inulina, ml/min/100g), a fração de excreção de sódio (FENa), a osmolalidade urinária e a análise histológica foram analisados dois dias após IR. Realizou-se também imuno-histoquímica (dois dias após IR) para quantificação de macrófagos (ED-1), neutrófilos (No), linfócitos (Lo) e fator-kapa-B nuclear (NFκ-B). Os resultados são expressos como média ± DP e foram comparados por ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, com $p < 0,05$. **Resultados:** O RFG foi $0,92 \pm 0,30$ ml/min/100g no grupo MP-I/R, $0,90 \pm 0,27$ ml/min/100g no grupo Sham e $0,47 \pm 0,24$ ml/min/100g no grupo Veic-IR, ($p < 0,05$ vs. MP-I/R e Sham). A FENa foi semelhante nos grupos MP-I/R (0,19%) e Sham (0,35%, NS), e maior no grupo Veic-I/R (0,62%, $p < 0,05$ vs. MP-I/R). Volume e osmolalidade urinária foram similares entre os três grupos. Constataram-se alterações epiteliais degenerativas agudas e dilatação tubular significativamente mais intensas no grupo Veic-I/R em relação aos grupos MP-I/R e Sham. Apenas o grupo Veic-I/R apresentou focos de necrose tubular aguda. O número de Lo foi significativamente maior no grupo Veic-I/R comparado aos grupos Sham e MP-I/R no córtex ($14,36 \pm 3,32$ vs. $6,75 \pm 1,18$ e $5,31 \pm 1,63$, respectivamente, $p < 0,05$ Veic-I/R vs. Sham e I/R-MP) e medula externa (ME) ($10,58 \pm 3,04$ vs. $4,51 \pm 1,29$ e

$3,70 \pm 0,62$; $p < 0,05$ Veic-I/R vs. Sham e MP-I/R). O número de macrófagos também foi significativamente maior no grupo Veic-I/R ($9,84 \pm 3,18$) comparado com Sham ($4,65 \pm 1,12$; $p < 0,05$) e MP-/IR ($4,06 \pm 1,84$; $p < 0,05$). Da mesma forma, o número de No na medula externa foi $3,13 \pm 2,09$ em Veic-I/R vs. $0,74 \pm 0,51$ em Sham e $1,44 \pm 1,11$ em MP-I/R ($p < 0,05$ Veic-I/R vs. Sham). A expressão de NF κ -B foi significativamente mais intensa na medula externa do grupo Veic-I/R comparada com os grupos Sham e MP-I/R ($0,61 \pm 0,33$ vs. $0,03 \pm 0,03$ e $0,12 \pm 0,11$, respectivamente, $p < 0,05$). **Conclusão:** O pré-tratamento com doses elevadas de MP protegeu intensamente os animais contra a lesão de I/R renal. Este efeito protetor foi relacionado à modulação de mecanismos de inflamação e infiltração por células inflamatórias desencadeados pela I/R.

Palavras-chave: Lesão isquemia/reperfusão; Insuficiência renal aguda isquêmica; Metilprednisolona; Rim.

Introduction: Renal ischemia is the most important cause of acute kidney injury (AKI). Methylprednisolone (MP) has been shown to give protection against ischemia/reperfusion injury (I/R) in the liver and the heart. **Objective:** To examine a possible protective role of MP in renal I/R. **Methods:** Male Wistar rats were treated with 30mg/kg of intravenous MP or saline 1 hour before unilateral renal ischemia (RI), which lasted for 30 minutes. The animals were divided into 3 groups (8 in each group): Sham (sham surgery without RI), Vehicle (Veic)-I/R (saline infusion followed by RI), and the MP-I/R group (MP infusion followed by RI). The glomerular filtration rate (GFR) - which is inulin clearance in ml/min/100g, sodium fractional excretion (FENa), urinary osmolality, and histological analysis were assessed 2 days after RI. Additionally, immunohistochemical staining (2 days after RI) was performed to measure macrophages (ED-1 positive cells), neutrophils (No), and lymphocytes (Lo) and the nuclear factor- κ B (NF κ -B). Results are expressed as mean \pm SD, and were compared by ANOVA, followed by Bonferroni test, with $p < 0.05$. **Results:** GFR was 0.92 ± 0.30 ml/min/100g in the MP-I/R group, 0.90 ± 0.27 ml/min/100g in the Sham group, and 0.47 ± 0.24 ml/min/100g in the Veic-I/R group ($p < 0.05$ vs. MP-I/R and Sham). The FENa was similar in the MP-I/R (0.19%) and Sham groups (0.35%, NS), and higher in the Veic-I/R group (0.62%, $p < 0.05$ vs. MP-I/R). Urinary osmolality was similar between the 3 groups. Acute epithelial degenerative changes and tubular dilatation were significantly more intense in the Veic-I/R group than the MP-I/R and Sham groups. Only the Veic-I/R group presented with focal acute tubular necrosis. In the cortex, the number of Lo was significantly greater in the Veic-I/R group when compared with the Sham and MP-I/R groups (14.36 ± 3.32 vs. 6.75 ± 1.18 and 5.31 ± 1.63 , respectively, $p < 0.05$ Veic-I/R vs. Sham and MP-I/R) and in the outer medulla

(OM) areas (10.58 ± 3.04 vs. 4.51 ± 1.29 and 3.70 ± 0.62 , $p < 0.05$ Veic-I/R vs. Sham and MP-I/R). The number of macrophages was also significantly greater in the Veic-I/R group (9.84 ± 3.18) when compared with Sham (4.65 ± 1.12 , $p < 0.05$) and MP-I/R groups (4.06 ± 1.84 , $p < 0.05$). Similarly, the number of No in the OM was 3.13 ± 2.09 in Veic-I/R vs. 0.74 ± 0.51 in Sham group, and 1.44 ± 1.11 in the MP-I/R group ($p < 0.05$). The NF κ -B expression was more intense in the OM in the Veic-I/R group compared with the Sham and in the MP-I/R groups (0.61 ± 0.33 vs. 0.03 ± 0.03 and 0.12 ± 0.11 respectively, $p < 0.05$). **Conclusion:** The pretreatment with high doses of MP conferred striking protection against renal I/R. This protection effect was related to the modulation of I/R-induced inflammatory mechanisms and to inflammatory cell infiltration triggered by I/R.

Keywords: Ischemia/reperfusion injury; Ischemic acute kidney injury;
Methylprednisolone; Kidney

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Injúria renal aguda

A injúria renal aguda é usualmente classificada como pré-renal (resposta funcional à hipoperfusão de rim estruturalmente normal), pós-renal (obstrução do fluxo urinário) e renal intrínseca (dano estrutural ao parênquima renal).⁽¹⁾

Divide-se a injúria renal aguda intrínseca (IRA), quanto ao local de acometimento, em intersticial (nefrite intersticial aguda), glomerular (glomerulonefrites), vascular (doença renal ateroembólica, síndrome hemolítica urêmica) e tubular (de origem nefrotóxica, isquêmica ou mista).⁽²⁾

O estudo da IRA foi dificultado durante muitos anos pela falta de uma definição precisa e uniforme.⁽³⁾ Isso ocorreu em função da IRA ser uma síndrome complexa, com múltiplos fatores causais e que pode ocorrer nas mais diversas situações clínicas. Além disso, a IRA apresenta manifestação clínica muito variada, que vai desde aumento mínimo, mas sustentado da creatinina sérica, até falência renal oligúrica.⁽¹⁾

Devido a essa falta de padronização, mais de 20 definições de IRA tem sido utilizada.⁽⁴⁾ Em 2004 foi proposto o critério RIFLE com o intuito de normatizar o diagnóstico e definição de IRA. Este critério utiliza o conceito de alterações percentuais da creatinina sérica ou alterações absolutas do volume urinário para definir injúria renal aguda, que é estratificada de acordo com a sua gravidade (risco, injúria e falência) e o resultado (perda e estágio final).⁽⁵⁾ Em 2007 a “Acute Kidney Injury Network” propôs o critério AKIN, que define IRA como a redução abrupta (≤ 48 horas) da função renal evidenciada por meio do aumento do nível da creatinina sérica (absoluto, 0,3mg/dL; ou

percentual, 50% em relação ao basal) ou de diminuição da diurese (volume urinário menor do que 0,5mL/kg/h por mais de 6 horas).⁽⁶⁾

A IRA aflige ao redor de 1% das admissões hospitalares, 7% dos pacientes hospitalizados e 25% dos pacientes em unidades de terapia intensiva – UTIs. Aumentos relativamente pequenos da creatinina sérica, de 0,5mg/dL em pacientes internados aumentam em seis vezes a chance de morte desta população em relação aos que mantêm creatinina estável. Apesar dos grandes avanços no tratamento de doentes graves, a mortalidade da IRA ainda é extremamente elevada, entre 40 a 80%, dependendo do contexto em que ocorre. Vários estudos recentes identificaram a IRA como fator de risco independente para morbi/mortalidade elevada.^(1-2,7-12)

1.2. Injúria renal aguda isquêmica

1.2.1. Definição

A IRA isquêmica, inapropriadamente denominada como NTA - necrose tubular aguda - é uma síndrome que se desenvolve após diminuição total ou parcial, súbita e transitória, do fluxo sanguíneo renal (FSR).⁽¹³⁾ Pode ter várias causas, como choque, sepse, cirurgias de grande porte, hipovolemia e transplante renal.⁽²⁾ Sua alta incidência e morbi/mortalidade, e a ausência de um agente farmacológico eficaz para a sua prevenção e tratamento,⁽⁹⁾ justificam a necessidade da investigação de novas opções terapêuticas que permitam evitá-la ou pelo menos diminuir os seus efeitos danosos.

1.2.2. Sítio de lesão e patogenia

Em condições fisiológicas, os rins recebem aproximadamente 25% do débito cardíaco. O córtex renal recebe a maior parte deste fluxo, enquanto a medula renal recebe apenas 10% do seu total.⁽¹⁴⁾ Durante vasoconstrição renal, intensa e persistente, o FSR se reduz a aproximadamente 50% do normal.⁽¹⁵⁾ Esta redução não é uniforme, mas sim regional, sendo mais proeminente na faixa externa da zona externa da medula renal (Figura 1).⁽¹⁶⁾

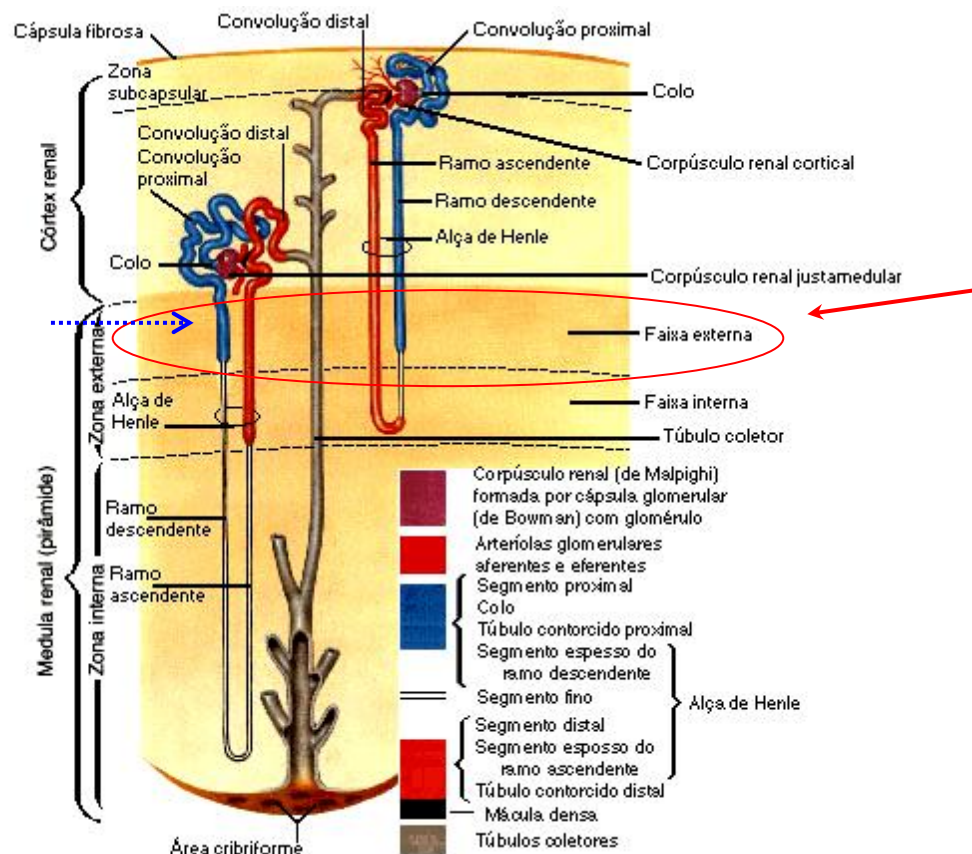


Figura 1. Local de lesão da IRA isquêmica: faixa externa da medula renal (seta contínua), segmento S3 do túbulo proximal (seta pontilhada). Adaptado do Atlas Netter 2000.

A vasa recta permite o mecanismo de contracorrente, que é vital para a manutenção da homeostase de sódio. O transporte tubular na porção medular do segmento espesso do ramo ascendente da alça de Henle (MEAAH) e o segmento S3 do túbulo proximal demandam alto consumo de oxigênio. Em situação de isquemia, o balanço de O₂ é mantido por meio da redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) e do transporte de solutos. Esse mecanismo protetor tem como efeito adverso, a produção de radicais livres, que diminuem ainda mais o FSR para a medula renal e aumentam a atividade MEAAH. A congestão vascular, efeito indesejado deste mecanismo protetor, agrava a hipóxia relativa presente nesta região, causando lesão e até mesmo morte celular nos segmentos tubulares vulneráveis. Clinicamente, isto se traduz como mais lesão durante a fase de reperfusão e persistência de congestão e hipoperfusão da medula externa, mesmo após melhora do FSR.^(9,17)

A agressão inicial leva ao dano endotelial, com consequente resposta inflamatória, que por sua vez também causa congestão vascular, aumentando a hipóxia e reduzindo a habilidade de eliminar os radicais livres. A vulnerabilidade da medula externa, causada pela sua baixa tensão de oxigênio, faz com que esta lesão se alastre e se perpetue.⁽¹⁸⁾ (Figura 2).

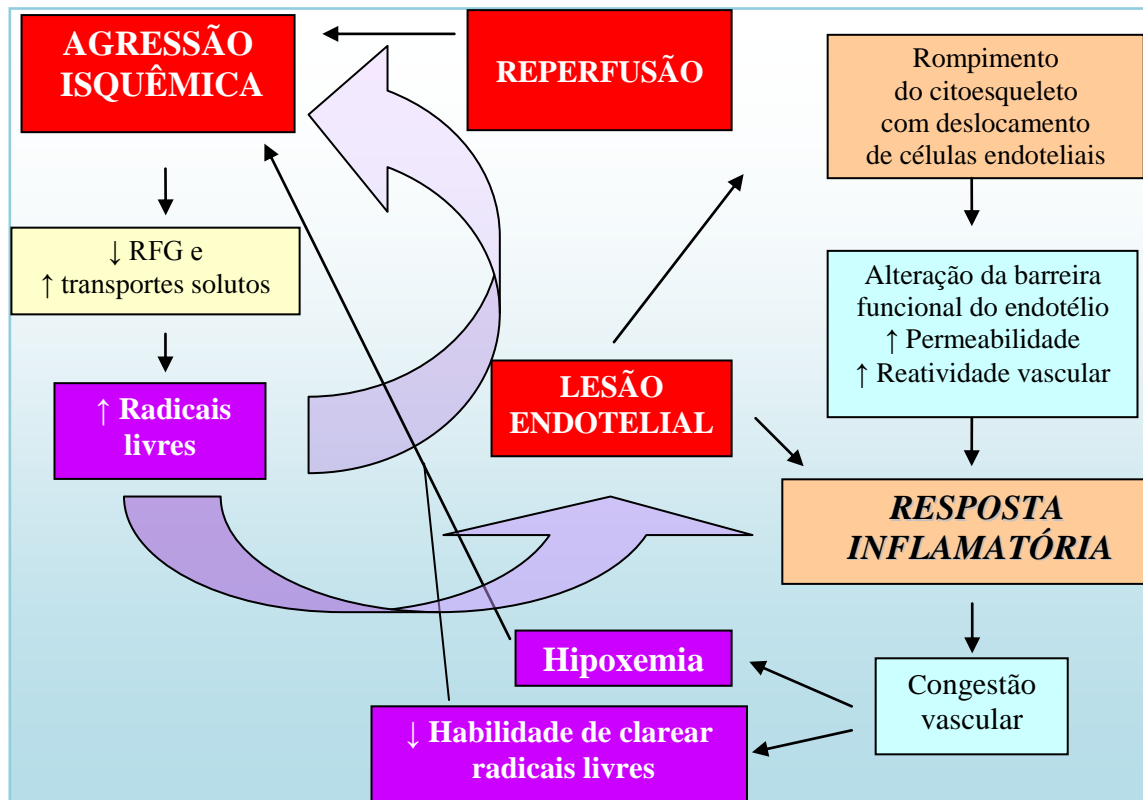


Figura 2. Cascata da patogênica da IRA isquêmica.

O dano tecidual é ainda maior pelo fato da reperfusão causar agravo adicional, a chamada lesão de reperfusão, que contribui de forma importante para a disfunção renal após isquemia/reperfusão (I/R). Enxertos renais com isquemia quente ou fria prolongada são mais susceptíveis a este tipo de lesão.⁽¹⁹⁻²¹⁾ Este conceito também se aplica a rins nativos que sofram isquemia, independentemente da causa (cirurgias cardiovasculares de grande porte, sepses, etc).

1.3. Inflamação na IRA isquêmica

Estudos experimentais e clínicos mostram que a lesão de isquemia/reperfusão é um processo inflamatório. A I/R inicialmente promove mudanças nas células do endotélio vascular e dos túbulos renais e em leucócitos, levando à perda do equilíbrio do sistema imune renal, seguido por inflamação, morte celular e IRA.^(17-18,22) A resposta inflamatória, maior fator na patogênese da lesão de I/R, é mediada por dois braços do sistema imune: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A primeira é precoce e genérica, não é antígeno específico e envolve neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e natural “killers”. A resposta adaptativa é tardia, responsiva a antígenos específicos e envolve apresentação de antígenos, maturação de células dendríticas, proliferação de linfócitos T CD4 e CD8 e interação linfócitos T e B.^(13,22-23) O rim pós-isquêmico é tanto um alvo do sistema imune, quanto um sítio de inflamação local.⁽²³⁾

1.3.1. Ativação endotelial

Um dos eventos mais precoces na lesão de I/R é a ativação do endotélio vascular.⁽²⁴⁻²⁵⁾ Esta inflamação começa durante a agressão isquêmica e é acelerada pela reperfusão com a ativação do endotélio, promovendo em uma hora, aumento da expressão de múltiplas moléculas de adesão na superfície celular, tais como molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e P-selectina,^(21-23,26-27) facilitando a interação da célula endotelial com os leucócitos e levando a liberação de citocinas. Este fenômeno causa a perda de células endoteliais da arteríola aferente e o rompimento da barreira endotelial, com consequente aumento da permeabilidade vascular, facilitando o extravasamento de

leucócitos para o tecido renal e a obstrução mecânica dos capilares sanguíneos.^(23,26,28) Este fenômeno é chamado “backleak” ou vazamento e é caracterizado por diminuição do fluxo sanguíneo microvascular, diminuição da perfusão renal e hipóxia renal, que é mais expressiva na medula renal, piorando ainda mais o dano tubular causado pela agressão isquêmica inicial.^(25,29)

1.3.2. Ativação tubular

A hipóxia, secundária à lesão de I/R, leva ao acúmulo do cálcio intracelular, a liberação de radicais livres, a ativação de proteases e a desorganização da actina do citoesqueleto – responsável pelo ancoramento das bombas Na-K-ATPase na membrana basolateral. Além disso, há perda da integridade dos complexos juncionais -“junções tight”- nas bordas ápico-laterais, mudança na localização das moléculas de adesão e na polaridade das proteínas de membrana (Crry) – que normalmente inibem a deposição do complemento na membrana basolateral. Este processo culmina com a deposição de C3 no epitélio tubular e com ativação da via alternativa do sistema complemento, aumentando o vazamento do filtrado glomerular (fenômeno backleak) para o interstício renal e o reposicionamento da Na-K-ATPase, da posição basolateral para a membrana plasmática apical.^(17,29-30)

Além disso, o epitélio tubular adquire papel pró-inflamatório, produzindo o fator de transcrição – IRF-1 (fator regulatório de interferon-1),⁽³¹⁾ Rho-kinase e KIM-1 (“kidney injury molecule”),⁽³²⁻³³⁾ e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β) e quimiotáticas.⁽²⁸⁾ Na fase de melhora da IRA, a depuração das células apoptóticas é realizada não só pelos macrófagos como também pelas células epiteliais.

Essas adquirem a propriedade de fagocitose por meio do reconhecimento de epítopes de células apoptóticas pelas proteínas de superfície KIM-1.⁽³²⁾

1.3.3. Células inflamatórias

1.3.3.1. Neutrófilo

É importante mediador da imunidade inata. Adere ao endotélio, bloqueia a microvasculatura e libera grânulos com proteases e outras enzimas, gerando radicais livres e levando a destruição de células próprias no tecido inflamado.⁽²²⁻²³⁾ Facio et al⁽³⁴⁾ demonstraram recrutamento tecidual de neutrófilos 48 horas após reperfusão, que foi mais proeminente na medula externa renal e foi modulado pela infusão de anexina -1 exógena.

1.3.3.2. Macrófago

Experimentos com modelos animais, que usam a depleção e repleção de macrófagos, demonstraram o seu envolvimento na patogênese da lesão de I/R.⁽³⁵⁾

Os macrófagos infiltram os rins logo após os neutrófilos, fazendo parte da primeira onda inflamatória pós-reperfusão. Realizam fagocitose, induzem apoptose, recrutam neutrófilos e produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-6, caspases e TNF- α .⁽²²⁻²³⁾

Os macrófagos são considerados “células diretoras”, atraindo a migração de outros macrófagos e estimulando a formação e multiplicação de fibroblastos. Além disso, são responsáveis pela eliminação de células indesejáveis, que é processo crucial para a eliminação do tecido destruído e remodelação tecidual.⁽³⁶⁾

1.3.3.3. Células dendríticas

Sua principal função é a indução da resposta adaptativa, sendo importante ligação entre a imunidade inata e adaptativa.

A célula natural “*killer*” ativa induz a maturação das células dendríticas. Essa forma madura é caracterizada por alta expressão de MHC (complexo maior de histocompatibilidade) classe II e de moléculas coestimulatórias, e por baixa capacidade fagocítica.⁽²²⁾

Além de ser especialista na ativação das células T, a célula dendrítica é também responsável pela liberação de fatores pró-inflamatórios, tais como TNF, IL-6, IL-12, MCP-1 e RANTES.⁽³⁷⁾

1.3.3.4. Linfócito

Os linfócitos são os mediadores mais importantes da fase adaptativa. Diante da apresentação do antígeno (Ag) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), na presença de coestimulação suficiente, ocorre ativação e expansão de células T com receptores específicos para o Ag apresentado. Os linfócitos B não requerem apresentação de Ag. Eles reconhecem Ag solúveis, os engolfam e processam, para apresentá-los com receptores específicos aos linfócitos T. Além disso, os linfócitos são produtores de interferon-gama (INF- γ), que recruta neutrófilos e macrófagos para a área danificada.⁽²²⁾ Vários estudos recentes enfatizam a sua importância na lesão de I/R.⁽³⁸⁾

1.3.4. Citocinas e quimiocinas

A tabela 1 lista as citocinas, quimiocinas, células inflamatórias e outras cascatas envolvidas na resposta inflamatória, incluindo citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6, IL-1 β e TGF- β e citocinas quimiotáticas como a IL-8 e a proteína MPC-1.¹³ O aumento da expressão da síntese de óxido nítrico induzível (iNOS) e da ciclooxigenase (COX-2), a formação de peroxinitrito e a ativação da enzima nuclear poli (ADP-ribose), polimerase (PARP) estão também associadas à lesão de isquemia/reperfusão renal.⁽¹⁹⁾

Tabela 1. Relação de citocinas, quimiocinas e células envolvidas na resposta inflamatória desencadeada pela lesão de isquemia e reperfusão.

Caspases	Citocinas	Quimiocinas	
Caspase -1	INF- γ	CXCL1 (KC/IL-8)	
Alpha MSH	TGF- β	CX3CL1 (fractalcina)	
Moléculas de adesão	TNF- α	CCR1 ligantes MIP-1 α e RANTES	
ICAM-1	IL-6	MCP-1	Linfócitos
P-seletin	IL-10	MIP-2	CD4
E-selectina	IL-18		CD8
CD147	TLRs	Neutrófilos	Células B
Complemento	TRL-2	Macrófagos	Tregs
Via alternativa	TRL-4	Células dendríticas	Células NK
C3A	TRL-9		

É muito importante a compreensão de que a inflamação é componente central na fisiopatologia da lesão renal de I/R e que ocorre complexa conversação (“cross-talk”) entre células endoteliais, inflamatórias e o epitélio lesado, gerando e respondendo às citocinas e quimiocinas (Figura 3). O melhor entendimento destes mecanismos de lesão permitirá identificar terapias promissoras no tratamento da IRA.

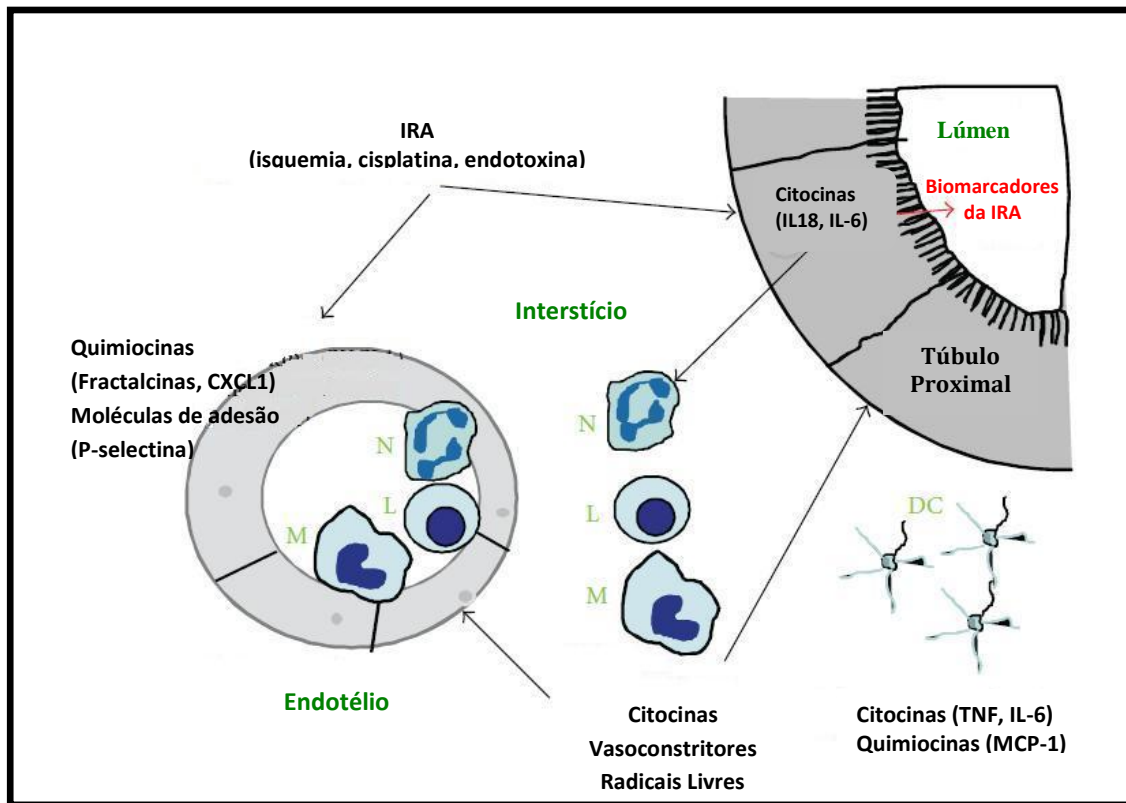


Figura 3. Esquemática do “cross-talk” entre as células envolvidas na resposta à lesão de isquemia e reperfusão. (N=neutrófilo, L=linfócitos, M=monócitos, DC=células dendríticas). Adaptado de Akcay 2009.

1.3.4.1. Citocinas

A caspase 1 ativa a IL-18 e a IL-1 β . A IL-18 é produzida por linfócitos, neutrófilos, macrófagos e pelas células tubulares. A sua ativação estimula a produção de citocinas e quimiocinas, a ativação de células T “helper” e a proliferação de linfócitos. Já a IL-6 estimula células alvo por meio da forma solúvel de seu receptor e promove trans-sinalização e ativação da STAT3 em células tubulares. A IL-10 inibe a cadeia citotóxica e inflamatória, a ativação de genes que causam acionamento e adesão de neutrófilos.⁽²⁸⁾

1.3.4.2. Quimiocinas

As quimiocinas são um subgrupo de “citocinas-like”, divididas em quatro subfamílias: CXC, CC, C e CX3C, classificadas de acordo com o número de espaços e resíduos de cistina na sua sequência. Apresentam importante papel no recrutamento de leucócitos, na inflamação e na regulação da resposta imune T “helper” 1 e 2. Sua produção é induzida por citocinas, NFκ-B, complemento ativado, radicais livres e receptores “Toll-Like” (TLRs).⁽³⁹⁾

A CX3CL1, também chamada de fractalcina é expressa em endotélio lesado, induz a migração e adesão de leucócitos e facilita a lesão celular induzida por monócitos. É potente quimioatraente e molécula de adesão para macrófagos que carregam seu receptor (CX3CR1).^(22,40)

A CXCL1, ou IL-8, é um quimioatraente de neutrófilos e linfócitos para o sítio de inflamação e sua inibição protege contra a IRA isquêmica.⁽⁴¹⁾

1.4. Metilprednisolona

A Metilprednisolona (MP) é um glicocorticóide sintético, amplamente utilizado clínica e experimentalmente por seu potente efeito anti-inflamatório agudo. Apresenta também ação antioxidante direta, previne a peroxidação dos lípidos, radicais livres, e mantém o fluxo de Na⁺ e Ca⁺⁺, mantendo a estabilidade da membrana celular.⁽⁴²⁾ A MP reduz as citocinas anti-inflamatórias urinárias e pró-inflamatórias plasmáticas, sugerindo redução da atividade pró-inflamatória intra-renal. Esteróides aumentam a atividade do óxido nítrico endotelial, reduzindo a vasoconstrição vascular na isquemia miocárdica.⁽⁴³⁾

1.4.1. Efeitos da metilprednisolona na lesão de isquemia/reperfusão

Enc et al⁽⁴⁴⁾ demonstraram que altas doses de MP (25mg/kg) aplicadas uma hora antes de cirurgia de “bypass” cardiopulmonar em humanos reduzem a lesão de I/R, sugerindo efeito de cardioproteção aguda da MP. Durante hepatectomia extensa, a lesão hepática secundária a I/R e alterações dos parâmetros homeostáticos são muito frequentes. Observou-se menor incidência de complicações, redução da lesão de I/R e manutenção da homeostase em pacientes que receberam 500mg de MP por via intravenosa no pré-operatório de hepatectomia, quando comparados ao grupo que não recebeu corticóide. Esta ação protetora foi atribuída à modulação da resposta inflamatória pela MP.⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾

O transplante de fígado (TxF) está associado à significativa lesão de I/R, que pode acometer outros órgãos, entre eles os rins. O uso de MP na dose de 10mg/kg na indução de pacientes que foram submetidos ao TxF protegeu contra a disfunção renal e hepática quando comparado ao grupo controle que recebeu solução salina.⁽⁴⁷⁾ Recentemente, Kotsch et al⁽⁴⁸⁾ demonstraram proteção do enxerto hepático com a administração de 250mg de MP em “bolus” imediatamente antes do TxF, seguido por infusão contínua, até a captação do órgão, na dose de 100mg/hora de MP. Estudos experimentais demonstraram atenuação da lesão de I/R quando a MP foi usada previamente a hepatectomia no rato doador⁽⁴⁹⁾ e antes do TxF.⁽⁵⁰⁾

O uso de esteróides durante a oclusão coronária experimental aguda impediu a progressão da isquemia miocárdica e pré-tratamento com MP protegeu o coração de ratos contra a lesão de I/R.^(42,51)

Baker et al⁽⁴³⁾ desenvolveram estudo em modelo de I/R renal em porcos, demonstrando proteção com pré-tratamento com MP (30mg/kg). Observou-se aumento

dos níveis de nitrato urinário, sugerindo aumento da síntese de óxido nítrico endotelial e redução dos níveis urinários de N-acetil- β -D-glucosaminidase, que indicam lesão tubular. Por outro lado, estudo prospectivo de Turner et al⁽⁵²⁾ não demonstrou proteção renal com o uso de 10mg/kg de MP previamente ao clampeamento da aorta infra-renal para cirurgia vascular, apesar de ter havido diminuição de citocinas inflamatórias.

A compreensão de que a inflamação é componente central na fisiopatologia da lesão renal de I/R com sua complexa conversação entre as células endoteliais, inflamatórias e epiteliais, permitirá identificar terapias promissoras no tratamento da IRA.

1.5. Objetivos

Objetivo Geral: Avaliar o efeito da infusão prévia de metilprednisolona na lesão de isquemia e reperfusão renal.

Objetivo Específico: Avaliar alguns dos possíveis mecanismos pelos quais a metilprednisolona altera a lesão de isquemia e reperfusão renal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

O experimento foi conduzido de acordo com as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, após serem aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP – Processo nº 5656/2009 (Anexo A).

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos adultos, com peso entre 230 e 300 gramas. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Foram mantidos em gaiolas coletivas antes do procedimento cirúrgico, quando foram alocados em gaiolas individuais. Em ambas as situações tiveram livre acesso a água e a dieta padronizada (normoproteica e normosódica).

2.2. Pré operatório

Após pesagem do animal foi realizada a indução anestésica com xilazina 2g/100mL, associada a cloridrato de ketamina 50mg/mL, por injeção intraperitoneal na dose de 0,1mL a cada 100g de peso. Em seguida, os animais foram submetidos à tricotomia da região cervical e abdominal e posicionados em mesa cirúrgica aquecida (Braile-Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil), em decúbito dorsal horizontal. A

temperatura corporal dos ratos foi controlada com o auxílio de um medidor de temperatura retal em $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3. Técnica operatória (primeiro procedimento cirúrgico)

Inicialmente os animais foram submetidos a uma pequena incisão na região cervical anterior, com dissecção da tela subcutânea, identificação, isolamento e cateterização da veia jugular direita com cateter (PE50), para infusão por via intravenosa de 30mg/kg de metilprednisolona (grupo MP-I/R) ou de solução de cloreto de sódio (SF) a 0,9% (grupo Sham e Veic-M/P), 60 minutos antes da obstrução mecânica da artéria renal esquerda.

Após 60 minutos foi realizada dissecção abdominal mediana (xifo-pubiana) e realizada nefrectomia direita, em bloco. Neste momento, a artéria renal esquerda foi isolada e obstruída por 30 minutos (clamp vascular homeostático), provocando isquemia quente renal.

Após liberação do clamp (reperfusão) renal, a restauração de perfusão renal adequada foi constatada por método visual e o animal foi imediatamente submetido à sutura da incisão abdominal, feita em duas camadas, muscular e pele com fio de Vicryl® 4.0.

O grupo Sham foi submetido à canulação da veia jugular, infusão intravenosa de SF a 0,9%, abertura da cavidade abdominal e nefrectomia direita, porém sem clampeamento da artéria renal. O tempo cirúrgico foi igual ao dos grupos submetidos ao clampeamento da artéria renal.

Os ratos foram mantidos na recuperação pós-operatória, com dieta padrão e água *ad libitum*.

2.4. Delineamento do estudo

Os 24 ratos foram divididos em três grupos:

- **GRUPO I**

Controle (Sham):

- Oito ratos com nefrectomia direita foram submetidos à cirurgia Sham 60 minutos após a infusão de 1mL de SF a 0,9% por via intravenosa.

- **GRUPO II**

Veículo com isquemia /reperfusão (Veic-I/R):

- Oito ratos com nefrectomia direita foram submetidos a 30 minutos de isquemia renal esquerda 60 minutos após a infusão de 1mL de SF a 0,9% por via intravenosa.

- **GRUPO III**

Metilprednisolona com isquemia (MP-I/R):

- Oito ratos com nefrectomia direita foram submetidos a 30 minutos de isquemia renal esquerda 60 minutos após a infusão intravenosa de metilprednisolona na dose de 30mg/kg peso⁴³ diluída em 1mL de SF a 0,9%.

Todos os animais foram mantidos com dieta padrão e água *ad libitum* por dois dias quando então foram medidas a fração de excreção de sódio (FENa) e a filtração glomerular por meio da depuração da inulina. Após esse procedimento foi realizada perfusão renal com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenamento do tecido renal para posterior estudo de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e

linfócitos) e exame histológico. Os animais sofreram eutanásia com dose letal de tiopental por VI ao final de cada experimento (Figura 4).

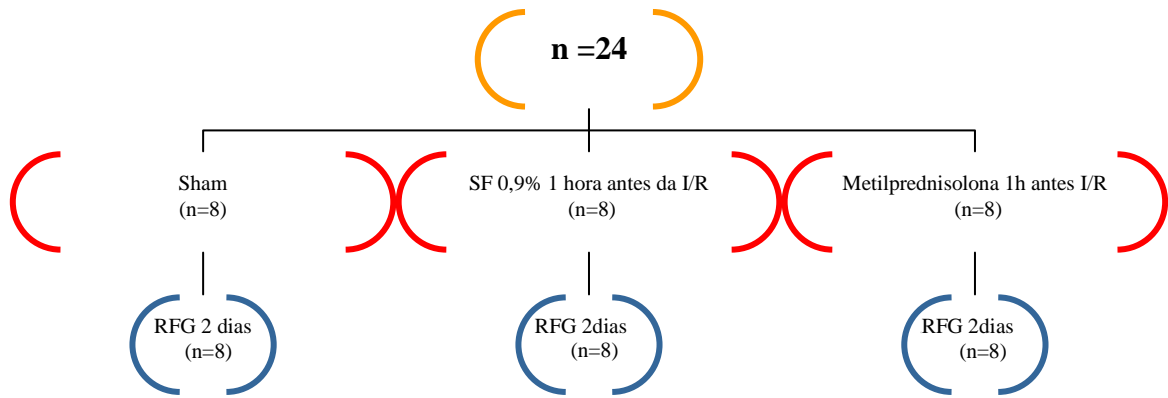


Figura 4. Delineamento do estudo.

2.5. Estudo da fração de excreção de sódio e da osmolalidade urinária

Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais (Nalgene, Nalge Company, Rochester, NY, EUA) por 24 horas antes de completarem o período de dois dias do primeiro procedimento cirúrgico. A diurese de 24 horas foi coletada antes do experimento para dosagem de sódio por meio do analisador de eletrólitos (Modelo 9180 – Eletrocute Analyserv – AVL, EUA), determinação da osmolalidade urinária por meio do ponto de congelamento (Modelo Osmette A – Automatic Osmometer – Precision Systemas, INC, EUA), avaliação de volume urinário, e mensuração da creatinina urinária (método de Jaffé – espectrofotômetro – BTS 310 photometer Bio Systems, Barcelona, Espanha).

Após as dosagens urinárias e plasmáticas, foi calculada a fração de excreção de sódio (FENa). Para este cálculo os seguintes parâmetros foram usados: sódio plasmático (Na_p ; mEq/L) e urinário (Na_u ; mEq/L) e creatinina plasmática (Cr_p ; mg/dL) e urinária (Cr_u ; mg/dL). A FENa foi calculada pela fórmula usual:

$$FENa (\%) = [Na_u \times Cr_p \times 100] \div [Na_p \times Cr_u]$$

2.6. Estudo da função renal (segundo procedimento cirúrgico)

Após a coleta da diurese de 24 horas, o animal foi anestesiado com tionembutal 50mg/kg (0,1mL a cada 100g de peso) por via intraperitoneal. Foi então colocado em decúbito dorsal em mesa aquecida (Braile-Biomédica, São José do Rio Preto, Brasil) e mantido em temperatura controlada com o auxílio de um medidor de temperatura retal em $36,5^\circ C \pm 1^\circ C$.

A. Traqueostomia

Foi realizada a dissecação dos músculos cervicais, com identificação e isolamento da traquéia e sua canulação, para garantir a livre respiração com tubo PE260.

B. Acesso vascular e cistostomia

Após traqueostomia, foi realizada a cateterização da veia jugular esquerda, utilizada para infusão de soluções e a cateterização da artéria carótida direita para a medida contínua da pressão arterial e coleta de amostras de sangue. Em seguida, foi realizada incisão abdominal mediana, identificação e isolamento vesical para realização de cistostomia com cateter PE-160. A uretra permaneceu ligada com um clamp hemostático para evitar perda urinária.

C. Depuração de inulina

Os animais foram submetidos a uma dose inicial de 1mL de solução de inulina (Sigma, EUA), obtida pela diluição de 0,3mg de inulina em 12mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF a 0,9%), aplicada por via intravenosa. A próxima etapa foi a expansão com 5mL de SF a 0,9% por via endovenosa para repor as perdas de volume ocorridas durante a cirurgia, seguida pela infusão contínua da solução de inulina na velocidade de 0,06mL/min (bomba de infusão, Harvard, EUA). Após 50 minutos de estabilização, iniciaram-se as coletas do experimento. As urinas foram coletadas em tubos previamente pesados e identificados, durante três períodos consecutivos de 20 minutos cada. Coletou-se 0,3mL de sangue em tubos com heparina, na metade de cada período da coleta de urina. O volume de sangue coletado era imediatamente repostado com o mesmo volume de SF a 0,9%. O plasma e a urina foram usados para dosagem de inulina pelo método da antrona (Espectrofotômetro BTS310-Biosystems, Barcelona, Espanha).

O volume urinário foi determinado pela diferença de peso dos tubos de coleta de urina (peso ao final do período de coleta menos peso inicial do tubo). Os dados da depuração da inulina foram calculados em mL/min/100g, representando a média dos três períodos de coleta.

D. Aferição da pressão arterial

A pressão arterial média foi aferida durante todo o procedimento a cada 10 minutos. Essa mensuração foi feita por meio de um transdutor de pressão (Stoelting Co, Wood Dale, Illinois, EUA) acoplado a um amplificador (Blood Pressure Display Unit, Stoelting Co. Wood Dale, Illinois, EUA).

2.7. Análise Imuno-histoquímica

A. Perfusão renal e armazenamento

Ao término da depuração de inulina, a aorta e veia cava inferior foram clampeadas acima do pedículo renal. Em seguida, a aorta abdominal foi ligada distalmente ao pedículo renal e canulada com P-50 para perfusão renal *in situ* com PBS (velocidade de 5 mL/min, por 12 minutos).

Após remoção da cápsula renal, dois cortes transversais do rim (4-5mm) foram mergulhados em metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido glacial, preparado imediatamente antes do uso) para fixação por 24 horas, e então mantidos em álcool à 70% para posterior inclusão em parafina.

Outro corte transversal do rim (3-4mm) foi mergulhado em paraformaldeído a 4% e deixado na geladeira por 4-5 horas; em seguida, mergulhado em solução de sacarose a 30% feita em PBS (NaCl 1,15M e tampão fosfato 0,01M). Este corte congelado foi armazenado para posterior quantificação de neutrófilos por análise imuno-histoquímica.

B. Imuno-histoquímica

O procedimento imuno-histoquímico foi realizado conforme técnica descrita anteriormente.⁽⁵³⁾ As amostras foram submetidas à reação imuno-histoquímica para macrófagos (ED-1), neutrófilos, linfócitos e NFκ-B.

Cortes de rins incluídos em parafina foram colocados em três banhos consecutivos de xilol, para eliminação da parafina e em seguida colocados em três banhos de álcool em concentrações decrescentes para a hidratação do corte. As lâminas foram então incubadas por 10 minutos em solução contendo 2mL de azedar sódica 10% e 2mL de água oxigenada 30%, diluídas em 200mL de água destilada, para bloqueio da atividade da per oxidase endógena. Logo após foram lavadas em banho de PBS, pH 7,4 por 5 minutos e os cortes incubados com o anticorpo primário.

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-ED1 (reage com antígenos presentes no citoplasma de monócitos e macrófagos) (1/1000, monoclonal - Serotec, UK), anti-granulócitos (utilizado para a determinação de neutrófilos) (1/20, monoclonal - Serotec, UK), anti-linfócitos (1/200, monoclonal - Harlan Sera-Lab, EUA) e anti-NFκ-B p65 (1/200, policlonal - Santa Cruz, EUA).

O período de incubação do anticorpo primário foi de 60 minutos em temperatura ambiente para ED1 e granulócitos, e “overnight” para os demais anticorpos.

Após a incubação e lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado monoclonal produzido em camundongo (1/200) ou policlonal produzido em coelho (1/400) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), diluídos em solução de PBS + BSA (albumina de soro bovino) 1%, por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação e lavagem em PBS, os cortes foram incubados em solução contendo Avidina-Biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS + BSA 1% por 30 minutos em cuba úmida à temperatura ambiente. A cor foi desenvolvida pela adição de solução de DAB (3,3-diaminobenzidina, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e cloreto de níquel na presença de H₂O₂. A contracoloração foi feita com “methylgreen” ou hematoxilina, de acordo com o anticorpo utilizado.

C. Avaliação dos resultados de imuno-histoquímica

Para avaliação de células positivas para ED1 (macrófagos/monócitos), granulócitos (neutrófilos) e linfócitos, foram contadas, em microscópio óptico, o número de células imunomarcadas por campo (aumento de 40X, área do campo: 0,245 mm²), em 30 campos consecutivos nos glomérulos e no interstício na região cortical, e em 20 campos consecutivos na região da medula externa renal. O número total obtido na contagem foi dividido pelo número de campos contados e foi determinado o número médio de células/campo analisado/animal.⁽⁵⁴⁾ Esse procedimento foi realizado por um único avaliador.

Para a avaliação da imunomarcção para NFκ-B foi considerada a área de córtex e medula externa renal, utilizando o modo semiquantitativo, por um único avaliador. No aumento de 40X (0,245 mm²), atribuíram escores de 0 a 4, que refletiram a extensão da

área marcada (não por sua intensidade), dependendo da porcentagem de campos afetados (coloração positiva), sendo:⁽⁵³⁻⁵⁴⁾

0 = coloração ausente ou extensão menor que 5% do campo com marcação;

1 = 5-25%;

2 = 25-50%;

3 = 50-75%;

4 = 75-100%.

2.8. Análise Histológica

Os cortes de 4µm de espessura dos rins dos animais de todos os grupos foram corados com hematoxilina-eosina e tricômio de Mason para análise do comprometimento do túbulo intersticial.

As alterações encontradas no córtex e na medula externa renal foram analisadas de forma semiquantitativa (+ a 3+)⁽⁵⁵⁾ e refletem a extensão da área com alterações. O critério para as análises semiquantitativas foram usadas para os seguintes indicadores histopatológicos de comprometimento do túbulo intersticial: dilatação da luz tubular, alterações degenerativas epiteliais agudas (ADEA), edema intersticial e necrose das células tubulares (NTA). Adicionalmente, foram avaliados espessamento dos vasos e retração de glomérulos.

2.9. Análise Estatística

Todos os resultados são apresentados como médias \pm desvio padrão. Para a análise estatística sobre diferença de médias entre grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para cada variável com a aplicação da correção de Bonferroni.

Para a análise da variável peso antes e depois do procedimento, utilizou-se o Teste t de Student bi-caudal para amostra pareada. O nível de significância definido para esse teste foi de $\alpha = 0,05$, sendo considerado estatisticamente significativo p-valor menor do que 0,05.

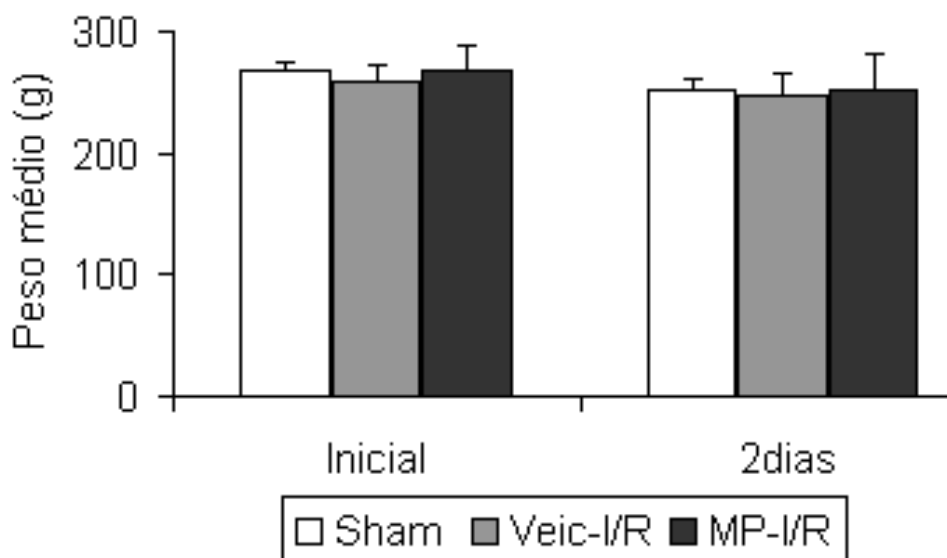
Para as análises estatísticas foi utilizado o software estatístico livre R, versão 2.11.1 e disponível em <http://cran.r-project.org/>.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Peso

Não houve diferença do peso entre os grupos estudados, tanto do peso antes do primeiro procedimento cirúrgico, denominado peso inicial (Sham: 267 ± 7 g; Veic-I/R: 259 ± 14 g; MP-I/R: 268 ± 21 g), quanto do peso final, ou seja, dois dias após a I/R (Sham: 251 ± 10 g; Veic-I/R: 247 ± 19 g; MP-I/R: 251 ± 30 g). Quando avaliado de forma pareada (isto é, pré vs. pós no mesmo animal), o peso final (dois dias após primeiro procedimento) foi significativamente menor do que o peso inicial (Figura 5).



Sham Inicial vs. Sham 2 dias *p < 0,001

Veic-I/R Inicial vs. Veic -I/R 2 dias **p < 0,01

MP-I/R Inicial vs. MP-I/R 2 dias ***p < 0,05

Figura 5. Histograma das médias de pesos dos ratos

3.2. Volume urinário de 24 horas

Apesar de se observar diminuição no volume urinário de 24 horas do grupo Veic-I/R em comparação aos demais grupos, essa diferença não foi estatisticamente significante: Sham ($14,9 \pm 5,1$ mL), Veic-I/R ($10,9 \pm 4,2$ mL) e MP-I/R ($14,3 \pm 6,4$ mL) (Figura 6).

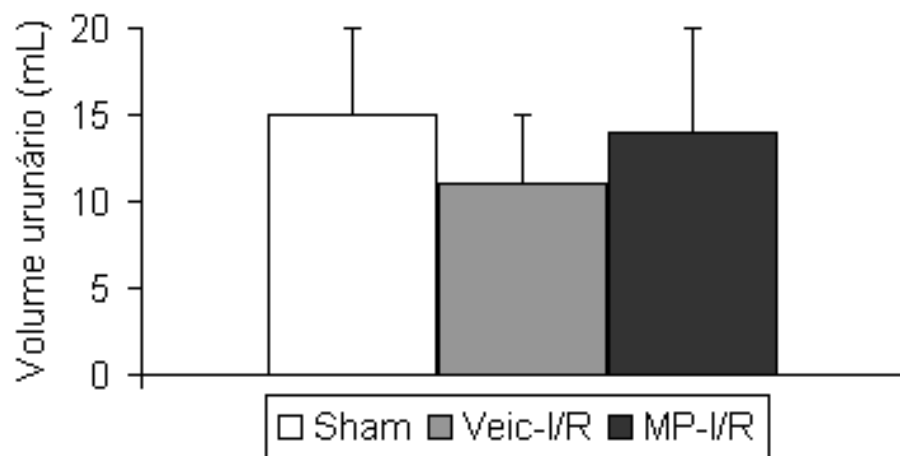


Figura 6. Histograma das médias dos volumes urinários dos ratos.

3.3. Pressão arterial

A pressão arterial média avaliada a cada 10 minutos durante todo o segundo procedimento cirúrgico foi semelhante nos três grupos: Sham: 114 ± 11 mmHg; Veic-I/R: 113 ± 14 mmHg e MP-I/R: 112 ± 13 mmHg, como mostrado na figura 7.

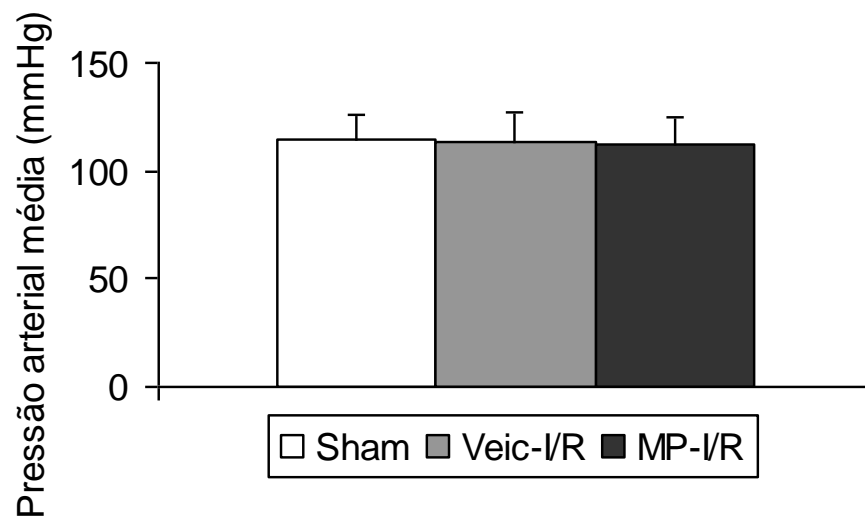
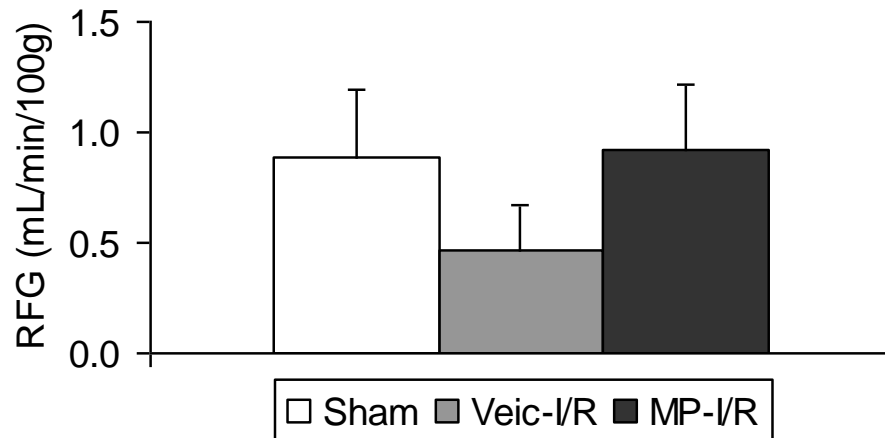


Figura 7. Histograma das médias da pressão arterial média dos ratos.

3.4. Filtração glomerular

Dois dias após o primeiro procedimento cirúrgico, a filtração glomerular no grupo Veic-I/R foi significativamente menor ($0,47 \pm 0,24$ mL/min/100g) quando comparada aos grupos Sham ($0,90 \pm 0,27$ mL/min/100g) e MP-I/R ($0,92 \pm 0,30$ mL/min/100g). Não houve diferenças significativas entre os grupos Sham e MP-I/R (Figura 8).

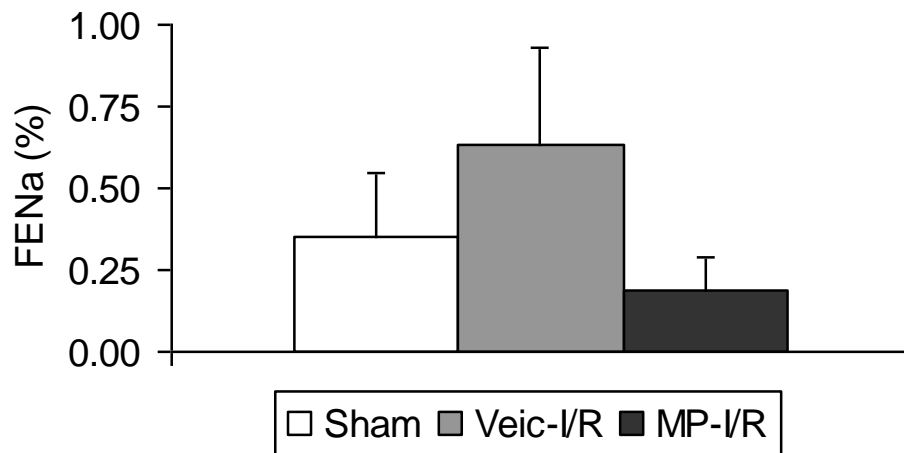


Sham	vs. Veic -I/R	$p < 0,05$
Sham	vs. MP-I/R	NS
Veic-I/R	vs. MP-I/R	$p < 0,05$

Figura 8. Histograma representando as médias de taxa de filtração glomerular (Depuração de inulina – mL/min/100g).

3.5. Fração de excreção de sódio

A fração de excreção de sódio (FENa) do grupo Veic-I/R ($0,62 \pm 0,29$ %) foi significativamente maior do que a do grupo MP-I/R ($0,19 \pm 0,12$ %, $p < 0,01$) e similar a do grupo Sham ($0,35 \pm 0,21$ %, NS) como pode ser observado na figura 9.



Sham vs. Veic -I/R NS

Sham vs. MP-I/R NS

Veic-I/R vs. MP-I/R $p < 0,01$

Figura 9. Histograma representando a fração de excreção de sódio (%).

3.6. Osmolalidade Urinária

A osmolalidade urinária foi semelhante nos três grupos estudados: Sham 1198 ± 235 mOsm/kg, Veic-I/R 1179 ± 304 mOsm/kg e MP-I/R 1151 ± 313 mOsm/kg (Figura 10).

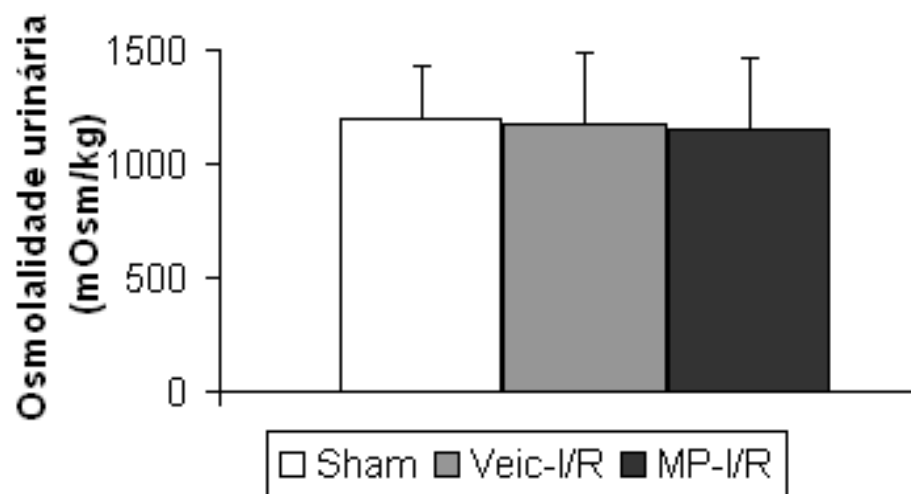


Figura 10. Histograma representando a osmolalidade urinária.

3.7. Histopatologia

A tabela 2 demonstra os achados histológicos, em escore, dos três grupos experimentais.

No grupo Veic-I/R foram observados moderada dilatação tubular ($2,00 \pm 0,76$) e alterações degenerativas epiteliais agudas-ADEA ($1,63 \pm 0,51$) em 100% dos animais, associada à necrose tubular aguda focal - NTA ($0,38 \pm 0,50$ em 37,5% dos animais), edema intersticial ($0,63 \pm 0,52$ em 62,5% dos animais) e moderada retração de glomérulos em 37,5% dos animais e leve nos demais, com média de escore de $1,38 \pm 0,52$ (Figura 12 - B e E). Não foi observada alteração vascular nesse grupo.

No grupo MP-I/R foram observadas leve dilatação tubular ($1,25 \pm 0,89$ em 75% dos animais), leve ADEA ($1,50 \pm 0,54$ em 100% dos animais), edema intersticial ($0,75 \pm 0,46$ em 75% dos animais) e leve retração de glomérulos ($1,00 \pm 0,00$ em 100% dos animais). Nenhum animal desse grupo mostrava NTA. Um rato apresentou um pequeno foco de fibrose intersticial e três apresentaram leve espessamento da parede vascular (Figura 12 - C e F).

O grupo Sham apresentou leve dilatação tubular ($1,40 \pm 0,55$) e retração glomerular ($1,20 \pm 0,45$) em 100% dos animais, associada à leve ADEA ($0,80 \pm 0,84$, em 60% dos animais) e edema intersticial ($0,40 \pm 0,55$ em 20% dos animais). NTA e alterações vasculares não foram evidenciadas em nenhum animal desse grupo (Figura 12 - A e D).

Apesar de não se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos, as alterações tubulares (ADEA, NTA e dilatação tubular) foram mais intensas

no grupo Veic-I/R quando comparadas aos demais grupos. Além disso, essas alterações estão atenuadas no grupo MP-I/R (Figura 11).

Tabela 2. Histologia renal (escore) nos grupos Sham, Veic-I/R e MP-I/R.

		Grupos experimentais		
		Sham	Veic-I/R	MP-I/R
Túbulo	Dilatação tubular	1,40 ± 0,55	2,00 ± 0,76	1,25 ± 0,89
	ADEA	0,80 ± 0,84	1,63 ± 0,51	1,50 ± 0,54
	NTA	0	0,38 ± 0,52	0
Interstício	Edema intersticial	0,40 ± 0,55	0,63 ± 0,52	0,75 ± 0,46
Vasos	Espessamento vasos	0	0	0,50 ± 0,76
Glomérulos	Retração glomerular	1,20 ± 0,45	1,38 ± 0,52	1,00 ± 0,00

Valores=média ± DP. Sham - grupo controle; Veic-I/R - grupo isquemia; Veic-MP - grupo tratamento; ADEA - alterações degenerativas agudas; NTA - necrose tubular aguda. 0 -alteração não encontrada nesse grupo.

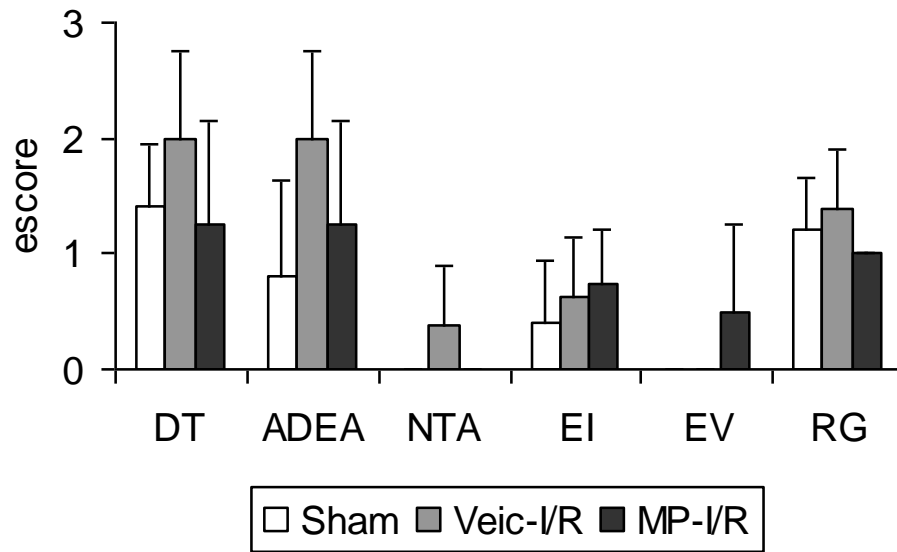


Figura 11. Histograma representando os escores das alterações histológicas. (DT - dilatação tubular; ADEA - alterações degenerativas agudas; NTA - necrose tubular aguda; EI - edema intersticial; EV - espessamento vascular; RG - retração glomerular).

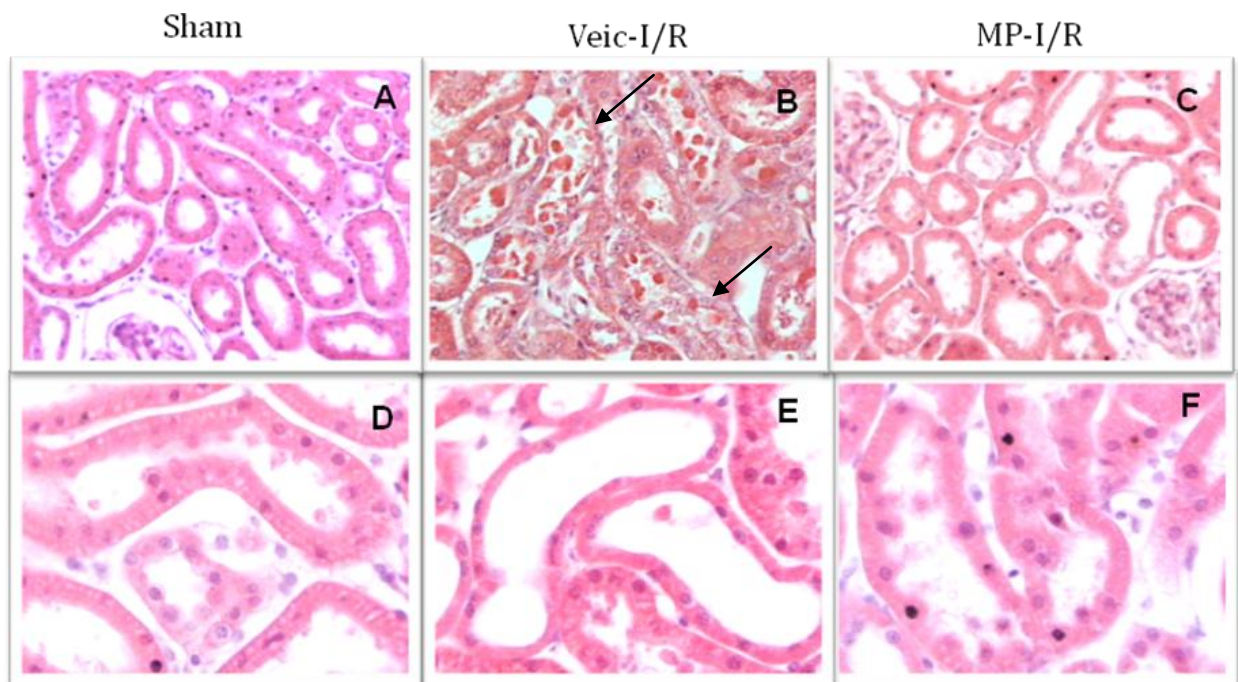


Figura 12. Fotomicrografias da medula renal ratos dos grupos Sham, Veic-I/R e MP-I/R, respectivamente em HE 200x (A,B,C) e em HE 400x (D,E,F). Necrose tubular aguda (NTA) focal - setas (B), moderada dilatação tubular e alterações degenerativas epiteliais agudas (ADEA) (E) no grupo Veic-I/R. Discreta ADEA e dilatação tubular no grupo MP-I/R (C, F). Ausência de NTA nos grupos Sham e MP-I/R (A,C).

3.8. Imuno-histoquímica

A mensuração quantitativa das células inflamatórias foi realizada em 30 campos consecutivos nos glomérulos e no interstício da região cortical, e em 20 campos consecutivos na região da medula externa renal.

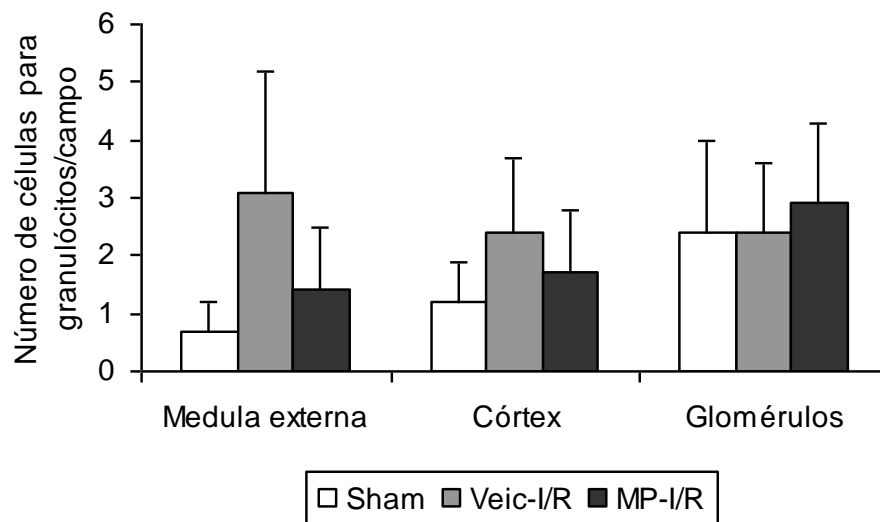
3.8.1. Neutrófilo

O grupo Veic-I/R apresentou maior infiltrado de neutrófilos medulares ($3,13 \pm 2,09$ células/campo) comparado ao grupo Sham ($0,74 \pm 0,51$ células/campo; $p < 0,01$). O grupo MP-I/R ($1,44 \pm 1,11$ células/campo) mostrou tendência à menor marcação comparada ao grupo Veic-I/R (Figura 17 - D, E e F).

Houve maior acúmulo de neutrófilos no interstício do córtex renal do grupo Veic-I/R ($2,38 \pm 1,26$ células/campo) comparados aos grupos Sham ($1,15 \pm 0,63$ células/campo, NS) e MP-I/R ($1,70 \pm 1,12$ células/campo, NS), no entanto, sem diferença estatisticamente significativa. O número de neutrófilos glomerulares foi similar nos três grupos (Tabela 3 e Figura 13).

Tabela 3. Análise quantitativa de células positivas para granulócitos na medula externa, interstício e córtex renal

	Células positivas para granulócitos/campo		
	Sham	Veic-I/R	MP-I/R
Medula externa	0,74 ± 0,51	3,13 ± 2,09*	1,44 ± 1,11
Córtex	1,15 ± 0,63	2,38 ± 1,26	1,70 ± 1,12
Glomérulos	2,37 ± 1,58	2,44 ± 1,20	2,92 ± 1,45



Sham	vs. Veic-I/R	*p < 0,01	NS	NS
Veic-I/R	vs. MP-I/R	NS	NS	NS
Sham	vs. MP-I/R	NS	NS	NS

Figura 13. Histograma da média de células positivas para neutrófilo na medula externa, glomérulos e interstício do córtex renal.

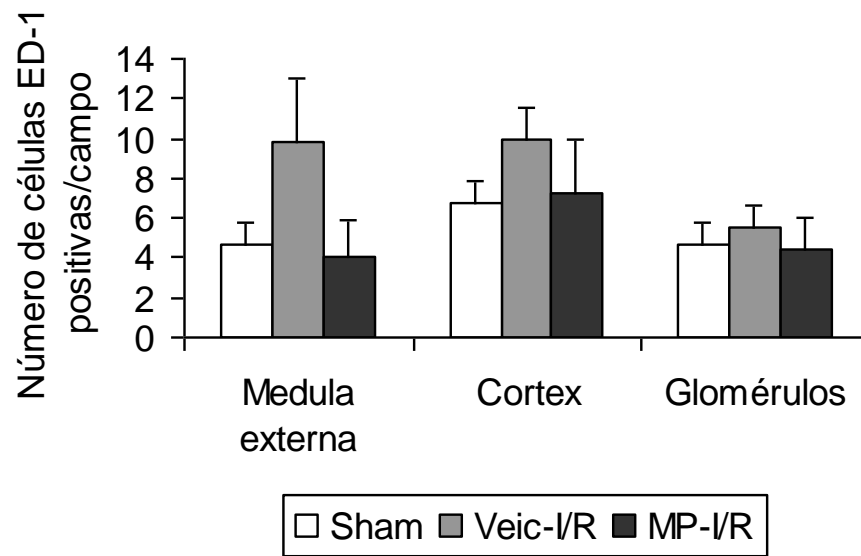
3.8.2. Macrófago

Ocorreu acúmulo estatisticamente significativo de macrófagos na medula externa renal no grupo Veic-I/R ($9,84 \pm 3,18$ ED-1⁺/campo) quando comparado aos grupos MP-I/R ($4,06 \pm 1,84$ ED-1⁺/campo; *p < 0,01) e Sham ($4,65 \pm 1,12$ ED-1⁺/campo; †p < 0,001) (Figura 17 - A, B e C).

Houve maior acúmulo de macrófagos no interstício do córtex renal e nos glomérulos no grupo Veic-I/R comparados aos demais grupos, porém estas diferenças não foram estatisticamente significantes (Tabela 4 e Figura 14).

Tabela 4. Análise quantitativa de células ED-1 positivas na medula externa, interstício e córtex renal

	Células ED-1 positivas/campo		
	Sham	Veic-I/R	MP-I/R
Medula externa	$4,65 \pm 1,12$	$9,84 \pm 3,18^{*\dagger}$	$4,06 \pm 1,84$
Córtex	$6,68 \pm 1,56$	$9,89 \pm 1,61$	$7,20 \pm 2,73$
Glomérulos	$4,66 \pm 1,06$	$5,45 \pm 1,08$	$4,39 \pm 1,65$



Sham	vs. Veic-I/R	* $p < 0,01$	NS	NS
Veic-I/R	vs. MP-I/R	† $p < 0,001$	NS	NS
Sham	vs. MP-I/R	NS	NS	NS

Figura 14. Histograma da média de células ED-1 positivas na medula externa, glomérulo e interstício do córtex renal.

3.8.3. Linfócito

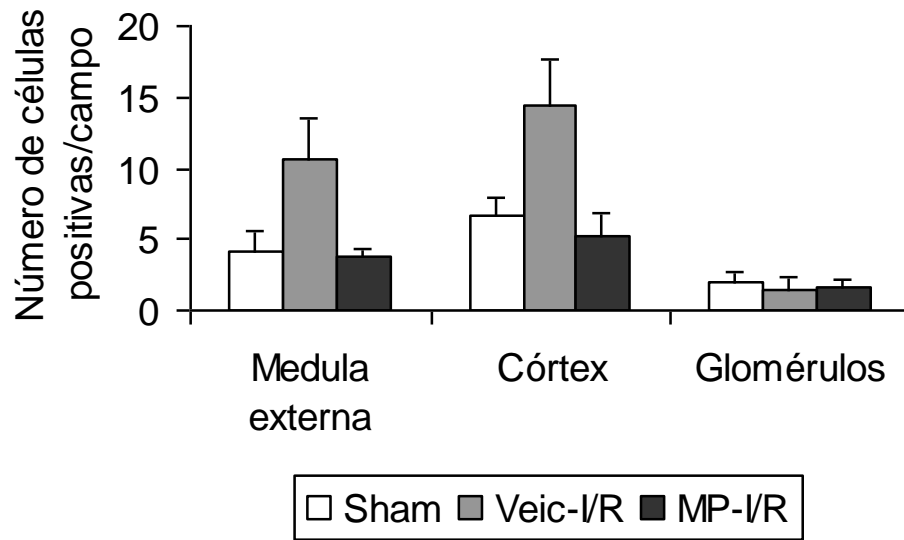
Observou-se aumento estatisticamente significativo de linfócitos na medula renal externa do grupo Veic-I/R ($10,58 \pm 3,04$ linfócitos/campo) quando comparado ao grupo Sham ($4,51 \pm 1,29$ linfócitos/campo; * $p < 0,001$), e ao grupo MP-I/R ($3,70 \pm 0,62$ linfócitos/campo, † $p < 0,0001$) (Figura 17 - G, H e I).

No córtex renal também houve aumento estatisticamente significativo de linfócitos no grupo Veic-I/R ($14,36 \pm 3,32$ linfócitos/campo) quando comparado ao grupo Sham ($6,75 \pm 1,18$ linfócitos/campo; * $p < 0,0001$), e grupo MP-I/R ($5,31 \pm 1,63$ linfócitos/campo, † $p < 0,0001$).

O número de linfócitos foi similar nos glomérulos dos três grupos analisados (Tabela 5 e Figura 15).

Tabela 5. Análise quantitativa de linfócitos na medula externa, glomérulos e interstício do córtex renal.

	Linfócitos/campo		
	Sham	Veic-I/R	MP-I/R
Medula externa	$4,51 \pm 1,29$	$10,58 \pm 3,04^*$	$3,70 \pm 0,62^\dagger$
Córtex	$6,75 \pm 1,18$	$14,36 \pm 3,32^*$	$5,31 \pm 1,63^\dagger$
Glomérulos	$2,06 \pm 0,69$	$1,53 \pm 0,81$	$1,55 \pm 0,55$



Sham	vs. Veic-I/R	*p < 0,001	*p < 0,0001	NS
Veic-I/R	vs. MP-I/R	†p < 0,0001	†p < 0,0001	NS
Sham	vs. MP-I/R	NS	NS	NS

Figura 15. Histograma da média de linfócitos na medula externa, interstício e glomérulos do córtex renal.

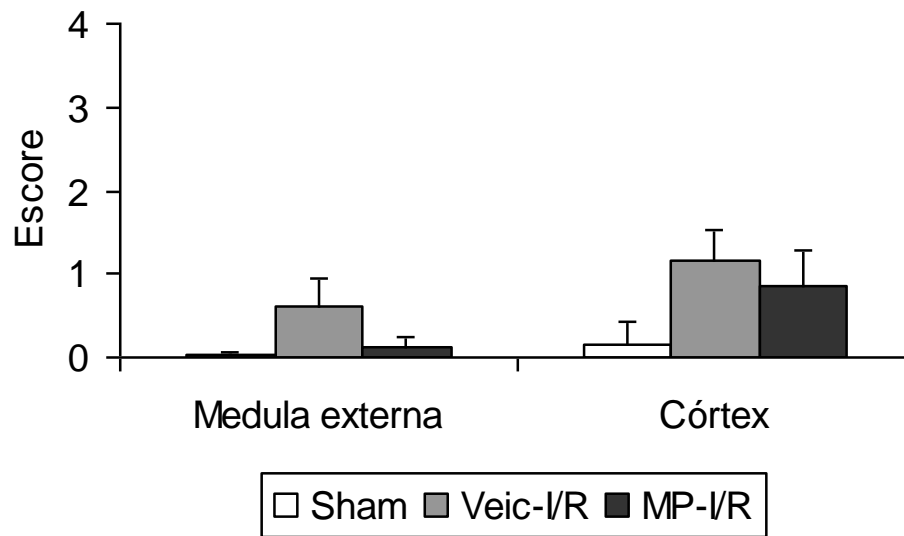
3.8.4. Fator nuclear Kappa – B (NFκ-B)

O escore de extensão da área da medula externa renal marcada para NFκ-B foi significativamente maior no grupo Veic-I/R ($0,61 \pm 0,33$) comparado à do grupo Sham ($0,03 \pm 0,03$; * $p < 0,001$) e do grupo MP-I/R ($0,12 \pm 0,11$, † $p < 0,001$) (Figura 17 - J,K e L).

No córtex renal observou-se aumento no escore do grupo Veic-I/R ($1,15 \pm 0,39$) quando comparado à do Sham ($0,14 \pm 0,28$, * $p < 0,001$) e do grupo MP-I/R ($0,84 \pm 0,45$, NS) (Tabela 6 e Figura 16).

Tabela 6. Análise da média de escores para NFκB na medula externa e córtex renal

	Escore para NFκB		
	Sham	Veic-I/R	MP-I/R
Medula externa	$0,03 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,33^*$	$0,12 \pm 0,11^\dagger$
Córtex	$0,14 \pm 0,28$	$1,15 \pm 0,39^*$	$0,84 \pm 0,45$



Sham	vs. Veic-I/R	*p < 0,001	*p < 0,001
Veic-I/R	vs. MP-I/R	†p < 0,001	NS
Sham	vs. MP-I/R	NS	NS

Figura 16. Histograma das médias dos escores para NFκB na medula externa, no córtex renal.

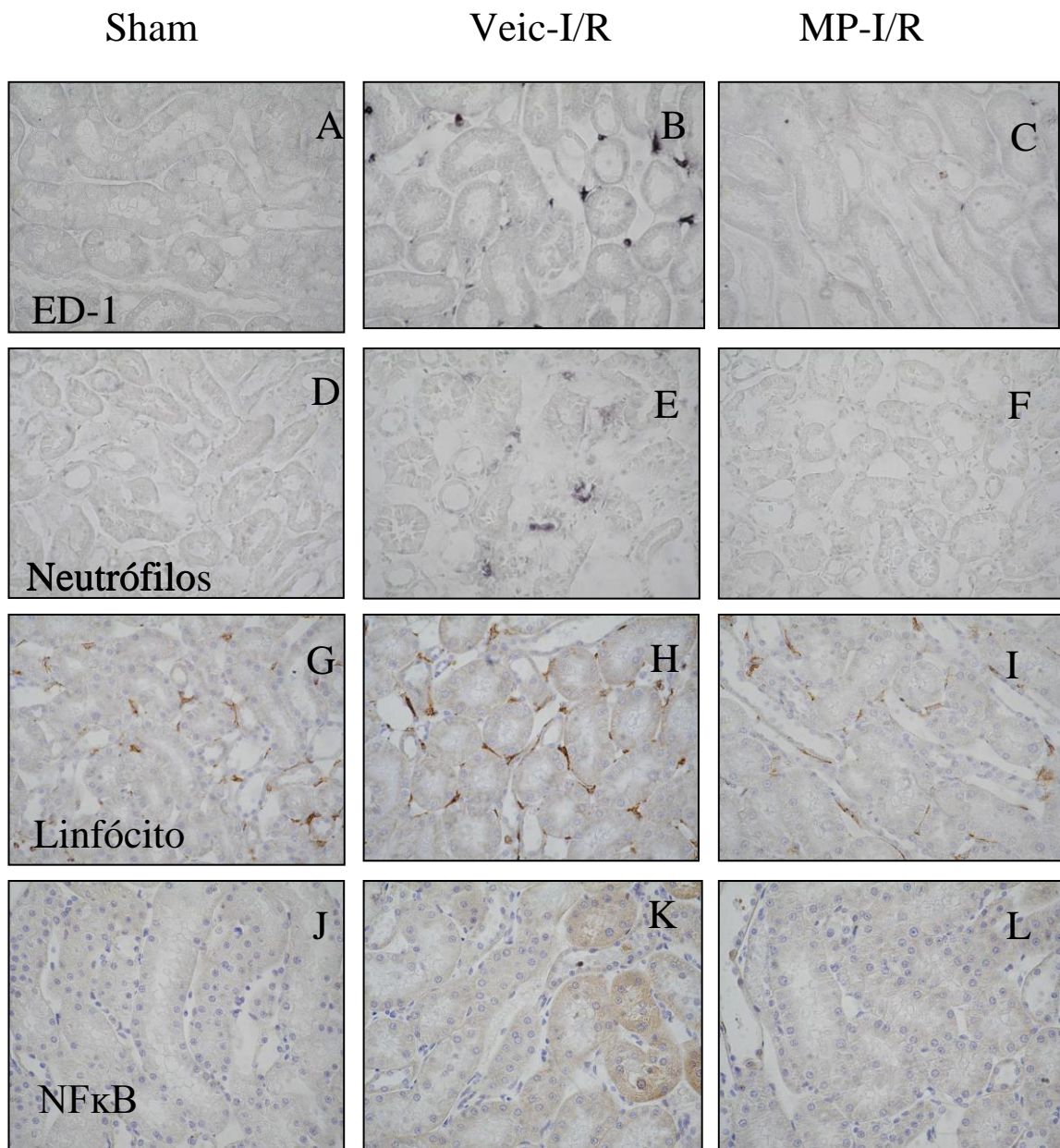


Figura 17. Preparação imunohistoquímica, dos grupos Sham, Veic-I/R e MP-I/R, com anticorpo anti-ED-1 (A,B,C), anti-granulócitos (D,E,F), anti-linfócitos (G,H,I) e anti-NFκ-B (J,K,L), na medula externa renal.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Isquemia isolada ou associada à nefrotoxicidade é atualmente a etiopatogenia mais frequente de IRA hospitalar.⁽¹⁰⁾ Apesar de terem ocorrido grandes avanços no tratamento de doentes graves ainda não existe um agente farmacológico eficaz na prevenção e tratamento da IRA isquêmica.⁽⁹⁾ Assim, o estudo de drogas com potencial papel protetor contra a lesão de I/R, como a metilprednisolona, tem grande relevância clínica.

O modelo animal escolhido foi o de isquemia por 30 minutos por oclusão completa da artéria renal (OAR) pois, apesar das suas limitações, é o que apresenta melhor potencialidade para transposição dos resultados na IRA isquêmica em seres humanos. Hipotensão prolongada e/ou grave no rato não mimetiza IRA humana, pois a OAR prolongada (60 minutos ou mais) provoca dano renal permanente e OAR acima de 30 minutos limita a recuperação metabólica e estrutural renal.^(17,20,34) De fato, Ko et al⁽⁵⁶⁾ demonstraram que OAR por 50 minutos causa fibrose intersticial e atrofia tubular renal após 4 e 8 semanas, respectivamente.

A OAR é um modelo de isquemia quente diferente do que ocorre no transplante renal, onde breve isquemia quente é seguida por isquemia fria prolongada. A isquemia quente, que é mais deletéria do que a isquemia fria, ocorre em situações clínicas como cirurgias de grande porte (cardíaca e aórtica), traumas, hipovolemia grave, queimaduras e choque séptico.⁽⁵⁷⁾ A diminuição significativa da filtração glomerular encontrada no grupo Veic-I/R atesta que o modelo de I/R utilizado foi apropriado para o propósito do estudo. Os dados do presente estudo são consistentes com os achados de Facio et al,⁽³⁴⁾

aonde o RFG foi avaliado 2 e 7 dias após 30 minutos de OAR em ratos. Como cuidado adicional o presente estudo foi precedido por estudo piloto (Apêndice) que confirmou diminuição no RFG dois dias após a lesão de I/R, com normalização do RFG em sete dias. Estes achados orientaram a escolha do tempo usado no presente estudo.

A depuração da inulina, parâmetro padrão ouro para a mensuração do RFG, demonstrou que o pré-tratamento com MP na dose de 30mg/kg VI, protegeu de forma importante os animais contra a lesão funcional causada pela I/R.

Houve diminuição do volume urinário e aumento significativo na FENa no grupo Veic-I/R comparada ao grupo Sham. Molitoris et al⁽²⁶⁾ demonstraram que na IRA ocorre reposicionamento da Na-K-ATPase da localização basolateral para a membrana plasmática apical, diminuindo a eficiência do transporte de sódio transcelular e aumentando a secreção de sódio na luz do túbulo distal, o que explicaria o aumento da FENa observado. Esta alteração da FENa estimularia a mácula densa, resultando em vasoconstrição da arteríola pré-glomerular e diminuindo o RFG.^(17,58) A preservação da FENa no grupo MP-I/R é um dado adicional importante demonstrando que a MP também conferiu proteção funcional tubular contra a lesão de I/R.

A maioria dos modelos animais de IRA demonstrou que o túbulo proximal, mais especificamente o segmento S3 na faixa externa da zona externa da medula renal, é a região mais vulnerável e sensível à lesão de I/R, já que esta área tem limitada capacidade para tolerar metabolismo anaeróbico.^(9,17) De forma consistente, no presente estudo, observou-se dano tubular moderado em 100% dos animais do grupo Veic-I/R, caracterizado por dilatação tubular e alterações degenerativas agudas, associada a focos de NTA, enquanto que os grupos Sham e MP-I/R não apresentaram NTA. Estes dados

sugerem que o pré-tratamento com MP atenuou de forma importante a lesão estrutural renal causada pela I/R.

A escolha da metilprednisolona como agente farmacológico de proteção, ocorreu em função de sua potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, de sua facilidade de uso e segurança, e da significativa experiência clínica positiva já acumulada em situações de lesão por I/R.⁽⁴⁸⁾ Há relatos da ação protetora dos esteróides na lesão de I/R desde 1975, porém sem tentativas de elucidação do modo de ação. Entre os possíveis mecanismos de proteção, encontram-se a supressão de radicais livres e proteases lisossomais, a diminuição na produção de citocinas e o efeito anti-apoptótico direto nas células do túbulo proximal renal humano.^(46,59)

Durante a década de 80 surgiram relatos isolados de proteção renal pela MP contra a isquemia quente, especulando-se que os mecanismos de proteção seriam sua ação anti-inflamatória e propriedades estabilizadora de membrana.^(60,61) Em 2001, Takahira et al⁽⁶²⁾ demonstram atenuação da infiltração de neutrófilos e da expressão ICAM-1 com o uso de dexametasona na lesão I/R renal, porém sem melhora da função renal, talvez pela gravidade da lesão I/R do modelo utilizado. Em 2009, surge o primeiro relato da propriedade citoprotetora direta, *in vitro e in vivo*, da dexametasona em células tubulares proximais renais.⁽⁵⁹⁾

A maioria dos efeitos protetores de longo prazo da MP são provavelmente mediada pela sua ação nos receptores de glicocorticóides intracelulares. A ativação desses receptores altera a ativação do NF- κ B, que é crítico para a expressão de várias citocinas anti-inflamatórias.⁽⁵⁰⁾ A duração da ação biológica da MP é de 36 horas e sua meia-vida sérica é de 2,8 horas,⁽⁶³⁾ o que embasou teoricamente a decisão do seu emprego 60 minutos antes da lesão de I/R no presente estudo. Outro possível

mecanismo de proteção da MP na lesão de I/R é a liberação de anexina 1, potente mediador anti-inflamatório endógeno, ativado pela liberação de corticóides.⁽³⁴⁾

A interrupção do fluxo sanguíneo, seja no modelo experimental ou nas situações clínicas de IRA isquêmica, leva à hipóxia tecidual e consequente isquemia. Quando ocorre a reperfusão do tecido isquêmico, ocorre a aceleração da resposta inflamatória que é desencadeada pela ativação do endotélio vascular. Há aumento da expressão de moléculas de adesão, facilitando a interação com os leucócitos circulantes e da permeabilidade vascular. Estas alterações se associam à lesão do epitélio dos túbulos proximais, causada pela desestruturação do citoesqueleto celular e consequente perda da integridade dos complexos juncionais, reposicionamento apical das bombas de Na-K-ATPase e ativação do sistema complemento devido à perda da polaridade da Crry. Ocorre liberação de citocinas e quimiocinas e consequente infiltrado tecidual por células inflamatórias na região lesada.^(28,30,57) Essas células por sua vez potencializam a resposta inflamatória, gerando agentes vasoconstritores, citocinas e mediadores tóxicos, tais como radicais livres e proteases, que amplificam e perpetuam o processo.⁽⁵⁷⁾

Ysebeart et al⁽⁵⁷⁾, em seu estudo da cinética dos leucócitos na lesão de I/R desencadeada pela OAR por 60 minutos (como já comentado, um modelo mais agressivo de I/R) demonstraram infiltração de monócitos no interstício renal (células ED-1⁺) após 24 horas da lesão de I/R, com pico em 5 dias. A infiltração de linfócitos CD4⁺ ocorreu no quinto dia pós-lesão de I/R e persistiu por 10 dias, e a infiltração de linfócitos CD8⁺ foi mais precoce (dia 3), também persistindo até 10 dias pós I/R.⁽⁵⁷⁾ Nosso estudo foi consistente com o de Ysebeart et al,⁽⁵⁷⁾ encontrando maior infiltração de células ED-1⁺ e neutrófilos na medula externa renal, enquanto a infiltração por linfócitos ocorreu tanto na medula externa como no córtex renal. Estes resultados

demonstram que está havendo envolvimento tanto da imunidade inata como da adaptativa.

Estas células inflamatórias causam lesão tecidual por meio da produção de citocinas e quimiocinas que perpetuam o ciclo vicioso da inflamação. Os macrófagos, parte da primeira onda inflamatória juntamente com os neutrófilos, são considerados “células diretoras”, atraindo outros macrófagos, estimulando fibroblastos, fagocitando e induzindo apoptose. As células dendríticas maduras ativam linfócitos T que desencadeiam a segunda onda da resposta inflamatória – antígeno específica – produzindo INF- γ que recruta mais neutrófilos e macrófagos para a área danificada e portanto, alimenta o ciclo vicioso da inflamação.⁽²²⁾ Apesar de não ter havido intenção de estudar a cinética das células inflamatórias neste estudo, a presença de infiltrado linfocitário significativo na medula externa após 48 horas da lesão de I/R, associado a infiltrado menos intenso de neutrófilos e macrófagos, sugere que a segunda onda de inflamação, às vezes denominada de fase de extensão da lesão de I/R, já havia sido deflagrada.

O uso de MP se associou à significativa prevenção do infiltrado inflamatório celular, sugerindo que parte da proteção funcional e tubular conferida pelo corticóide neste estudo esteja relacionada à modulação do fenômeno causado por estas células.

O fator- κ B nuclear (NF- κ B), é um fator de transcrição dimérico expresso em epitélio dos túbulos renais, considerado o mais importante regulador transcricional pró-inflamatório. Ele apresenta envolvimento importante no aumento da produção de proteína quimioatratante de monócitos (MCP-1), induzida por hiperglicemia e lipopolissacarídeos. O p65 é o sítio de translocação nuclear do NF- κ B, e o I κ B α é o seu inibidor mais importante ligando-se à sua molécula e bloqueando a sua translocação

nuclear.⁽⁶⁴⁾ Em nosso estudo o anticorpo usado para quantificar os túbulos marcados para NF-κB, foi o anticorpo policlonal anti-p65. A diminuição de túbulos marcados para NF-κB no grupo MP-I/R sugere que a MP bloqueou a ativação do NF-κB. Assim, um dos possíveis mecanismos da renoproteção da MP na I/R seria a redução do infiltrado de macrófagos, achado reforçado pelo número significativamente menor de células ED-1⁺ na medula externa renal no grupo MP-I/R. A isquemia, secundária ao mecanismo dependente NF-κB, pode indiretamente amplificar a vasoconstrição arterial induzida pela hipóxia, por meio da inibição de vasodilatadores (síntese de óxido nítrico endotelial) e da estimulação à liberação da endotelina-1.⁽⁴³⁾

Vários estudos demonstraram que a MP promove proteção contra as lesões de isquemia/reperfusão em diferentes órgãos, tais como, proteção cardiopulmonar pré bypass cardiopulmonar em humanos,⁽⁴⁴⁾ proteção coronariana experimental^(42,51) e proteção hepática pré hepatectomia⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾ e no transplante hepático clínico e experimental.^(50,52) No entanto estudos avaliando a MP como droga renoprotetora pós lesão de I/R renal experimental ou clínica são escassos.

Tuner et al⁽⁵⁾ demonstraram melhora da função renal com diminuição da permeabilidade vascular na primeira semana pós transplante hepático em humanos. Recentemente, Kumar et al⁽⁵⁹⁾ demonstraram proteção da função renal com uso de 3mg/kg de dexametasona intraperitoneal 30 minutos antes de 60 minutos de OAR bilateral em ratos. Os autores encontraram significante redução, nas primeiras 24 horas pós reperfusão, do infiltrado de neutrófilos e expressão de ICAM-1 nos rins dos animais tratados, sugerindo efeito citoprotetor precoce dos glicocorticóides na lesão de I/R renal.⁽⁵⁹⁾ Baker et al⁽⁴³⁾ também demonstraram renoproteção associada ao aumento da síntese de óxido nítrico endotelial com o uso de 30mg/kg de MP administrado por via

intravenosa 60 minutos antes da lesão de I/R (160 minutos de oclusão infrarenal da aorta) em porcos.

Por outro lado existem dois relatos aonde não foi demonstrado efeito protetor dos glicocorticóides contra a lesão de I/R renal. Tuner et al⁽⁵²⁾ demonstraram piora da creatinina sérica em oito pacientes, na primeira semana após o uso de 10mg/kg de MP antes do clampeamento da aorta abdominal infrarenal comparado ao grupo controle. Kainz et al⁽⁶⁵⁾, realizaram o pré-tratamento de 136 doadores de rins com 1000mg de MP pelo menos 3 horas antes da captação dos órgãos e não encontraram diminuição da incidência e/ou duração da IRA pós transplante renal na coorte estudada.

Estes dois estudos apresentam limitações. No primeiro a amostra é muito pequena (n=8-10/grupo), a dose de MP empregada foi muito baixa e apenas creatinina sérica foi utilizada como marcador de função renal. O segundo estudo apresenta coorte considerável de pacientes, porém apresenta vários fatores que impedem a sua generalização. Os doadores e receptores eram quase todos caucasianos e de apenas três centros do norte da Europa. A MP foi aplicada a doadores falecidos, o que apesar de ser uma manobra clinicamente atrativa, é uma situação onde a isquemia fria prevalece em relação à isquemia quente. Finalmente, a isquemia quente é de curta duração na captação de múltiplos órgãos em doadores falecidos, já que nessa situação a reperfusão geralmente é realizada diretamente na aorta abdominal.

O nosso modelo experimental mimetiza isquemia quente e não isquemia fria e apresenta potencialidade clínica em situações aonde a isquemia quente renal é mais prolongada, tais como doadores vivos de rins (principalmente aqueles com possíveis dificuldades técnicas, onde existe risco ainda maior de ocorrer isquemia quente mais prolongada), cirurgias vasculares abdominais e cardiovasculares de grande porte.

É sempre necessário e prudente lembrar que a transferência de dados de bancada para a beira do leito, precisa ser cautelosa. A IRA é síndrome de etiopatogenia dinâmica e multifatorial. Os pacientes que desenvolvem IRA isquêmica nos dias de hoje frequentemente apresentam doenças crônicas de base, falência de múltiplos órgãos e idade avançada. O tratamento da IRA não melhorará obrigatoriamente o desfecho final destes pacientes. Além disso, na maioria das vezes não temos o privilégio de instituir a terapêutica no momento ideal (pré-agressão) e conseqüentemente, o agente terapêutico pode não funcionar pelo fato da lesão já estar estabelecida.⁽²⁰⁾ Mesmo com estas limitações, este estudo experimental fornece importantes subsídios de que a administração prévia de MP pode ser uma manobra efetiva contra os efeitos deletérios da lesão de isquemia e reperfusão renal.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1) A administração de metilprednisolona antes da manobra de isquemia renal em ratos protegeu os animais contra a queda da filtração glomerular e alterações estruturais desencadeadas pela lesão de isquemia/reperfusão renal.

2) Um dos prováveis mecanismos desta proteção parece ser a atenuação da fase aguda da resposta inflamatória decorrente da lesão de isquemia/reperfusão, evidenciada por menor extravasamento de células inflamatórias e menor expressão de fator kapa-B nuclear na zona externa da medula renal externa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(6):1503-1520.
2. Lattanzio MR, Kopyt NP. Acute kidney injury: new concepts in definition, diagnosis, pathophysiology, and treatment. *J Am Osteopath Assoc* 2009;109(1):13-19.
3. Palevsky P, Murray PT, eds. *Acute Kidney Injury and Critical Care Nephrology. Nephrology Self-Assessment Program (NephroSAP)*. 2006;5:1-76.
4. Mehta RL, Chertow GM. Acute renal failure definitions and classification: time for change? *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):2178-2187.
5. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P and the ADQI workgroup. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8(4):R204-R212.
6. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Report Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11(2):R31.
7. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. The changing epidemiology of acute renal failure. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2(7):364-377.

8. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(11):3365-3370.
9. Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BCM Med* 2011;9:11.
10. Santos WJ, Zanetta DM, Pires AC, Lobo SM, Lima EQ, Burdmann EA. Patients with ischaemic, mixed and nephrotoxic acute tubular necrosis in the intensive care unit- a homogeneous population? *Crit Care* 2006;10(2):R68.
11. Bucuvic EM, Ponce D, Balbi AL. Risk factors for mortality in acute kidney injury. *Rev Assoc Med Bras* 2011;57(2):158-163.
12. Palomba H, de Castro I, Neto AL, Lange S, Yu L. Acute kidney prediction following elective cardiac surgery: AKICS Score. *Kidney Int* 2007;72(5):624-631
13. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):2199-2210.
14. Janssen WM, Beekhuis H, Bruin R, Jong PE, Zeeuw D. Noninvasive measurement of intrarenal blood flow distribution: kinetic model of renal ¹²³I-hippuran handling. *Am J Physiol* 1995;269(4):F571-F580.
15. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005;365(9457):417-430.
16. Dagher PC, Herget-Rosenthal S, Ruehm SG, Jo SK, Star RA, Agarwal R, Molitoris BA. Newly developed techniques to study and diagnose acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):2188-2198.

17. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004;66(2):480-485.
18. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res* 2009;77(1):4-7.
19. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Brown PA, Stewart KN, Britti D, et al. The tyrosine kinase inhibitor typhosin AG126 reduces renal ischemia/reperfusion in the rat. *Kidney Int* 2003;64(5):1605-1619.
20. 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-F12.
21. Chen W, Bennett CF, Wang ME, Dragun D, Tian L, Stecker K, et al. Perfusion of kidneys with unformulated “naked” intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides prevents ischemic/reperfusion injury. *Transplantation* 1999;68(6):880-887.
22. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 2008;109(4):e102-e107.
23. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med* 2009;87(9):859-864.
24. Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A. The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest* 1972;51(1):118-126.

25. Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, Kim B, Chen J, Kajiya F, et al. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282(6):F1140-F1149.
26. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(2): F191-F198.
27. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996;97(4): 1056-1063.
28. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm* 2009;2009:137072.
29. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int* 2004;66:496-499.
30. Thurman JM, Ljubanovic D, Royer Pa, Kraus DM, Molina H, Barry NP, et al. Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 2006;116(2):357-368.
31. Wang Y, John R, Chen J, Richardson JA, Shelton JM, Bennett M, et al. IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury. *J Am Soc of Nephrol* 2009;20(7):1544-1555.
32. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008;118(5):1657-1668.

33. Prakash J, Borst MH, Lacombe M, Opdam F, Klok PA, van Goor H, et al. Inhibition of renal rho kinase attenuates ischemia/reperfusion-induced injury. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(11):2086-2097.
34. Facio Jr FN, Sena AA, Araujo LP, Mendes GE, Castro I, Luz MA et al. Annexin 1 mimetic peptide protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Mol Med* 2011;89(1):51-63.
35. Vinuesa E, Hotter G, Jung M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Sola A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischemia/reperfusion injury. *J Pathol* 2008;214(1):104-113.
36. Serhan C, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol* 2005;6(12):1191-1197.
37. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2007;71(7):619-628.
38. Rabb H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. *Kidney Int* 2002;61(6):1935-1946.
39. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(1):152-176.
40. Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, et al. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemia acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(1):F264-F271.

41. Furuichi K, Gao JL, Horuk R, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2008;181(12):8670-8676.
42. Valen G, Kawakami T, Tahepold P, Starkopf J, Kairane C, Dumitrescu A, et al. Pretreatment with methylprednisolone protects the isolated rat heart against ischaemic and oxidative damage. *Fee Radic Res* 2000;33(1):31-43.
43. Baker RC, Armstrong MA, Young IS, McClean E, O'Rourke D, Campbell FC, et al. Methylprednisolone increased urinary nitrate concentrations and reduces subclinical renal injury during infrarenal aortic ischemia reperfusion. *Ann Surg* 2006;244(5):821-826.
44. Enc Y, Karaca P, Ayoglu U, Camur G, Kurc E, Cicek S. The acute cardioprotective effect of glucocorticoid in myocardial ischemia-reperfusion injury occurring during cardiopulmonary bypass. *Heart Vessels* 2006;21(3):152-156.
45. Aldrighetti L, Pulitano C, Arru M, Finazzi R, Catena M, Soldini L, et al. Impact of preoperative steroids administration on ischemia-reperfusion injury and systemic responses in liver surgery: a prospective randomized study. *Liver Transpl* 2006;12(6): 941-949.
46. Pulitano C, Aldrighetti L, Arru M, Finazzi R, Soldini L, Catena M et al. Prospective randomized study of the benefits of preoperative corticosteroid administration on hepatic ischemia-reperfusion injury and cytokine response in patients undergoing hepatic resection. *HPB (Oxford)* 2007;9(3):183-189.

47. Turner S, Dhamarajah S, Bosomworth M, Bellamy MC, Leeds Liver Transplant group. Effect of perioperative steroids on renal function after liver transplantation. *Anaesthesia* 2006;61(3):253-259.
48. Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, et al. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg* 2008;248(6):1042-1050.
49. Chimalakonda AP, Mehvar R. Effects of duration of ischemia and donor pretreatment with methylprednisolone or its macromolecular prodrug on the disposition of indocyanine green in cold-preserved rats livers. *Pharm Res* 2004;21(6):1000-1008.
50. Chimalakonda AP, Mehvar R. Effects of methylprednisolone and its liver-targeted dextran prodrug on ischemia-reperfusion injury in a rat liver transplantation model. *Pharm Res* 2007;24(12): 2231-2238.
51. Luz PL, Forrester JS, Wyatt HL, Diamond GA, Chang M, Shan HJ. Myocardial reperfusion in acute experimental ischemia. Beneficial effects of prior treatment with steroids. *Circulation* 1976;53(5):847-852.
52. Turner S, Derham C, Orsi NM, Bosomworth, Bellamy MC, Howell SJ. Randomized clinical trial of the effects of methylprednisolone on renal function after major vascular surgery. *B J Surg* 2008;95(1):50-56.
53. Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, B et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 2000;57(1):167-182.

54. Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Courser WG, Koch KM, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int* 1996;49(3):666-678.
55. Striker GE, Schainuck LI, Cutler RE, Benditt EP. Structural-functional correlations in renal disease. I. A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease. *Hum Pathol* 1970;1(4):615-630.
56. Ko GJ, Boo CS, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(2):842-852.
57. Ysebaert DK, Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(10):1562-1574.
58. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoeskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase during ischemia. *Am J Physiol* 1992;263(2 Pt2):F488-F495.
59. Kumar S, Allen DA, Kieswick JE, Patel NS, Harwood S, Mazzon E, et al. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(11):2412-2425.
60. Aydin G, Okiye SE, Zincke H. A comparative study of several agents alone and combined in protection of the rodent kidney from warm ischemia: methylprednisolone, propranolol, furosemide, mannitol, and adenosine triphosphate-magnesium chloride. *Urol Res* 1983;11(3):105-109.

61. Smeesters C, Corman J, Fassi JC, Giroux L, St-Louis G, Jean G, et al. Beneficial effects of methylprednisolone on urinary excretion of lysosomal enzymes in acute renal ischemia. *Can J Surg* 1983;26(2):175-177.
62. Takahira R, Yonemura K, Fujise Y, Hishida A. Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury: the possible role of nitroxyl. *Free Radic Biol Med* 2001;31(6):809-815.
63. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181(2):160-166.
64. Zhang Z, Yuan W, Sun L, Szeto FL, Wong KE, Li X, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ targeting of NF-kappaB suppresses high glucose-induced MCP-1 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 2007;72(2):193-201.
65. Kainz A, Wilflingseder J, Mitterbauer C, Haller M, Burghuber C, Perco P, et al. Steroid pretreatment of organ donors to prevent postischemic renal allograft failure: a randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 2010;153(4):222-230.

7. APÊNDICE

7. APÊNDICE

Efeito da metilprednisolona na lesão de isquemia/reperfusão renal – Projeto piloto.

O experimento foi conduzido de acordo com as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, após serem aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP – Processo nº 633006 (Anexo B).

O projeto piloto (4 animais por grupo) usou infusão de 30mg/kg/peso de MP, por via intravenosa, 60 minutos antes da lesão de I/R experimental (30 minutos de isquemia), em ratos machos *Wistar* previamente nefrectomizados contralateralmente. Esse estudo mostrou renoproteção no grupo que usou MP (MP-I/R) em comparação ao grupo que usou veículo (Veic-I/R), demonstrada pela mensuração da depuração de inulina dois dias após a I/R (Figura 18).

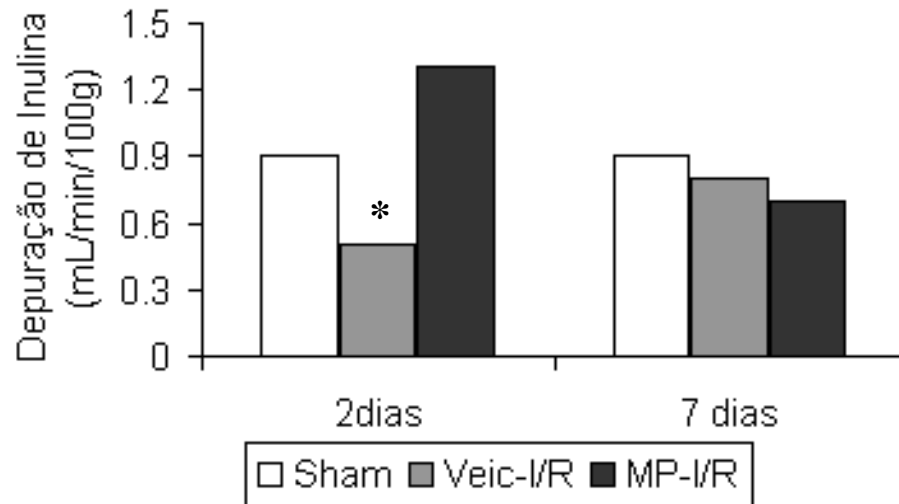


Figura 18. Efeito da metilprednisolona (MP) na depuração de inulina (mL/min/100g) em 2 e 7 dias após lesão de I/R (* $p < 0,05$ MP-I/R vs. Veic-I/R 2 dias).

8. ANEXOS

8. Anexos

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA).

<p>Comissão de Ética na Experimentação Animal</p> <p>CEEA</p> <p>FAMERP</p>	<p>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto</p> <p>Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA</p> <p>FAMERP Av. Aracá, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J. Rio Preto/ SP</p>
--	--

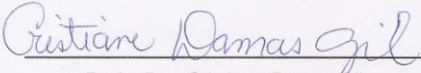
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “Efeito da metilprednisolona na lesão de isquemia/ reperfusão renal” (Protocolo FAMERP nº5656/2009), sob responsabilidade do Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann, está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi **aprovado** pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEEA-FAMERP).

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

We certify that Project entitled “Effects of methylprednisolone in the ischemia/reperfusion renal injury” (Protocol nº 5656/2009), agrees with the Ethical Principles for Animal Research established by Brazilian law nº11.794/2008 and Resolution nº 714/2002 and was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research of Faculty of Medicine from São José do Rio Preto (CEEA – FAMERP) on November 12, 2009.

São José do Rio Preto, 12 de Novembro de 2009.


Profa. Dra. Cristiane Damas Gil
Presidente da CEEA
FAMERP

Anexo B. Aprovação do estudo piloto pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA).

