

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

RENATO VAN WILPE BACH

**ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO DE ESTATINA PRÉ E PÓS-OPERATÓRIA NA
DOENÇA RENAL CRÔNICA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM *RATTUS
NORVEGICUS ALBINUS***

CURITIBA

2012

RENATO VAN WILPE BACH

**ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO DE ESTATINA PRÉ E PÓS-OPERATÓRIA NA DOENÇA RENAL
CRÔNICA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM *RATTUS NORVEGICUS ALBINUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia
da Pontifícia Universidade Católica do
Paraná como requisito parcial à obtenção
do Grau de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Meyer

**CURITIBA
2012**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

B118a
2012 Bach, Renato van Wilpe
Análise da utilização de estatina pré e pós-operatória na doença renal crônica : estudo experimental em ratos / Renato van Wilpe Bach . orientador: Fernando Meyer. – 2012.
84 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2012
Bibliografia: f. 57-66

1. Hidroximetilglutaril CoA redutases – Inibidores. 2. Insuficiência renal crônica. 3. Nefrectomia. I. Meyer, Fernando. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. III. Título.

CDD 20. ed. – 616. 614



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 100

Aos dezesseis dias do mês de abril de 2012, realizou-se a sessão de defesa de dissertação "ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO DE ESTATINA PRÉ E PÓS-OPERATÓRIA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS." Área de Concentração: Aplicação de Recursos Tecnológicos em Cirurgia, apresentada por Renato Van Wilpe Bach, sob orientação do Prof. Dr. Fernando Meyer.

Requisito para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Alberto Engelhorn	
Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha	
Profª. Dra. Marlene de Almeida	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Carlos Alberto Engelhorn

Avaliação: Aprovado

Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha

Avaliação: Aprovado

Profª. Dra. Marlene de Almeida

Avaliação: Aprovado

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO.....	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	6
2.2 ESTATINAS	9
3 MÉTODO.....	14
3.1 LOCAL DO ESTUDO	14
3.2 AMOSTRA ESTUDADA	14
3.3 DESENHO DE ESTUDO.....	14
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	14
3.5. EXPERIMENTO	15
3.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	22
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	25
4.1 COMPARAÇÃO DOS MOMENTOS DE AVALIAÇÃO EM CADA UM DOS GRUPOS.....	27
4.2 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO ÀS VARIAÇÕES PERCENTUAIS.....	32
4.3 COMPARAÇÃO DOS MOMENTOS CLÍNICO E CIRÚRGICO	37
4.3.1 Avaliação da evolução de proteinúria.....	38
4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	40
4.4.1 Índice de glomeruloesclerose (IG).....	40
4.4.2 Índice de mesangiólise (IM).....	40
4.4.3 Índice de lesão túbulo-intersticial (ILTI).....	42
4.4.4 Índice de lesão vascular (ILV)	44
4.4.5 Outras alterações histopatológicas	44
4.4.5.1 Presença de abscessos	44
4.4.5.2 Infiltrado intersticial.....	46
4.4.5.3 Microcalcificação distrófica intratubular	46

4.4.5.4 Leucocitúria	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO	66

A meus pais, Karin e Ariel, pelo estímulo constante ao meu progresso intelectual e profissional.

A minha sogra, professora Nylce, pelas correções indispensáveis.

A minha esposa Mônica, pelo apoio e incentivo aos meus estudos, e pela dedicação ao nosso relacionamento.

A meus filhos Lucas, Pedro José e Thomas, pela importância e significado que têm em minha vida cotidiana.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da PUC-PR, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao professor-orientador, Prof. Dr. Fernando Meyer, pelo estímulo e disponibilidade constantes, por seu exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos colegas de classe, pela troca de informações e dicas, pela amizade e incentivo.

Aos graduandos em Medicina da PUC-PR, Anthony Augusto Carmona, Ricardo César Meletto e Denise Sbrissia Gouveia, pela participação fundamental na fase experimental deste projeto.

Ao auxiliar de laboratório na Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUC-PR, Sr. Misael Gomes Barbosa, sem o apoio do qual este projeto de pesquisa não teria se convertido em dissertação.

A todos os funcionários e professores dos Setores de Patologia Experimental e Biotério Central, por terem ajudado enormemente a viabilizar este projeto. Ao Professor Mário Montemor Netto, pelas orientações sobre a análise histopatológica.

Ao Prof. Ary Elias Sabbag Júnior, do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, pela orientação e revisão da análise estatística.

RESUMO

Introdução: estatinas são fármacos inibidores seletivos e competitivos da Hidroximetilglutaril coenzima A redutase, enzima que catalisa a etapa inicial da biossíntese de colesterol. Apresentam, além de ação hipolipemiante, efeitos pleiotrópicos que podem incluir a nefroproteção. **Objetivo:** analisar os efeitos da estatina pré e pós-operatória na doença renal crônica (DRC) induzida em ratos Wistar. **Método:** trata-se de estudo experimental. Quarenta ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos foram randomizados no pré-operatório: no Grupo 1 (n=15), receberam dez dias de estatina no pré-operatório, e mais quinze dias após nefrectomia 5/6; no Grupo 2 (n=15), os ratos receberam a droga apenas no pós-operatório; o Grupo 3 (n=10), *sham*, recebeu somente a nefrectomia 5/6. A progressão de DRC foi avaliada por dosagens seriadas de uréia, creatinina e proteinúria, em três momentos distintos do experimento. Os ratos sobreviventes ao período de observação de trinta dias (n=34) foram submetidos à retirada *ex-vivo* dos rins remanescentes, e seus dados submetidos a análise estatística. Valores de p menores do que 0,05 indicaram significância estatística. Para análise histopatológica, foram utilizadas três colorações (hematoxilina-eosina, tricrômio de Gomori e PAS) e quatro índices padronizados (índices de glomeruloesclerose, mesangiólise, lesão túbulo-intersticial e lesão vascular). **Resultados:** os grupos tratados com estatina apresentaram menores médias de uréia no pós-operatório, e o Grupo 2, menores médias em comparação com o Grupo 1 e os *sham*. O uso de estatina não teve impacto sobre a variável creatinina. Houve indução de proteinúria em ratos tratados com estatina, no pré-operatório. Observamos diminuição da proteinúria após o décimo dia de pós-operatório em ambos os grupos tratados com estatina. O Grupo 2 apresentou os menores IM e ILTI. **Conclusão:** o uso de estatina teve impacto na progressão da DRC induzida neste modelo experimental em ratos Wistar, com melhores resultados no grupo que recebeu a droga somente no pós-operatório.

Descritores: Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases. Insuficiência Renal Crônica. Nefrectomia. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Introduction: statins are selective competitive Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors, an enzyme that catalyzes the initial phase of cholesterol biosynthesis. They have, beyond hypolipemiant action, pleiotropic effects that may include nephroprotection. **Objective:** to analyze pre-operative and post-operative effects of statin on renal chronic disease experimentally induced in rats. **Method:** it is an experimental study. Fourty male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were pre-operatively randomized. To Group 1 (n=15), statin was orally administered for ten days pre-operatively, and then for more fifteen days after 5/6 nephrectomy. Rats of Group 2 (n=15) just received statin post-operatively. Rats of Group 3 (sham, n=10) were submitted only to surgery. The progression of renal chronic disease was assessed by serial dosaging of serum urea, creatinine, and proteinúria at three different moments of experimentation. Rats that survived after an observational period of thirty days (n=34) were submitted to *ex-vivo* excision of the remnant kidneys. Their data were submitted to statistical analysis, where significance level was p-value lower than 0,05. Histopathologic analysis was performed by using three stains (hematoxiline-eosine, Gomori tricromium and PAS) and four standard indexes (glomerulosclerosis, mesangiolyis, tubulointerstitial and vascular damage indexes). **Results:** statin treated groups showed lower means of urea in post-operative period, and Group 2 had the lesser means. Use of statin did not change creatinine values. Statin induced proteinuria in healthy rats prior to nephrectomy was also observed. Proteinuria decreased after ten days after surgery in both statin treated groups. Group 2 showed smaller mesangiolyis and tubulointerstitial damage scores when compared to other groups. **Conclusion:** use of statin had impact to kidney chronic disease progression in this animal experimentation model. Better results were obtained in the group that only received statin postoperatively.

Keywords: Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors. Renal Insufficiency, Chronic. Nephrectomy. Rats, Wistar.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Coleta de amostras de sangue: coleta de sangue periférico caudal.	16
Figura 2 – Cuidados per-operatórios: a) tricotomia abdominal; b) mesa cirúrgica; c) posição na mesa cirúrgica; d) cuidado com vias aéreas.	17
Figura 4 - Dissecção do rim direito. Hilo renal clampeado.	18
Figura 5 - Dissecção do pólo inferior do rim esquerdo.	19
Figura 6 - Dissecção do pólo superior do rim esquerdo.	19
Figura 7 - – Nefrectomia polar superior esquerda.	20
Figura 8 – Punção vesical per-operatória.	21
Figura 9 – Complicação pós-operatória: hérnia incisional.	26
Figura 10 – Aspecto do rim remanescente: trigésimo dia de pós-operatório da nefrectomia bipolar esquerda (Grupo 1).	26
Figura 11 – Aspecto do rim remanescente: trigésimo dia de pós-operatório da nefrectomia bipolar esquerda (Grupo 2).	27
Figura 12 – Gráfico de caixa para variável uréia.	29
Figura 13 – Gráfico de caixa para variável creatinina.	30
Figura 14 – Gráfico de caixa para variável proteinúria.	32
Figura 15 – Gráfico de caixa para variável uréia: comparação da variação percentual de dosagens séricas entre os grupos, trigésimo dia em relação ao décimo dia.	34
Figura 16 - Gráfico de caixa para variável proteinúria: comparação da variação percentual entre os grupos, trigésimo dia em relação ao décimo dia.	36
Figura 17 - Gráfico de caixa para variável proteinúria: comparação da variação percentual entre os grupos, trigésimo dia em relação ao dia da cirurgia.	36
Figura 18 - Gráfico de caixa para variável proteinúria. Comparação da variação percentual de proteinúria no dia do início do experimento e no dia da cirurgia. Grupo 1.	38
Figura 19 - Gráfico de caixa para variável proteinúria. Comparação da variação percentual de dosagens urinárias no dia do início do experimento e no dia da cirurgia. Grupo 1.	40
Figura 20 – Mesangiólise. Na coloração PAS podemos observar: a) IM pontuação 0 – sem alterações capilares; b) IM pontuação 1 – dilatação capilar e/ou 25% dos	

capilares convolutos; c) e d) IM pontuação 2 - dilatação capilar e/ou 25% dos capilares convolutos e/ou aneurismas capilares ou 50% de capilares convolutos....41

Figura 21 – Lesão Túbulo-Intersticial. Na coloração Tricrômio de Gomori podemos observar: a) e b) pontuação 1 – estrutura capilar normal; c e d) pontuação 2 – LTI envolvendo até 10% da área.....43

Figura 22 - Área de abscesso, Grupo 1.45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 1.	28
Tabela 2 – Comparação de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 2.	28
Tabela 3 – Comparação de dosagens séricas de creatinina em momentos diversos, parte 1.	29
Tabela 4 – Comparação de dosagens séricas de creatinina em momentos diversos, parte 2.	30
Tabela 5 – Comparação de dosagens de proteinúria em momentos diversos, parte 1.	31
Tabela 6 – Comparação de dosagens de proteinúria em momentos diversos, parte 2.	31
Tabela 7 – Comparação da variação percentual de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 1.	33
Tabela 8 – Comparação da variação percentual de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 2.	33
Tabela 9 – Comparação da variação percentual de dosagens séricas de creatinina em momentos diversos.	34
Tabela 10 – Comparação da variação percentual de proteinúria em momentos diversos, parte 1.	35
Tabela 11 – Comparação da variação percentual de proteinúria em momentos diversos, parte 2.	35
Tabela 12 – Comparação da variação percentual das variáveis uréia, creatinina e proteinúria, antes do início do experimento e no dia da cirurgia. Grupo 1.	37
Tabela 13 – Comparação das dosagens urinárias de proteína antes do início do experimento, no dia da cirurgia, no décimo e no trigésimo dia de pós-operatório. Grupo 1.	39
Tabela 14 – Comparação das dosagens de proteinúria: antes do início do experimento, no dia da cirurgia, no décimo e no trigésimo dia de pós-operatório. Grupo: 1.	39

Tabela 15 – Índice de Mesangiólise.	42
Tabela 16 - Índice de Mesangiólise: comparação entre os grupos.	42
Tabela 17 - Índice de Lesão Túbulo-Intersticial.	43
Tabela 18 - Presença de abscessos.	45
Tabela 19 - Presença de abscessos: comparação entre os grupos.	45
Tabela 20 – Presença de infiltrado intersticial.	46
Tabela 21 – Presença de infiltrado intersticial: comparação entre os grupos.	46
Tabela 22 – Microcalcificação distrófica intratubular.	47
Tabela 23 –Microcalcificação distrófica intratubular comparação entre os grupos....	47
Tabela 24 – Leucocitúria.	47
Tabela 25 – Leucocitúria: comparação entre os grupos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1º Q	- 1º quartil
3º Q	- 3º quartil
AC	- Aneurismas capilares
ALERT	- <i>Assessment of Lescol in Renal Transplantation</i>
AMPc	- Monofosfato cíclico de adenosina
AURORA	- <i>A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Hemodialysis: an Assessment of Survival and Cardiovascular Events</i>
CARE	- <i>Cholesterol And Recurrent Events</i>
CC	- Capilares convolutos
DCV	- Doença Cardiovascular
DL ₅₀	- indicação da letalidade de uma dada substância; dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste
DOCA	- Acetato desoxicorticosterona
DRC	- Doença Renal Crônica
eNOS	- óxido nítrico sintetase endotelial
(Estudo) D4	- <i>Die Deutsche Diabetes Dialyse Studie</i>
GMPc	- Monifosfato cíclico de guanosina
GTP	- guanosina trifosfato
GTPase	- enzimas capazes de hidrolizar a GTP
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HE	- Hematoxilina-eosina
HMG-CoA	- 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A
HPS	- <i>Heart Protection Study</i>
IG	- Índice de Glomeruloesclerose
ILTI	- Índice de Lesão Túbulo-Intersticial
ILV	- Índice de Lesão Vascular
IM	- Índice de Mesangiólise
IRC	- Insuficiência Renal Crônica
KDOQI	- <i>Kidney Disease Outcome Quality Initiative</i>
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LTI	- Lesões túbulo-intersticiais

Mín.	- Mínimo
Máx.	- Máximo
n	- número de indivíduos na amostra
NF-kB	- Fator nuclear kB
NKF	- <i>National Kidney Foundation</i>
NNT	- Número necessário a ser tratado
PAS	- Ácido Periódico-Schiff
PREVEND IT	- <i>Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease Intervention Trial</i>
Rhos	- proteínas da família Rho de GTPases
Ras	- proteínas da superfamília Ras de pequenas GTPases
SHARP	- <i>Study of Heart and Renal Protection</i>
TG	- Tricrômio de Gomori

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é definida pela *Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI) do National Kidney Foundation (NKF)*¹ como:

- a) a presença de anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com ou sem decréscimo da taxa de filtração glomerular; manifestada por anormalidades histopatológicas, por alterações em marcadores de dano renal e/ou anormalidades em exames de imagem;
- b) taxa de filtração glomerular menor que 60 ml/min/1,73m²;

Trata-se de definição clínica da doença, aplicada a seres humanos que apresentem estes sintomas por três meses ou mais¹. Nestes pacientes podemos determinar o estágio de desenvolvimento da doença baseados no nível de função renal, independente da etiologia. Atualmente se considera que a doença pode ser classificada em seis estágios funcionais, que vão do estágio zero, no qual a função renal é normal e ainda não há lesão renal (composto por indivíduos com características de alto grau de risco para a doença); até os estágios quatro (doença severa) e cinco (doença terminal)^{1,2}.

Lesões histopatológicas são precoces, e antecedem à diminuição da função renal, estando presentes desde o estágio um da doença. São alterações morfológicas e ultra-estruturais irreversíveis do parênquima renal^{3,4} e independem da etiologia da doença.

A DRC está associada a complicações metabólicas, cardiovasculares e neurológicas⁵, e a um risco elevado de morte por doença cardiovascular^{6,7}. A maioria dos indivíduos morre devido a esta complicação², antes mesmo de progredir à fase terminal da doença, que ocorre quando os rins não conseguem mais manter a homeostase do meio interno⁸. O termo Insuficiência Renal Crônica (IRC) refere-se a esta fase terminal, na qual se faz necessária a instituição de terapia renal substitutiva², que inclui modalidades terapêuticas onerosas e nem sempre disponíveis para todos os pacientes, como a hemodiálise, a diálise peritoneal e o transplante renal⁹.

O estabelecimento da DRC se dá por progressivas mudanças nos néfrons e corpúsculos renais⁴, até o estabelecimento de glomeruloesclerose focal e

segmentar. Esta progressão, porém, não é uniforme. Após a redução da massa renal, a perda de células renais e sua substituição por matriz extracelular levam a hipertrofia funcional e estrutural dos néfrons restantes⁴. O aumento do diâmetro glomerular (resultante da remoção ou destruição de glomérulos funcionais) é uma das principais alterações hemodinâmicas compensatórias à agressão renal, estando diretamente relacionado ao percentual de tecido renal perdido, como demonstrado em modelos experimentais^{3,12}.

A diminuição da função renal está associada com resposta inflamatória, evidenciada pelo aumento da concentração sérica de citocinas e outros marcadores de inflamação, observada em estágios precoces e avançados de disfunção renal¹⁰; e pela presença de alterações histopatológicas que vêm sendo investigadas, com foco na ativação de monócitos e macrófagos, tendo em vista que a lesão renal é acompanhada da presença de células inflamatórias no glomérulo e no interstício tubular^{10,11}. O endotélio vascular também representa válido indicador no processo regulatório da inflamação^{4,11}; na patogênese da glomeruloesclerose focal segmentar, os danos em células endoteliais glomerulares e podócitos seriam freqüentes, bem como determinantes no desenvolvimento das alterações histopatológicas que levam à DRC^{4,11}.

A microalbuminúria é considerada um marcador de nefropatia incipiente, e ao mesmo tempo, um validado indicador de risco cardiovascular⁹. Em ratos submetidos à nefrectomia unilateral, um aumento dos níveis de proteinúria é seguido de hipertrofia e hiperfiltração, podendo aquela representar um marcador precoce, que permita identificar uma doença renal estágio zero¹². Achados clínicos identificam proteinúria e hipertensão como marcadores sugestivos de elevado risco de progressão de DRC em pacientes humanos⁹.

A hipertensão arterial, mediada por angiotensina II, tem papel importante no desenvolvimento das alterações patogênicas adaptativas pós-nefrectomia^{4,12}. Ratos submetidos a nefrectomia 5/6 apresentam pressão sistólica maior que os *sham* e os ratos tratados com algumas classes de anti-hipertensivos^{4,13}. Já a monoterapia com inibidores da enzima conversora de angiotensina (irbesartana, telmisartana) tem se mostrado benéfica no retardo da progressão de doenças renais experimentalmente induzidas^{13,14,15}.

Dislipidemias são comuns em pacientes com DRC, tanto naqueles submetidos a tratamento conservador, quanto naqueles em diálise, ou mesmo após o transplante renal; determinando um perfil lipídico tipicamente trombogênico, com predomínio de elevação dos níveis de triglicérides e redução da lipoproteína de alta densidade (HDL) - alterações que podem ser observadas já em fases iniciais do declínio da função renal¹⁶. À semelhança da dislipidemia observada na síndrome metabólica, a resistência insulínica pode ser um possível mecanismo fisiopatológico comum¹⁷.

Os pacientes com DRC que apresentam altos níveis de marcadores inflamatórios, especialmente se aliados a dislipidemia de difícil controle, têm maior risco de desenvolver doença cardiovascular (DCV)⁹.

O conjunto de inflamação, deficiência de HDL, triglicérides séricos elevados e alterações oxidativas das lipoproteínas, característico da DRC, pode causar aterosclerose e progressão da própria doença renal. A produção e o fluxo aumentados de lipídeos, aliado a seu catabolismo reduzido e defeitos no transporte reverso de colesterol, também colaboram no desenvolvimento de aterosclerose, glomeruloesclerose e danos túbulo-intersticiais^{5,6}.

Há evidência de que o tratamento da DRC com estatinas - fármacos inibidores competitivos da 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a etapa inicial da biossíntese do colesterol - melhora a estrutura e a função renal¹⁷. Estatinas podem ter efeitos benéficos sobre a complacência vascular e a função endotelial na DRC, através do aumento na produção de óxido nítrico, da estabilização de placas de colesterol, da redução da oxidação das lipoproteínas, da agregação plaquetária e do depósito de trombos plaquetários⁹.

A efetividade das estatinas em diminuir a progressão da DRC em pacientes com doença inicial ou moderada, no entanto, não tem sido acompanhada de sucesso em diminuir o estresse oxidativo, a inflamação, a deficiência de HDL ou a mortalidade cardiovascular em pacientes com DRC avançada⁶.

Estatinas podem reduzir a proteinúria através de dois mecanismos: diminuição da filtração proteica diretamente no glomérulo¹⁸, e bloqueio da endocitose de proteínas filtradas - através da inibição da prenilação da proteína G¹⁹. Além disso, as estatinas podem diminuir o dano devido à filtração proteica residual por inibir a resposta inflamatória²⁰. Uma vez que a proteinúria está implicada na

progressão da perda de função renal⁹, um efeito benéfico das estatinas na redução daquela poderia dar suporte à hipótese de que as estatinas podem reduzir os riscos de falência renal.

São vários os estudos desenvolvidos sobre o uso de estatinas nos quadros de inflamação e fibrose^{6,18,21-30}, seja através de ensaios clínicos (HPS³¹, CARE³², PREVENT IT³³, Estudo D4³⁴, AURORA³⁵, ALERT^{36,37}, SHARP³⁸), modelos experimentais^{6,21-30} *in vitro* e *in vivo*, revisões sistemáticas⁹ e metanálises¹⁸. Pacientes submetidos a intervenções coronarianas percutâneas parecem se beneficiar do uso de estatinas previamente ao estudo hemodinâmico, na prevenção da nefropatia por contraste²³. Recentemente um grande ensaio clínico demonstrou que a associação de estatina e ezetimibe (um inibidor seletivo da absorção intestinal de colesterol e fitosteróis) diminuiu a incidência de eventos ateroscleróticos em uma ampla gama de pacientes com DRC³⁸.

O estudo dos efeitos das estatinas em modelos experimentais de DRC é atrativo, dada o ótimo desempenho destas drogas na redução do risco cardiovascular em pacientes dislipidêmicos^{6,17,39}, por elas apresentarem efeitos pleotrópicos sobre outros órgãos^{21,22,40,41} e pelas evidências de que elas teriam efeitos “nefroprotetores”^{9,23,24}.

A DRC manifesta-se clinicamente, na maioria das espécies, quando há perda ou comprometimento de 65 a 75% dos néfrons, o que dificulta a elaboração de modelos experimentais capazes de reproduzir a síndrome⁴. Um dos modelos propostos - o modelo de nefrectomia 5/6 ou modelo do rim remanescente¹², melhor caracterizado em ratos Wistar^{42,48} - tem sido amplamente utilizado na análise da progressão da insuficiência renal crônica^{6,12,42,43}; em estudos que procuram correlacionar a uremia e outras alterações metabólicas e funcionais da DRC a seu impacto cardiovascular^{6,7,44}, e em estudos que analisam possíveis efeitos benéficos de drogas com efeitos específicos ou pleotrópicos^{4,8,13,15}.

A redução da massa renal é obtida por infarto ou excisão cirúrgica de ambos os pólos renais esquerdos, acompanhado ou seguido de nefrectomia direita, obtendo-se redução de aproximadamente 75% na taxa de filtração glomerular, bem como níveis altos de creatinina e uréia em relação ao grupo *sham*⁴⁵, levando a progressiva falência renal e desenvolvimento de glomeruloesclerose⁴⁶, o que

possibilita uma série de intervenções experimentais, tanto no pré quanto no pós-operatório.

1.1 OBJETIVO

Analisar os efeitos da estatina pré e pós-operatória na doença renal crônica induzida por nefrectomia 5/6 em ratos Wistar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA RENAL CRÔNICA

Modelos experimentais buscam induzir DRC através de procedimentos exclusivamente cirúrgicos (que fazem uso de nefrectomias parciais em diferentes proporções; mais comumente 4/5 ou 5/6, ou nefrectomias unilaterais), ou fazendo uso de procedimentos combinados, que envolvem acesso cirúrgico seguido de ligaduras (para promover obstrução ureteral - uni ou bilateral, ou “nefrectomia 5/6” por infarto renal), com ou sem nefrectomia contralateral. Em todos os casos, há a opção de escolher entre procedimentos realizados em um só momento ou operações seriadas^{3,12}.

Estes modelos são utilizados para estudar a progressão de DRC em diversas espécies animais, mais comumente ratos, camundongos e coelhos^{3,4,7,8,12,13-15,17}.

Em espécies menores, às dificuldades de cada modelo somam-se limitações impostas pelo tamanho do animal, que interferem com a possibilidade de coleta de amostras seriadas de sangue periférico ou a realização de exames de imagem que comprovem a evolução da doença¹².

Costa *et al.*³ fizeram uso do modelo do rim remanescente (nefrectomia 5/6) em coelhos, através de nefrectomias seriadas (nefrectomia bipolar esquerda, seguida de nefrectomia direita após quatro semanas). Obteve-se progressão para DRC em todos os animais do grupo experimental, comprovada por alterações significativas nas dosagens séricas de uréia, creatinina, sódio e potássio a partir da quarta semana, ou seja, imediatamente após a nefrectomia direita. Alterações ultrassonográficas, no entanto, foram significativas apenas após a 16ª semana, e o uso de cintilografia renal com o ácido dimercaptossuccínico revelou-se incapaz de ser interpretada após a nefrectomia direita.

Por outro lado, o uso de ratos e camundongos possibilita experimentações com um número maior de animais, devido ao menor custo de sua obtenção e manutenção; e apresentam menos complicações infecciosas em relação a espécies maiores^{4,12,45,47}.

A indução de DRC através de nefrectomias 5/6, também denominada “modelo do rim remanescente”, é amplamente utilizada em ratos. É muito útil para análise da progressão de DRC, e apresenta vantagens em relação a modelos similares em outras espécies, especialmente quando são utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*)^{42,48}.

São encontradas diferenças nos efeitos da ablação renal em relação às diferentes linhagens de ratos^{42,48}, e em relação ao sexo do animal^{42,48}.

Fleck *et al.* demonstraram que os sinais histopatológicos de instalação da DRC são mais evidentes e precoces em ratos Wistar que em ratos Sprague-Dawley⁴².

Ratos Wistar Furth não desenvolvem lesão renal mesmo após redução severa da massa renal⁴⁸. Erdely *et al.*⁴⁸ compararam esta linhagem de ratos com a linhagem Sprague-Dawley, em um estudo no qual grupos de controle e de indivíduos submetidos a nefrectomia 5/6 (cirúrgica e por ligadura) foram observados por onze semanas. Seus achados concluíram que a nefroproteção observada em ratos da linhagem Wistar-Furth pode ser atribuída a sua capacidade de regeneração da produção de óxido nítrico na córtex renal, aliada ao fato de apresentarem um número relativamente maior de néfrons em relação aos ratos Sprague-Dawley.

No que concerne ao sexo do animal de experimentação, Lemos *et al.* observaram que a progressão da DRC é acelerada em ratos Wistar machos, em relação às fêmeas da mesma espécie⁴⁹. Já Fleck *et al.*, ao compararem ratos adultos da linhagem Sprague-Dawley com os Wistar, observaram que, após dez semanas de pós-operatório, enquanto os parâmetros funcionais indicaram claramente o desenvolvimento de DRC, as investigações morfológicas mostraram apenas áreas moderadamente fibróticas, túbulos atróficos e infiltração linfocitária, associados a glomeruloesclerose, preferencialmente em ratos Wistar fêmeas⁴².

Dada a variedade de modelos existentes, a escolha do modelo experimental de estudo para a DRC depende basicamente das características clínicas e/ou dos efeitos terapêuticos que se deseja estudar. Desta forma, podemos escolher modelos que desenvolvem DRC mais ou menos rapidamente, modelos que levam ao desenvolvimento de hipertensão arterial, modelos com maior ou menos prevalência de complicações cardiovasculares; podemos ainda fazer uso de ratos ou

camundongos geneticamente modificados que reúnam características fenotípicas de interesse clínico.

Santos *et al.* estudaram o efeito das nefrectomias parciais (1/2 ou nefrectomia direita; 2/3 ou nefrectomia direita e nefrectomia unipolar contralateral; 5/6 ou nefrectomia direita e bipolar esquerda) em ratos Wistar machos, e observaram aumento significativo dos níveis de creatinina nos grupos submetidos a mais que 50% de ablação renal¹². A hipertrofia renal compensatória, bem como o grau de lesão glomerular – expresso por proteinúria e esclerose – foram mais evidentes quanto maior a fração de tecido renal extraída. Este estudo também mostrou satisfatória recuperação funcional do rim remanescente em todos os grupos após oito semanas, o que indica uma janela curta para experimentação em todos os modelos¹².

Kennedy *et al.*, ao replicarem o modelo do rim remanescente em camundongos, interessados no uso destes animais pela plethora de manipulações genéticas disponíveis atualmente para esta espécie, cauterizaram os pólos renais inferior e superior esquerdo, seguido de nefrectomia contralateral em um só tempo, induzindo imediatas hipertensão arterial e alterações no relaxamento ativo e passivo do ventrículo esquerdo⁴⁷.

A nefrectomia 5/6 obtida por ligadura (infarto renal) é caracterizada por altos níveis de renina, como apontado por Kleinknecht *et al.*, enquanto a nefrectomia 5/6 executada de maneira totalmente cirúrgica (excisional) não desenvolve hipertensão e os níveis de renina são normais, além de proporcionar melhor quantificação do grau de ablação renal⁵⁰.

A utilidade de dosagens séricas de uréia e creatinina, bem como o papel da proteinúria na avaliação da progressão de lesão glomerular, em ratos Wistar submetidos a nefrectomia 5/6, foi demonstrada por Santos *et al.*¹².

McMahon *et al.*, ao estudar estrutura e função miocárdica em ratos urêmicos, utilizando o modelo de nefrectomia 5/6 (excisional e não seriada), também demonstraram este aumento nos níveis de uréia e creatinina (em até três vezes o encontrado em ratos *sham*), encontrando, ainda, indícios de hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo, na ausência de hipertensão⁴⁵.

2.2 ESTATINAS

As estatinas são fármacos inibidores seletivos e competitivos da HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a etapa inicial da biossíntese do colesterol^{6,17}. Sua descoberta foi relatada por Endo *et al.* em 1976, que isolaram dois metabólitos fúngicos com ação hipocolesterolêmica, derivados do *Penicillium citrinum* (citado por Mahley *et al.*⁵¹).

Vários tipos de estatinas estão disponíveis para uso clínico como antilipemiantes na atualidade. A primeira a ser aprovada para uso em foi a lovastatina - isolada do fungo *Aspergillus terreus*; as mais comumente utilizadas são a sinvastatina, a atorvastatina, a pravastatina e a rosuvastatina⁵¹. Esta classe de drogas possuem um grupo lateral estruturalmente semelhante à HMG-CoA, que compete com esta, reduzindo a formação de mevolanato, etapa inicial e limitante da síntese de colesterol⁵¹.

Inicialmente utilizadas apenas como hipolipemiantes, inúmeras ações pleiotrópicas das estatinas têm sido descritas. Elas reduzem a ativação da protrombina, reduzindo a coagulação e favorecendo o processo fibrinolítico; e possuem efeitos imunomodulatórios, que estimulam a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e células esplênicas, bem como a resposta proliferativa das últimas^{51,52}.

A ação inibitória das estatinas sobre a prenilação de proteínas específicas como as Rhos e Ras, que pertencem à família das GTPases, enzimas capazes de hidrolizar a guanosina trifosfato (GTP) - que agem via fator nuclear (NF- κ B) - interfere no processo inflamatório, no processo de proliferação celular e na apoptose⁵³. Como em quadros inflamatórios a redução da disponibilidade de óxido nítrico tem sido implicada, e a redução da prenilação da Rho resulta em aumento da atividade da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) – pela via constitutiva, dependente de cálcio - esta é considerada uma provável explicação para a atividade antiinflamatória das estatinas.

Outras ações destes fármacos sobre o metabolismo do óxido nítrico incluem: redução na concentração da calveolina-1 (o que aumenta a afinidade de ligação da eNOS à calmodulina - proteína dependente de cálcio que modula os níveis de

monofosfato cíclico de adenosina-AMPC e monofosfato cíclico de guanosina-GMPC) e regulação negativa da via NF- κ B, estimulando a atividade da eNOS⁵³.

Estudos experimentais sobre os efeitos das estatinas em quadros de inflamação e fibrose foram realizados através de vários modelos, com interesse em diversos órgãos, utilizando-se de uma estatina ou da comparação entre as diversas drogas do grupo.

Moriyama *et al.*, em modelo de fibrose do interstício renal, obtido através de obstrução ureteral unilateral em camundongos, demonstraram que o uso da fluvastatina diminui significativamente o grau de fibrose, em comparação à pravastatina²⁵. Os autores atribuíram este resultado ao efeito antioxidante da fluvastatina.

Em modelo similar, realizado em ratos Wistar, o uso de sinvastatina em duas doses diárias ocasionou significativa redução da fibrose intersticial²⁶.

Estudo realizado por Chade *et al.*, em porcos submetidos à dieta hipercolesterolêmica associada a estenose induzida de artéria renal, com administração oral de sinvastatina, demonstrou que esta diminuiu a fibrose causada por doença renovascular experimental²⁸.

Michli *et al.* observaram, em estudo que envolveu obstrução ureteral unilateral, desta feita em ratos, que a atorvastatina diminuiu os níveis de microalbuminúria e ajudou a preservar os níveis de filtração glomerular, sem alterar níveis séricos de colesterol, sugerindo uma função renoprotetora pleiotrópica destas drogas²⁷.

Haydont *et al.* estudaram o uso de estatinas *in vitro* (utilizando cultura de tecidos humanos e experimentação em ratos) concluindo que a pravastatina tem ação sobre a fibrose intestinal induzida por radiação²⁹.

Estatinas também reduziram a fibrose induzida por isquemia miocárdica em ratos, como demonstrado por Abe *et al.*, que estudaram a contratilidade miocárdica em ratos submetidos a ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda³⁰.

Hartner *et al.* examinaram os efeitos da fluvastatina sobre o desenvolvimento de DRC na hipertensão experimental induzida por dieta rica em sal e acetato desoxicorticosterona (DOCA), em ratos Sprague-Dawley submetidos a nefrectomia unilateral⁵⁴. Os efeitos relatados incluíram ausência de hipertensão nos ratos

tratados com fluvastatina, bem como baixa mortalidade, proteinúria, proliferação glomerular, infiltração macrófagica, glomeruloesclerose, dano podocitário e expressão de osteopoetina glomerular podocitária. Por outro lado, fibrose, inflamação e proliferação celular intersticiais não foram afetados pela fluvastatina⁵⁴.

Tendo em vista o uso cada vez mais freqüente das estatinas em pacientes hipercolesterolêmicos, o conhecimento científico a respeito desta classe de fármacos tem se expandido enormemente na literatura científica. As evidências clínicas disponíveis indicam que as estatinas reduzem o risco cardiovascular em pacientes portadores de DRC, e que estas drogas podem apresentar efeitos renoprotetores⁹.

Em pacientes portadores de DRC leve a moderada, destacam-se dois estudos, o HPS (*Heart Protection Study*)³¹ e o CARE (*Cholesterol And Recurrent Events*)³². Em análises *post-hoc*, evidenciou-se que esta população específica beneficia-se do uso de estatinas na mesma proporção que na população geral, reduzindo em torno de 30% o risco relativo de eventos cardiovasculares. No primeiro³¹, a diminuição do risco absoluto foi de 11%, com um número necessário a ser tratado (NNT) de 9.

O estudo PREVEND IT (*Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease Intervention Trial*), desenhado especificamente para estudar os efeitos do uso de estatinas em estágios iniciais de DRC, avaliou 1439 pacientes portadores de microalbuminúria, randomizados para receber pravastatina 40 mg/dia ou placebo, sem demonstrar algum benefício significativo da intervenção³³.

Em pacientes dialíticos, estudos observacionais registraram redução do risco relativo em torno de 30%, equivalente à encontrada na população geral⁹, observação que discorda do observado no único ensaio clínico randomizado especificamente desenhado para pacientes dialíticos, o Estudo 4D³⁴. Neste, 1.200 pacientes dialíticos, portadores de diabetes mellitus tipo 2, receberam atorvastatina 20 mg/dia ou placebo por quatro anos, com redução do risco relativo de eventos combinados de apenas de 8%, sem significância estatística.

Strippoli *et al.*, em grande metanálise⁵⁵ que incluiu o estudo 4D, afirmaram que o benefício da intervenção nos pacientes dialíticos é similar ao encontrado em fases mais precoces da IRC (RRR em torno de 15% para eventos cardiovasculares e para mortalidade cardiovascular).

O estudo AURORA (*A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Hemodialysis: an Assessment of Survival and Cardiovascular Events*)³⁵ avaliou o efeito da rosuvastatina 10 mg/dia em mais de 2700 pacientes dialíticos, demonstrando que, apesar da droga diminuir os níveis de LDL, não houve efeito significativo sobre a mortalidade por causas cardiovasculares, sobre infarto agudo do miocárdio não-fatal ou sobre acidentes vasculares cerebrais não-fatais.

O estudo ALERT (*Assessment of Lescol in Renal Transplantation*)^{35,36}, por sua vez, avaliou o efeito da fluvastatina (40 e 80 mg/dia) em 2102 pacientes receptores de transplantes renais, seguidos por até seis anos. Observou-se que a fluvastatina melhorou significativamente os valores da dosagem sérica de lipídeos nesta amostra, sem, contudo apresentar algum efeito sobre a perda do enxerto ou sobre níveis séricos de creatinina³⁶.

Wiesbauer *et al.*, entretanto, observaram que o uso de estatinas em receptores de transplante renal foi associado com aumento na sobrevida dos pacientes, ainda que nenhuma diferença na sobrevida do enxerto tenha sido detectada²⁴.

Baigent *et al.*³⁸ publicaram os resultados do estudo SHARP (*Study of Heart and Renal Protection*) em 2011. Este ensaio clínico randomizado e duplo-cego incluiu 9270 pacientes com DRC (3023 dialíticos, 6247 não-dialíticos) sem história prévia de infarto do miocárdio ou revascularização coronariana, submetidos a sinvastatina 20 mg/dia e ezetimibe 10 mg/dia *versus* placebo. Concluíram que a redução do LDL-colesterol diminuiu com segurança a incidência de eventos ateroscleróticos maiores em uma ampla variedade de pacientes com DRC.

O emprego de estatinas na prevenção da DRC é menos estudado. Patti *et al.* descreveram, em 2008, o uso de estatinas previamente ao estudo hemodinâmico, em pacientes submetidos a intervenções coronarianas percutâneas, observando a diminuição da incidência de nefropatia induzida por contraste em pacientes saudáveis, conferindo a estes melhor sobrevida livre de eventos a longo prazo²³.

Douglas *et al.*, através de metanálise¹⁸, analisaram quinze estudos clínicos envolvendo 1384 pacientes, seguidos por 24 semanas em média. A redução proporcional na proteinúria mostrou que as estatinas diminuíram a albuminúria (onze estudos) e a proteinúria (quatro estudos) em treze dos quinze trabalhos. Concluíram, contudo, que, tendo em vista as características das coortes estudadas, a análise da

redução da DRC e de eventos cardiovasculares deve ser confirmada por estudos mais abrangentes.

Pelos resultados apresentados nos artigos pesquisados, o estudo dos efeitos pleiotrópicos das estatinas, em especial de seus possíveis efeitos renoprotetores, nos parece promissor, e nos levaram a estudar os efeitos destas drogas na DRC induzida em ratos Wistar.

3 MÉTODO

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

3.2 AMOSTRA ESTUDADA

Foram utilizados 40 ratos adultos, machos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, submetidos a nefrectomia 5/6, com ou sem terapêutica medicamentosa. Após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde está registrado sob o Nº 572-1ºV (Anexo 1), os ratos foram submetidos ao experimento seguindo as normativas da Lei Nº 1.794, de Oito de Outubro de 2008.

3.3 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo todos os animais da amostra estudada.

Para fins de análise estatística, foram utilizados os dados dos ratos que sobreviveram à nefrectomia 5/6 e suportaram trinta dias de experimentação e observação clínica.

3.5. EXPERIMENTO

Foram estudados quarenta ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, machos, com peso entre 200 e 270g e idade entre 110 e 180 dias.

Os ratos foram mantidos no Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná durante o período do experimento, sob condições padrão – temperatura entre 20 e 24°C, umidade relativa do ar entre 50 e 60%, controle de luminosidade (ciclos diários de 12 horas dia/noite, das oito às 20 horas), sendo ofertados: alimentação-padrão para a espécie e água *ad libitum*. Nas doze horas que precederam o procedimento cirúrgico, nada foi ofertado via oral exceto água.

Os animais de experimentação foram randomizados em três grupos (Quadro 1) ao início do experimento e todos submetidos a nefrectomia 5/6 para induzir doença renal crônica. A eutanásia para os três grupos foi realizada no trigésimo dia de pós-operatório, após a coleta do rim remanescente para análise histopatológica.

Grupos	n	Uso de estatina pré-operatória	Nefrectomia 5/6	Uso de estatina pós-operatória
1	15	10 dias	Sim	15 dias
2	15	Não	Sim	15 dias
3	10	Não	Sim	Não

Quadro 1 – Grupos de experimentação

Foram selecionados 15 ratos, de maneira aleatória, para receber estatina 0,2 mg/ml (Cravo & Canela[®] Farmácia de Manipulação Ltda., Curitiba, Paraná) pelo método de gavagem (através de cateter orogástrico metálico) no período pré-operatório, em doses de 2mg/kg/dia, durante 10 dias (Grupo 1). Nos animais deste Grupo foi realizada coleta de sangue para dosagem de uréia e creatinina através de coleta de sangue periférico caudal (Figura 1), preferencialmente, ou por punção

cardíaca (quando não se obtinha amostra suficiente em sangue periférico), no dia de início do tratamento, previamente à terapia farmacológica.

As dosagens séricas de uréia e creatinina foram realizadas por método colorimétrico em laboratório especializado (Laboratório Bionostic® Análises Laboratoriais Ltda., Curitiba, Paraná). Foi realizada coleta de urina através de punção vesical percutânea no dia de início do tratamento, previamente à terapia farmacológica, para avaliação quantitativa de proteinúria em kit específico (ChoiceLine10 Urinalysis, da marca Roche®).

O procedimento cirúrgico de ablação renal (nephrectomia 5/6) foi padronizado em estudo-piloto, e seguiu o mesmo protocolo nos três grupos de estudo. Os ratos eram transportados (do Biotério Central para o laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental) em suas próprias gaiolas, por funcionário especializado, e mantidos em ambiente cujas qualidades físicas eram similares às de origem.



Figura 1 – Coleta de amostras de sangue: coleta de sangue periférico caudal.

Para realização deste procedimento, os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular da associação de cloridrato de ketamina (50mg/kg) e xilasina (10mg/kg) na região glútea dos mesmos. Após anestesia, foi feita tricotomia abdominal (Figura 2a) e dorsal para permitir melhor acesso à cavidade abdominal e o uso de eletrocautério.

Uma vez fixados os animais à mesa operatória, em decúbito dorsal (Figura 2b e 2c), foi executada antissepsia da região operatória com álcool a 70% e colocação

de campos cirúrgicos. Os cuidados per-operatórios incluíram a manutenção postural da permeabilidade de vias aéreas (através de protrusão lingual, Figura 2d), a prevenção da hipotermia, a prevenção de sangramentos através de hemostasia rigorosa dos tecidos manipulados e a analgesia intraperitoneal ao final do procedimento cirúrgico.

Todos os animais foram submetidos a nefrectomia 5/6 através de incisão mediana xifopubiana (Figura 3). Após abertura da cavidade peritoneal, promoveu-se o afastamento das vísceras para localização do rim direito, que era então dissecado (Figura 4) até se obter segurança na identificação do ureter e dos elementos do hilo renal. Após ligadura em bloco destes elementos com fio monofilamentar de nylon 4-0, realizava-se nefrectomia direita. Observamos que ocasionalmente o polo renal superior direito encontrava-se aderido ao fígado. O espécime cirúrgico da nefrectomia direita não sofreu análise anatomopatológica.

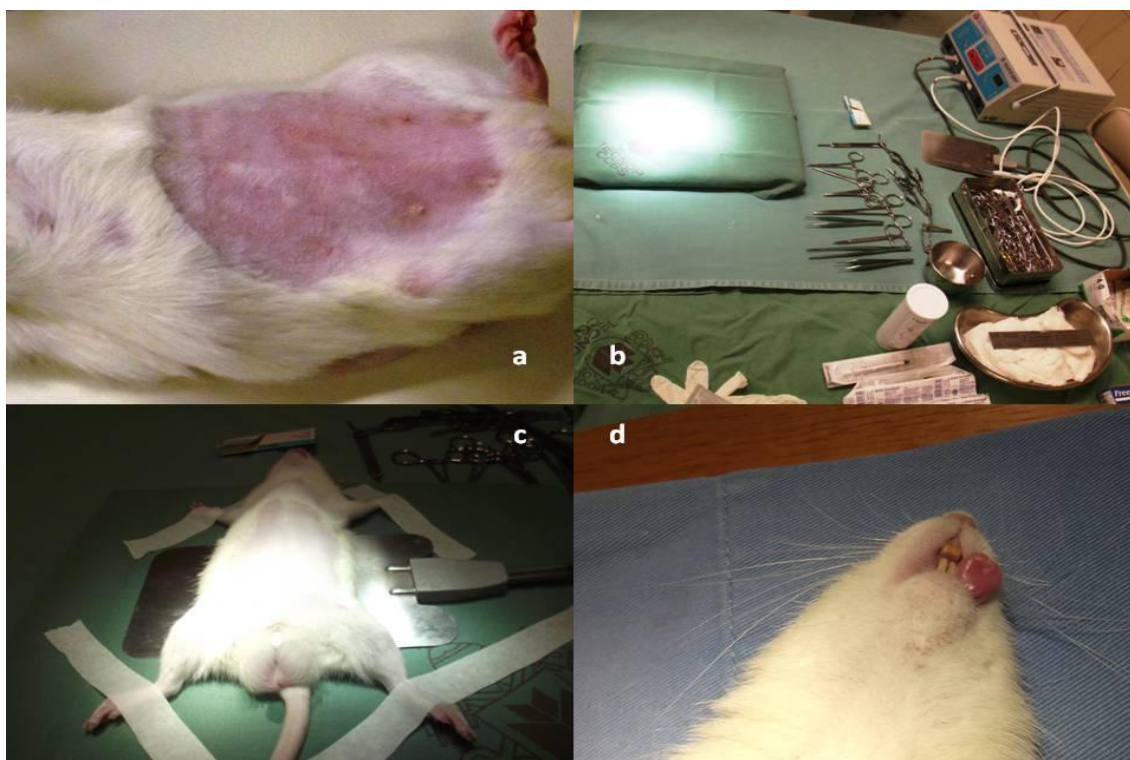


Figura 2 – Cuidados per-operatórios: a) tricotomia abdominal; b) mesa cirúrgica; c) posição na mesa cirúrgica; d) cuidado com vias aéreas.

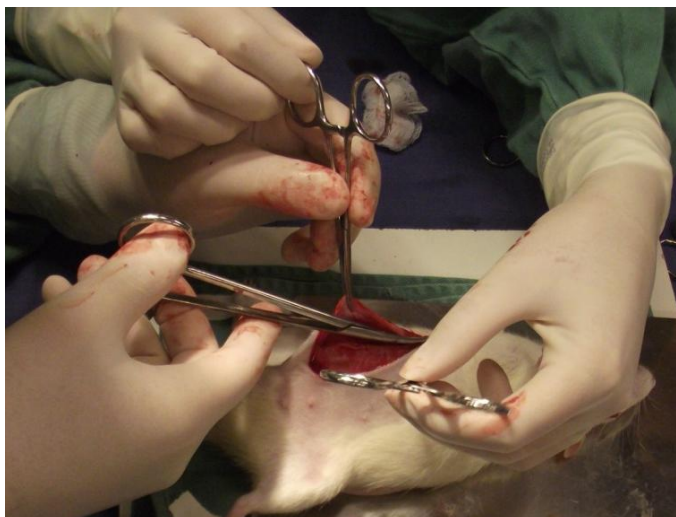


Figura 3 - Incisão mediana xifopubiana.



Figura 3 - Dissecção do rim direito. Hilo renal clampeado.

Mais uma vez afastadas as vísceras, desta feita para permitir a visualização do rim esquerdo, os polos renais eram dissecados – primeiro o inferior, tomando-se especial cuidado com o ureter (Figura 5), depois o superior, promovendo mínima tração do hilo renal homolateral (Figura 6) – e posteriormente clampeados com pinça de Bakey delicada (Figura 7), de modo a permitir ressecções polares, para a qual se fez uso de bisturi frio para o corte e eletrocautério para hemostasia.

Após revisão da cavidade peritoneal, procedemos ao fechamento da parede abdominal em dois planos, com sutura contínua de fio de nylon monofilamentar 4-0 nos planos musculares e sutura em pontos simples do mesmo fio.

A analgesia pós-operatória imediata foi realizada com antiinflamatório não esteróide (Carprofen 2-5 mg/ml, solução injetável esterilizada da Pfizer® Animal Health). Para analgesia no primeiro e segundo dia de pós-operatório foi utilizada solução de dipirona sódica 0,5g/ml, na dose de 8mg/kg, administrada por gavagem.

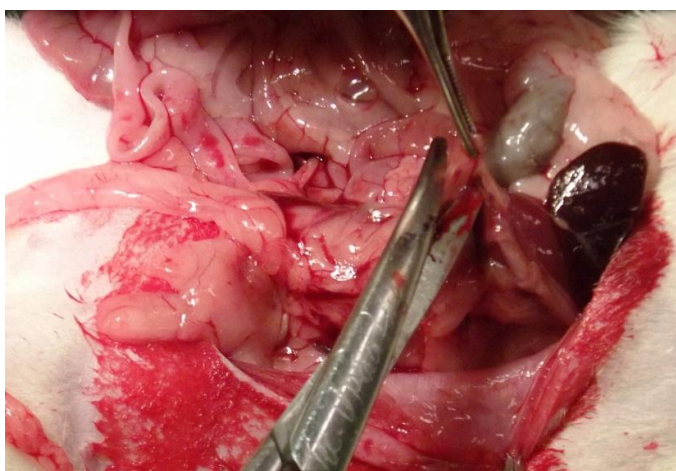


Figura 4 - Dissecção do pólo inferior do rim esquerdo.

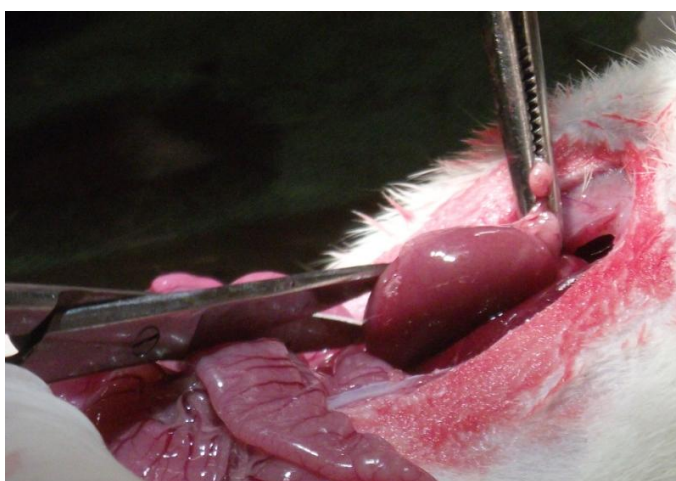


Figura 5 - Dissecção do pólo superior do rim esquerdo.

O retorno dos animais às suas gaiolas era realizado imediatamente após o término do procedimento, mantendo-se cuidados específicos para se evitar hipotermia; o retorno ao Biotério Central só ocorria após os animais estarem recuperados do ato anestésico, com sinais vitais e reflexos normais.

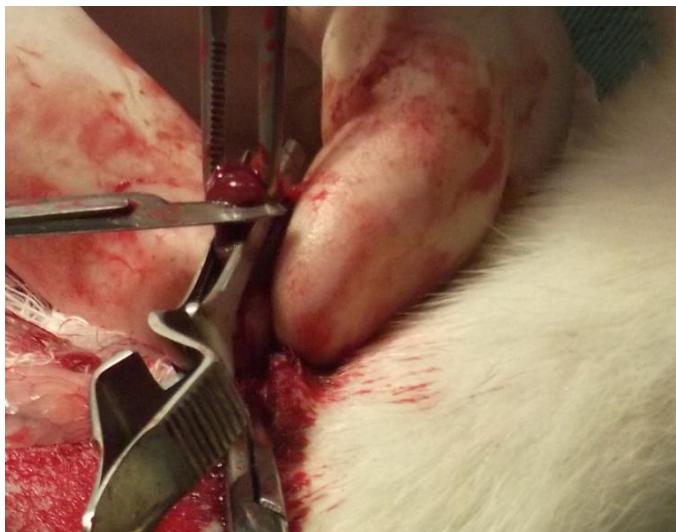


Figura 6 - – Nefrectomia polar superior esquerda.

A administração de estatina para o Grupo 2 foi realizada de maneira idêntica à do Grupo 1, na mesma dose, também através de gavagem.

A análise do desenvolvimento de DRC para os três grupos foi idêntica, constituída por três coletas seriadas de sangue e urina: no pré-operatório, no décimo dia de pós-operatório e no trigésimo dia de pós-operatório (exceção feita ao grupo 1, que foi submetido a coleta das mesmas amostras também no dia de início da medicação pré-operatória).

As coletas de sangue para dosagem de uréia e creatinina através de punção intracardíaca ou coleta de sangue periférico foram realizadas pelo menos quarenta e oito horas antes do procedimento cirúrgico. As dosagens séricas de uréia e creatinina foram realizadas por método colorimétrico em laboratório especializado (Laboratório Bionostic® Análises Laboratoriais Ltda., Curitiba, Paraná). Coleta de urina foi realizada através de punção vesical per-operatória (Figura 8), no momento da operação, para avaliação quantitativa de proteinúria em kit específico (ChoiceLine10 Urinalysis, da marca Roche®).



Figura 7 – Punção vesical per-operatória.

As coletas do décimo dia de pós-operatório foram realizadas no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental observando-se os mesmos cuidados pré e per-operatórios (jejum de doze horas para sólidos, transporte na própria gaiola por funcionário especializado, prevenção da hipotermia, manutenção da permeabilidade de vias aéreas durante o procedimento, analgesia per e pós-operatória, retorno à gaiola imediatamente após a coleta, para conforto do animal, e transporte de volta para o Biotério Central apenas depois de bem acordados) e o mesmo protocolo de anestesia.

As coletas do trigésimo dia de pós-operatório foram realizadas no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, imediatamente antes do procedimento cirúrgico de exeresse ex-vivo dos rins remanescentes, obedecendo-se os mesmos cuidados e protocolos.

A eutanásia dos animais foi realizada imediatamente após o procedimento, observando-se os preceitos éticos estabelecidos, fazendo-se uso de 148mg/kg de ketamina (DL₅₀).

Os rins remanescentes foram preservados em uma solução de formaldeído a 10% e enviados para análise histopatológica.

3.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os rins foram retirados ex-vivo, sob anestesia geral, após a coleta dos exames do trigésimo dia de pós-operatório, e preservados em formaldeído 10%. A seguir foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo Leica cm 1850. As colorações realizadas foram Hematoxilina-Eosina (HE); Tricômio de Gomori (TG) e Ácido-Periódico-Schiff (PAS).

Para análise das alterações anatomopatológicas foram utilizados quatro índices padronizados⁵⁶ para avaliação de doença renal aguda e crônica em modelos experimentais de DRC: o Índice de Glomeruloesclerose (IG), o Índice de Mesangiólise (IM), o Índice de Lesão Túbulo-Intersticial (ILTI) e o Índice de Lesão Vascular (ILV).

O IG avaliou o acúmulo de matriz mesangial e a esclerose do tufo glomerular através de um índice de pontuação que varia de 0 a 4, e foi determinado em seções de parafina coradas com HE, TG e PAS⁵⁷.

O IM avalia a presença de mesangiólise, definida como dissolução ou atenuação da matriz mesangial e degeneração de células mesangiais, através de um índice semiquantitativo, determinado em seções de parafina coradas com HE, TG e PAS, onde foram avaliadas sub-amostras de 100 glomérulos por animal, obtendo-se resultados de 0 a 4⁵⁸.

As alterações túbulo-intersticiais, definidas como dilatação tubular, hipotrofia tubular, inflamação peritubular, atrofia tubular, fibrose intersticial, e dano vascular (espessamento e necrose da parede dos vasos regionais), foram acessadas em seções de parafina similares às anteriores, usando outro índice semiquantitativo – ILTI - modificado a partir do proposto por Veniant *et al.*⁵⁹, que variou de 0 a 5, após análise de 10 campos para cada animal. – ver Quadro 2. O ILTI foi descrito⁵⁹ utilizando-se de 5 entradas (0 a 4), mas optamos por propor a inclusão de mais uma entrada (Entrada 1 – lesões em até 10% da área estudada), para obtermos um maior refinamento da análise; e foi incluída entre a Entrada 0 original (“estrutura túbulo-intersticial normal”) e a Entrada 1 original (“Lesões envolvendo entre 10 e 25% da área”).

O índice de lesão vascular (ILV) foi utilizado para avaliação de vasos interlobulares e pequenas artérias, e variou de 0 a 4, conforme proposto por Jung et al.⁵⁶ - ver Quadro 2.

ÍNDICE	Índice de Glomeruloesclerose (IG)	Índice de Mesangiólise (IM)	Índice de Lesão Túbulo-Intersticial (LTI)	Índice de Lesão Vascular (ILV).
0	Sem glomeruloesclerose	Sem alterações capilares	Estrutura túbulo-intersticial normal	Sem espessamento de parede vascular
1	Expansão mesangial ou glomeruloesclerose até 25%	Dilatação capilar e/ou 25% dos capilares convolutos (CC)	Lesões túbulo-intersticiais (LTI) envolvendo até 10% da área	Espessamento leve da parede vascular
2	Glomeruloesclerose de 25-50%	Dilatação capilar e/ou 25% dos capilares convolutos (CC) ou aneurismas capilares (AC), 50% de CC	LTI envolvendo entre 10 e 25% da área	Espessamento moderado da parede vascular
3	Glomeruloesclerose em 50-75% e/ou fibrose e/ou proliferação segmentar extracapilar	AC em 50-75% dos CC	LTI envolvendo 25-50% da área	Espessamento severo da parede vascular
4	Glomeruloesclerose em 50-75% ou fibrose segmentar extracapilar	AC > 75% dos CC	LTI envolvendo 50-75% da área	Necrose fibrinoide da parede vascular
5	-	-	LTI subtotais	-

Quadro 2 – Índices para avaliação histopatológica.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram tabulados em software MS Excel® 2007 e depois transportados para análise estatística no software SPSS® 13.0 para Windows.

A estatística descritiva dos dados foi expressa por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões, ou ainda por frequências e percentuais, quando apropriado.

A normalidade da amostra foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, uma vez que, após a exclusão dos indivíduos que foram a óbito, obteve-se um número de indivíduos na amostra (n) de 34.

Para comparação de variáveis quantitativas nos três momentos de avaliação, foi considerado o teste não paramétrico de Friedman. Para comparação deste tipo de variável, em dois momentos de avaliação, foi considerado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Para comparação dos grupos avaliados, em relação à variação percentual entre dois momentos, foi considerado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de p menores do que 0,05 indicaram significância estatística.

Para avaliação dos resultados histopatológicos, quando cabível, foi utilizado o teste exato de Fischer, correção de Bonferroni.

Os momentos de avaliação das variáveis de interesse foram: no dia de início da terapêutica clínica pré-operatória (apenas para o Grupo 1), no pré-operatório (48 horas antes da cirurgia), dez e trinta dias após a nefrectomia 5/6.

4 RESULTADOS

Dos quarenta ratos estudados, trinta e quatro sobreviveram ao procedimento operatório e lograram chegar ao término do período de observação (Quadro 3). Os resultados deste grupo foram submetidos a análise estatística.

Cinco ratos foram a óbito antes do término do experimento; um no período per-operatório (óbito por hemorragia em veia cava inferior, por soltura da ligadura), quatro no período pós-operatório imediato (óbitos por causas indeterminadas no segundo ou terceiro dia de pós-operatório). Em um rato, houve desenvolvimento de um tumor de crescimento rápido, não identificado, na articulação proximal do membro anterior esquerdo, no período pré-operatório. Este rato foi sacrificado, através de eutanásia idêntica à realizada no restante dos indivíduos do experimento.

A mortalidade geral foi de 15%. A morbidade estimada foi de 10%, e incluiu sangramentos durante a nefrectomia direita (dois casos), em veia cava inferior (dois casos), lesão acidental de alça intestinal (um caso) e desenvolvimento de hérnia incisional (em um caso, Figura 9).

Grupos	<i>Uso de estatina pré-operatória</i>	<i>Nefrectomia 5/6</i>	<i>Uso de estatina pós-operatória</i>	<i>n</i>
1	10 dias	Sim	15 dias	14
2	Não	Sim	15 dias	12
3	Não	Sim	Não	8

Quadro 3 – Grupos de experimentação. Ratos sobreviventes ao final do experimento.

Aderências entre alças intestinais, fígado, baço e pâncreas aos pólos renais anteriormente ressecados foram achados comuns na exerece ex-vivo dos rins remanescentes (Figura 10). O aspecto macroscópico dos rins remanescentes nos indivíduos do Grupo 2 era maior e mais arredondado (Figura 11).



Figura 8 – Complicação pós-operatória: hérnia incisional.

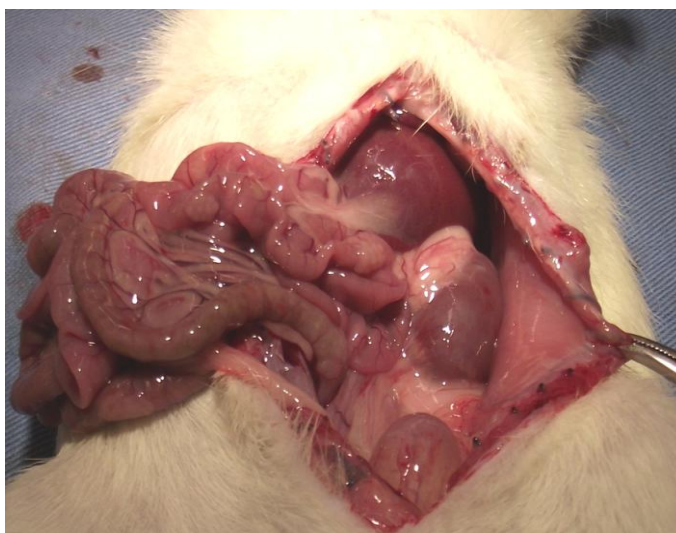


Figura 9 – Aspecto do rim remanescente: trigésimo dia de pós-operatório da nefrectomia bipolar esquerda (Grupo 1).



Figura 10 – Aspecto do rim remanescente: trigésimo dia de pós-operatório da nefrectomia bipolar esquerda (Grupo 2).

4.1 COMPARAÇÃO DOS MOMENTOS DE AVALIAÇÃO EM CADA UM DOS GRUPOS

Para cada uma das variáveis, em cada grupo, foi verificada a hipótese nula de resultados iguais em todos os momentos de avaliação versus a hipótese alternativa de pelo menos um momento de avaliação com resultados diferentes dos demais. No caso de rejeição da hipótese nula, os momentos foram comparados dois a dois testando-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois momentos sob comparação versus a hipótese alternativa de resultados diferentes.

Nos itens subseqüentes são apresentados os resultados associados a cada uma das variáveis. Para cada uma das variáveis avaliadas são apresentadas as estatísticas descritivas dos resultados obtidos no estudo, bem como o valor de p do teste estatístico, associado à comparação dos três momentos. No caso de rejeição da hipótese de igualdade destes três momentos, são apresentados os valores de p das comparações dos momentos dois a dois. Na seqüência do grupo de tabelas para cada variável é apresentada a representação gráfica dos resultados estatisticamente significativos obtidos (Tabelas 1 a 6, Figuras 12 a 14).

Tabela 1 – Comparação de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 1.

Variável	Grupo	Momento	n	Média	1º Q	Mediana	3º Q	Mín	Máx	σ	Valor de p^*
UREIA	1	Cirurgia	14	41,7	36,2	40,3	43,6	28,6	75,3	0,9	0,001
		10º dia	14	67,2	55,7	63,8	69,0	46,4	128,0	20,3	
		30º dia	14	78,7	72,5	77,0	81,6	63,3	119,7	13,8	
	2	Cirurgia	12	37,5	31,0	37,3	42,7	29,7	49,6	6,4	0,001
		10º dia	12	70,2	65,2	70,7	75,3	52,8	92,7	10,2	
		30º dia	12	65,7	60,6	66,8	70,6	54,3	76,3	6,7	
	3	Cirurgia	8	41,4	37,3	41,1	46,5	31,5	51,0	6,7	0,001
		10º dia	8	93,1	80,9	83,8	93,2	76,0	149,2	24,2	
		30º dia	8	101,3	87,2	97,5	118,4	77,0	125,4	18,3	

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

Tabela 2 – Comparação de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 2.

Valor de p^*						
Variável	Grupo	Momento	n	Cirurgia x 10º dia	Cirurgia x 30º dia	10º dia x 30º dia
UREIA	1	Cirurgia	14	<0,001	<0,001	0,080
		10º dia	14			
		30º dia	14			
	2	Cirurgia	12	<0,001	<0,001	0,218
		10º dia	12			
		30º dia	12			
	3	Cirurgia	8	<0,001	<0,001	0,049
		10º dia	8			
		30º dia	8			

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

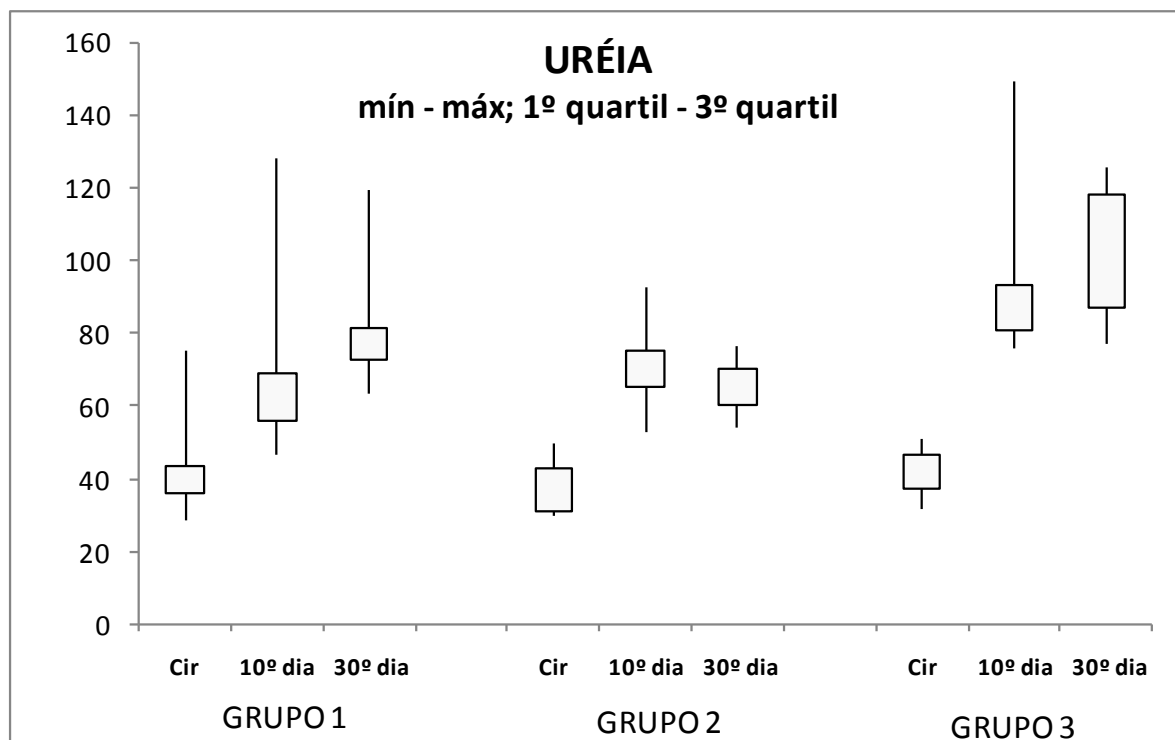


Figura 11 – Gráfico de caixa para variável uréia.

Tabela 3 – Comparação de dosagens séricas de creatinina em momentos diversos, parte 1.

Variável	Grupo	Momento	n	Média	1º Q	Mediana	3º Q	Mín.	Máx.	σ	Valor de p^*
CREATININA	1	Cirurgia	14	0,6	0,3	0,5	0,7	0,2	1,2	0,3	0,001
		10º dia	14	1,0	0,9	1,0	1,0	0,7	1,8	0,2	
		30º dia	14	1,0	0,8	0,9	0,9	0,7	2,6	0,5	
	2	Cirurgia	12	0,5	0,4	0,5	0,5	0,3	0,7	0,1	0,001
		10º dia	12	0,8	0,8	0,9	0,9	0,3	1,0	0,2	
		30º dia	12	0,9	0,9	0,9	1,0	0,6	1,0	0,1	
	3	Cirurgia	8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,7	0,1	0,001
		10º dia	8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,8	0,1	
		30º dia	8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,6	0,9	0,1	

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

Tabela 4 – Comparação de dosagens séricas de creatinina em momentos diversos, parte 2.

Valor de p						
Variável	Grupo	Momento	n	Cirurgia x 10º dia	Cirurgia x 30º dia	10º dia x 30º dia
CREATININA	1	Cirurgia	14	<0,001	0,001	0,066
		10º dia	14			
		30º dia	14			
	2	Cirurgia	12	<0,001	<0,001	0,070
		10º dia	12			
		30º dia	12			
	3	Cirurgia	8	0,001	<0,001	0,195
		10º dia	8			
		30º dia	8			

(*) Teste não paramétrica de Friedman; p<0,05

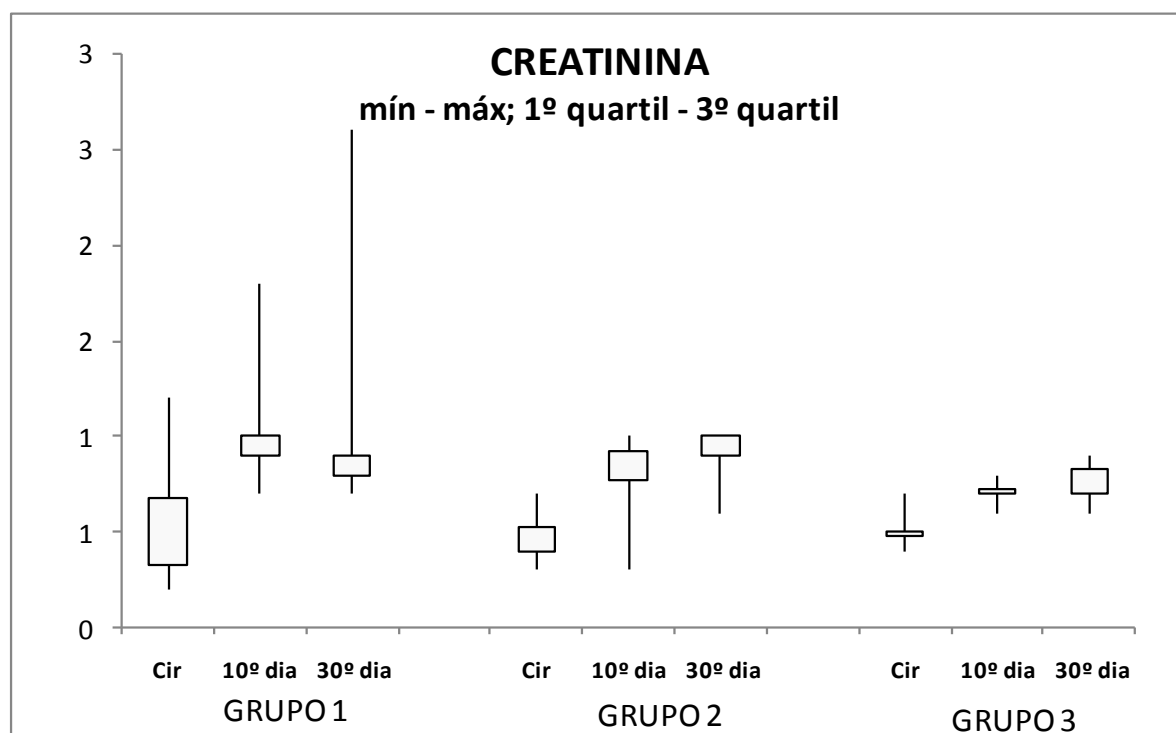


Figura 12 – Gráfico de caixa para variável creatinina.

Tabela 5 – Comparação de dosagens de proteinúria em momentos diversos, parte 1.

<i>Variável</i>	<i>Grupo</i>	<i>Momento</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>1º Q</i>	<i>Mediana</i>	<i>3º Q</i>	<i>Mín.</i>	<i>Máx.</i>	<i>σ</i>	<i>Valor de p*</i>
PROTEINÚRIA	1	Cirurgia	14	265,7	47,5	100,0	300,0	30,0	1000,0	329,9	0,010
		10º dia	14	216,4	100,0	100,0	300,0	30,0	1000,0	245,8	
		30º dia	14	136,4	30,0	30,0	100,0	15,0	1000,0	259,5	
	2	Cirurgia	12	105,0	100,0	100,0	100,0	30,0	300,0	67,1	0,002
		10º dia	12	301,3	250,0	300,0	300,0	15,0	1000,0	243,3	
		30º dia	12	85,0	30,0	100,0	100,0	15,0	300,0	77,7	
	3	Cirurgia	8	157,5	15,0	22,5	77,5	15,0	1000,0	341,9	0,025
		10º dia	8	557,5	82,5	650,0	1000,0	30,0	1000,0	480,4	
		30º dia	8	650,0	300,0	650,0	1000,0	300,0	1000,0	374,2	

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

Tabela 6 – Comparação de dosagens de proteinúria em momentos diversos, parte 2

Valor de p						
<i>Variável</i>	<i>Grupo</i>	<i>Momento</i>	<i>n</i>	<i>Cir x 10º d</i>	<i>Cir x 30º d</i>	<i>10º d x 30º d</i>
PROTEINÚRIA	1	Cirurgia	14	1,000	0,005	0,005
		10º dia	14			
		30º dia	14			
	2	Cirurgia	12	<0,001	0,545	<0,001
		10º dia	12			
		30º dia	12			
	3	Cirurgia	8	0,044	0,004	0,254
		10º dia	8			
		30º dia	8			

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

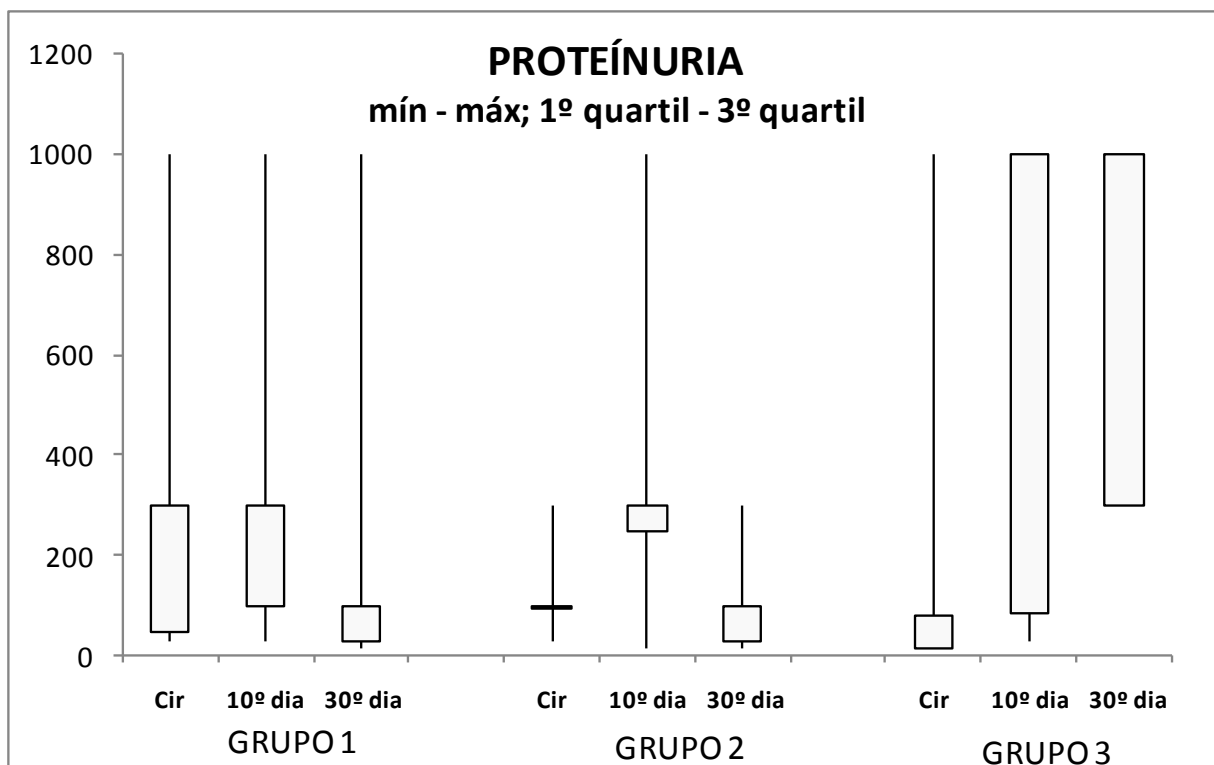


Figura 13 – Gráfico de caixa para variável proteinúria.

4.2 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO ÀS VARIAÇÕES PERCENTUAIS

Para cada variável, foi verificada a hipótese nula de igualdade dos três grupos em relação à variação percentual nos dois momentos avaliados versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com variação percentual diferente dos demais. No caso de rejeição da hipótese nula, os grupos foram comparados dois a dois.

Nos itens subsequentes são apresentados os resultados associados a cada uma das variáveis. Para cada uma das variáveis avaliadas são apresentadas as estatísticas descritivas dos resultados obtidos no estudo, bem como o valor de p do teste estatístico, associado à comparação dos três grupos. No caso de rejeição da hipótese de igualdade destes três grupos, são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois. Na sequência do grupo de tabelas para cada

variável é apresentada a representação gráfica dos resultados estatisticamente significativos que obtivemos (Tabelas 7 a 11, Figuras 15 a 17).

Tabela 7 – Comparação da variação percentual de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 1.

<i>Variável</i>	<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>1º Q</i>	<i>Mediana</i>	<i>3ºQ</i>	<i>Mín.</i>	<i>Máx.</i>	<i>σ</i>	<i>Valor de p*</i>
Ureia 10º	1	14	70,2%	38,9%	59,5%	93,2%	18,9%	249,7%	4,9%	0,056
dia -	2	12	93,3%	52,0%	86,6%	102,5%	42,1%	212,1%	51,2%	
cirurgia	3	8	127,8%	91,2%	118,8%	144,5%	64,9%	247,0%	58,2%	
Ureia 30º	1	14	21,2%	3,5%	20,2%	29,7%	-6,5%	66,8%	21,3%	0,005
dia – 10º	2	12	-5,2%	-	-5,3%	3,2%	-	14,9%	12,7%	
dia	3	8	11,4%	12,3%	-1,2%	8,2%	22,8%	-	41,0%	
							16,0%		20,2%	
Ureia 30º	1	14	98,2%	75,7%	87,5%	113,5%	-3,2%	227,0%	53,7%	0,052
dia -	2	12	79,4%	53,4%	74,8%	101,5%	38,4%	148,8%	33,6%	
cirurgia	3	8	151,9%	91,3%	144,0%	212,0%	78,5%	236,9%	68,4%	

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

Tabela 8 – Comparação da variação percentual de dosagens séricas de uréia em momentos diversos, parte 2.

<i>Variável</i>	<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Valor de p*</i>		
			Gr1xGr2	Gr1xGr3	Gr2xGr3
Ureia 10º dia – cirurgia	1	14	---	---	---
	2	12			
	3	8			
Ureia 30º dia – 10º dia	1	14	0,001	0,299	0,035
	2	12			
	3	8			
Ureia 30º dia – cirurgia	1	14	---	---	---
	2	12			
	3	8			

(*) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

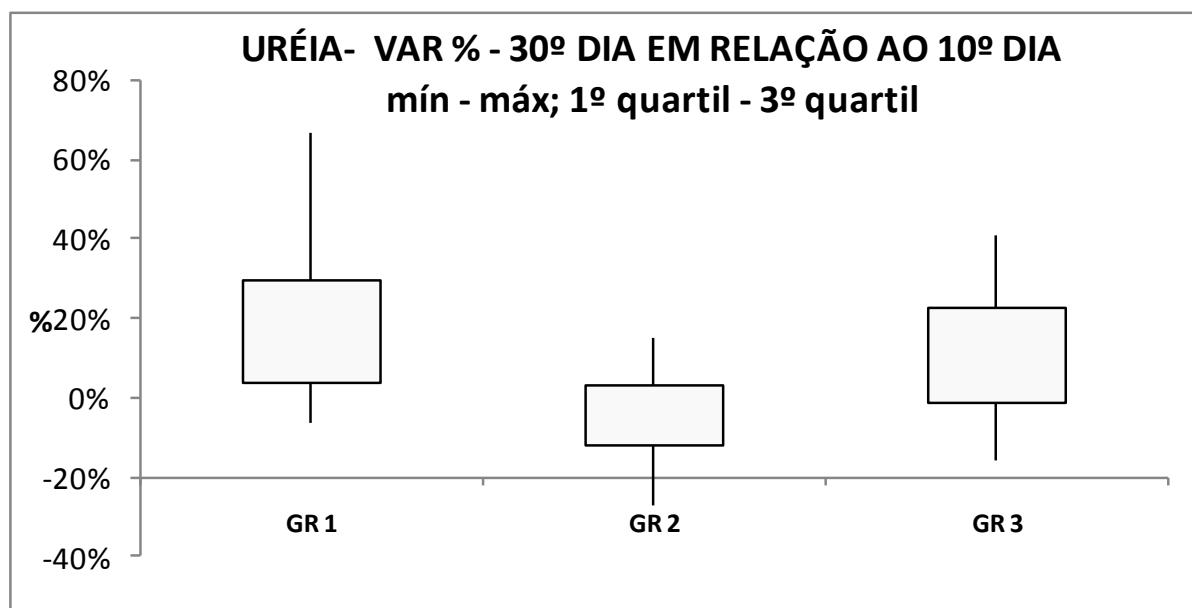


Figura 14 – Gráfico de caixa para variável uréia: comparação da variação percentual de dosagens séricas entre os grupos, trigésimo dia em relação ao décimo dia.

Tabela 9 – Comparação da variação percentual de dosagens séricas de creatinina em momentos diversos.

Variável	Grupo	n	Média	1º Q	Mediana	3ºQ	Mínimo	Máximo	σ	Valor de p*
Creatinina	1	14	134,5%	31,4%	73,3%	253,3%	-16,7%	350,0%	131,2%	0,491
10º dia –	2	12	74,9%	40,0%	65,0%	106,3%	0,0%	150,0%	50,5%	
cirurgia	3	8	47,0%	40,0%	50,0%	63,8%	-14,3%	75,0%	28,8%	
Creatinina	1	14	-5,8%	-20,0%	-10,0%	0,0%	-27,3%	44,4%	18,5%	0,082
30º dia – 10º	2	12	23,3%	-2,5%	11,1%	25,9%	-40,0%	233,3%	69,2%	
dia	3	8	7,8%	0,0%	0,0%	12,9%	-14,3%	50,0%	19,2%	
Creatinina	1	14	123,7%	31,4%	55,0%	191,7%	-33,3%	420,0%	142,7%	0,260
30º dia -	2	12	95,7%	62,5%	80,0%	112,5%	28,6%	233,3%	56,7%	
cirurgia	3	8	54,2%	40,0%	55,0%	63,8%	28,6%	80,0%	7,9%	

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

Tabela 10 – Comparação da variação percentual de proteinúria em momentos diversos, parte 1.

<i>Variável</i>	<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>1º Q</i>	<i>Mediana</i>	<i>3ºQ</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>σ</i>	<i>Valor de p*</i>
Proteinúria 10º dia – cirurgia	1	14	150,5%	-66,7%	0,0%	225,0%	-90,0%	900,0%	337,2%	0,113
	2	12	414,3%	200,0%	200,0%	200,0%	-95,0%	3233,3%	893,3%	
	3	8	2908,1%	75,0%	1781,0%	6566,7%	-97,0%	6566,7%	3213,5%	
Proteinúria 30º dia – 10º dia	1	14	-31,5%	-70,0%	-70,0%	0,0%	-95,0%	233,3%	84,5%	0,009
	2	12	-59,3%	-90,0%	-66,7%	-50,0%	-90,0%	0,0%	37,2%	
	3	8	270,4%	0,0%	100,0%	400,0%	-70,0%	900,0%	402,6%	
Proteinúria 30º dia – cirurgia	1	14	180,8%	-88,8%	-68,3%	0,0%	-90,0%	3233,3%	879,4%	0,003
	2	12	23,1%	-70,0%	0,0%	50,0%	-95,0%	233,3%	125,6%	
	3	8	2703,2%	1046,4%	1900,0%	4066,7%	-70,0%	6566,7%	2598,6%	

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

Tabela 11 – Comparação da variação percentual de proteinúria em momentos diversos, parte 2.

<i>Variável</i>	<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Valor de p*</i>		
			Gr1xGr2	Gr1xGr3	Gr2xGr3
Proteinúria 10º dia - cirurgia	1	14	---	---	---
	2	12			
	3	8			
Proteinúria 30º dia - 10º dia	1	14	0,629	0,006	0,002
	2	12			
	3	8			
Proteinúria 30º dia - cirurgia	1	14	0,306	0,000	0,005
	2	12			
	3	8			

(*) Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$

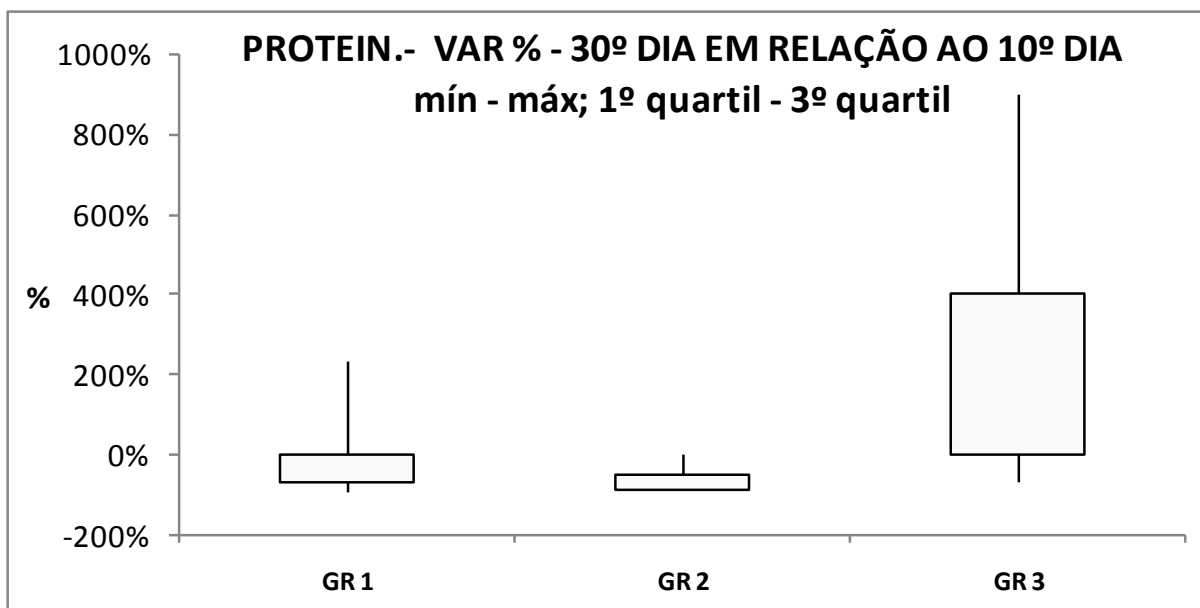


Figura 15 - Gráfico de caixa para variável proteinúria: comparação da variação percentual entre os grupos, trigésimo dia em relação ao décimo dia.

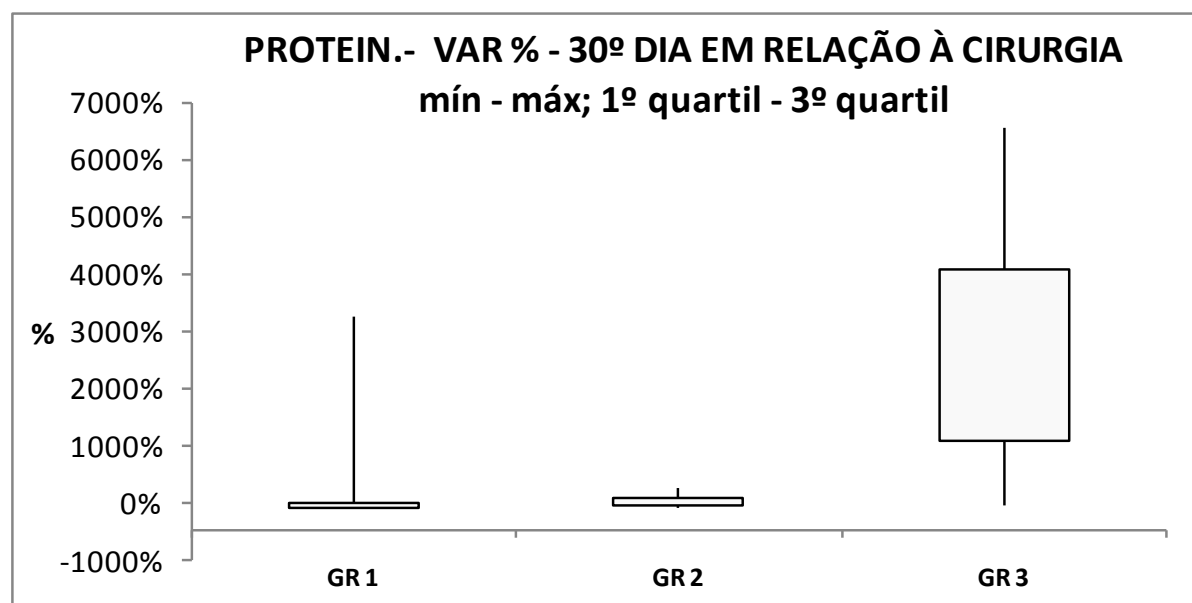


Figura 16 - Gráfico de caixa para variável proteinúria: comparação da variação percentual entre os grupos, trigésimo dia em relação ao dia da cirurgia.

4.3 COMPARAÇÃO DOS MOMENTOS CLÍNICO E CIRÚRGICO

Para cada uma das variáveis foi verificada a hipótese nula de resultados iguais nos dois momentos de avaliação versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela abaixo são apresentadas as estatísticas descritivas relativas aos resultados obtidos no estudo, bem como os valores de p dos testes estatísticos. Na sequência é apresentada a representação gráfica dos resultados para a variável proteinúria (Figura 18).

Tabela 12 – Comparação da variação percentual das variáveis uréia, creatinina e proteinúria, antes do início do experimento e no dia da cirurgia. Grupo 1.

<i>Variável</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>1º Q</i>	<i>Mediana</i>	<i>3ºQ</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>σ</i>	<i>Valor de p*</i>
Ureia – D0 Clínico	14	38,6	34,6	37,9	40,7	26,2	62,4'	8,4	0,245
Ureia – D0 Cirúrgico	14	41,7	36,2	40,3	43,6	28,6	75,3	10,9	
Variação % Ureia	14	12,8%	-6,5%	9,5%	25,5%	-54,2%	93,6%	36,4%	
Creatinina – D0 Clínico	14	0,5	0,3	0,5	0,6	0,3	0,7	0,1	0,367
Creatinina – D0 Cirúrgico	14	0,6	0,3	0,5	0,7	0,2	1,2	0,3	
Variação % Creatinina	14	18,5%	-15,0%	15,5%	62,5%	-60,0%	100,0%	53,1%	
Proteinúria – D0 Clínico	14	52,9	30,0	30,0	100,0	15,0	100,0	36,8	0,008
Proteinúria – D0 Cirúrgico.	14	265,7	47,5	100,0	300,0	30,0	1000,0	329,9	
Var. % Proteinúria	14	556,7%	50,0%	233,3%	816,7%	-70,0%	3233,3%	849,8%	

(*) Teste não paramétrica de Friedman; $p < 0,05$

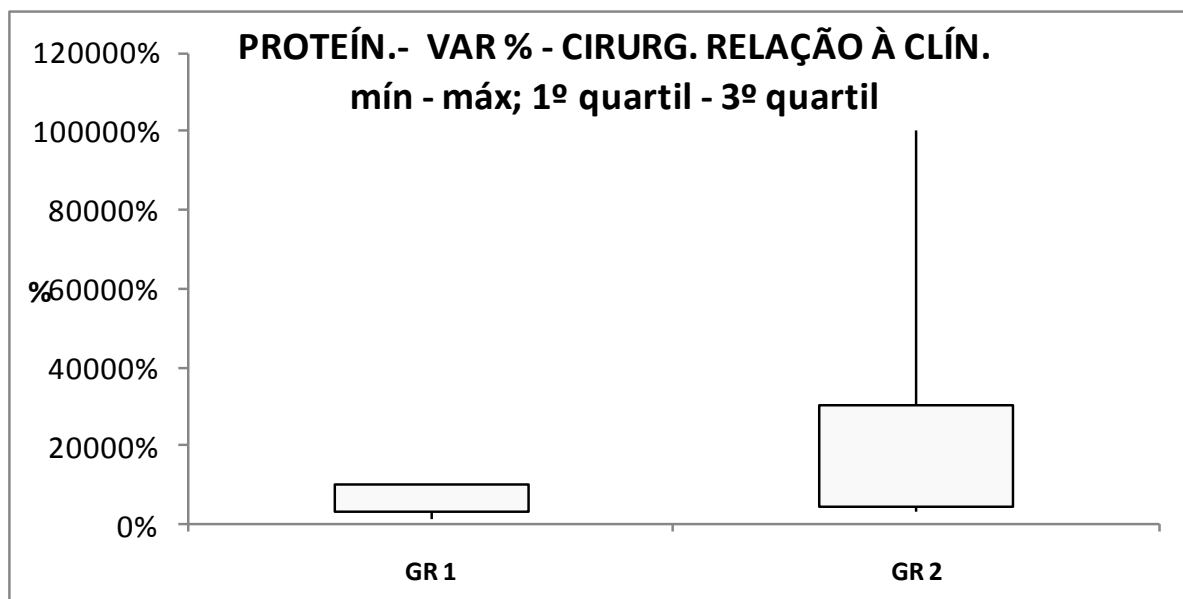


Figura 17 - Gráfico de caixa para variável proteinúria. Comparação da variação percentual de proteinúria no dia do início do experimento e no dia da cirurgia. Grupo 1.

4.3.1 Avaliação da evolução de proteinúria

Para o Grupo 1, testou-se ainda a hipótese nula de resultados iguais de proteinúria nos 4 momentos avaliados versus a hipótese alternativa de pelo menos um momento com resultados diferentes dos demais. Na Tabela 13 são apresentados os valores de p do teste estatístico, bem como as estatísticas descritivas de proteinúria nos quatro momentos avaliados.

Tabela 13 – Comparação das dosagens urinárias de proteína antes do início do experimento, no dia da cirurgia, no décimo e no trigésimo dia de pós-operatório. Grupo 1.

Momento	n	Média	1ºQ	Mediana	3ºQ	Mínimo	Máximo	σ	Valor de p*
Proteinúria D0-Clínico	14	52,9	30,0	30,0	100,0	15,0	100,0	36,8	0,002
Proteinúria D0-Cirúrgico	14	265,7	100,0	100,0	300,0	30,0	1000,0	329,9	
10º dia	14	216,4	100,0	100,0	300,0	30,0	1000,0	245,8	
Proteinúria 30º dia	14	136,4	30,0	30,0	100,0	15,0	1000,0	259,5	

(*) Teste não paramétrico de Friedman ; $p < 0,05$

Em função da rejeição da hipótese de igualdade dos 4 momentos, estes foram comparados dois a dois testando-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois momentos sob avaliação versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na Tabela 14 abaixo são apresentados os valores de p dos testes estatísticos. Na Figura 22 podem ser visualizados os resultados obtidos no estudo.

Tabela 14 – Comparação das dosagens de proteinúria: antes do início do experimento, no dia da cirurgia, no décimo e no trigésimo dia de pós-operatório. Grupo: 1.

Momento	Valor de p
Proteinúria D0 Clínico x Proteinúria D0-Cirúrgico	0,002
Proteinúria D0 Clínico x Proteinúria 10º dia	0,001
Proteinúria D0 Clínico x Proteinúria 30º dia	0,769
Proteinúria D0 Cirúrgico x Proteinúria 10º dia	0,922
Proteinúria D0 Cirúrgico x Proteinúria 30º dia	0,004
Proteinúria 10º dia x Proteinúria 30º dia	0,003

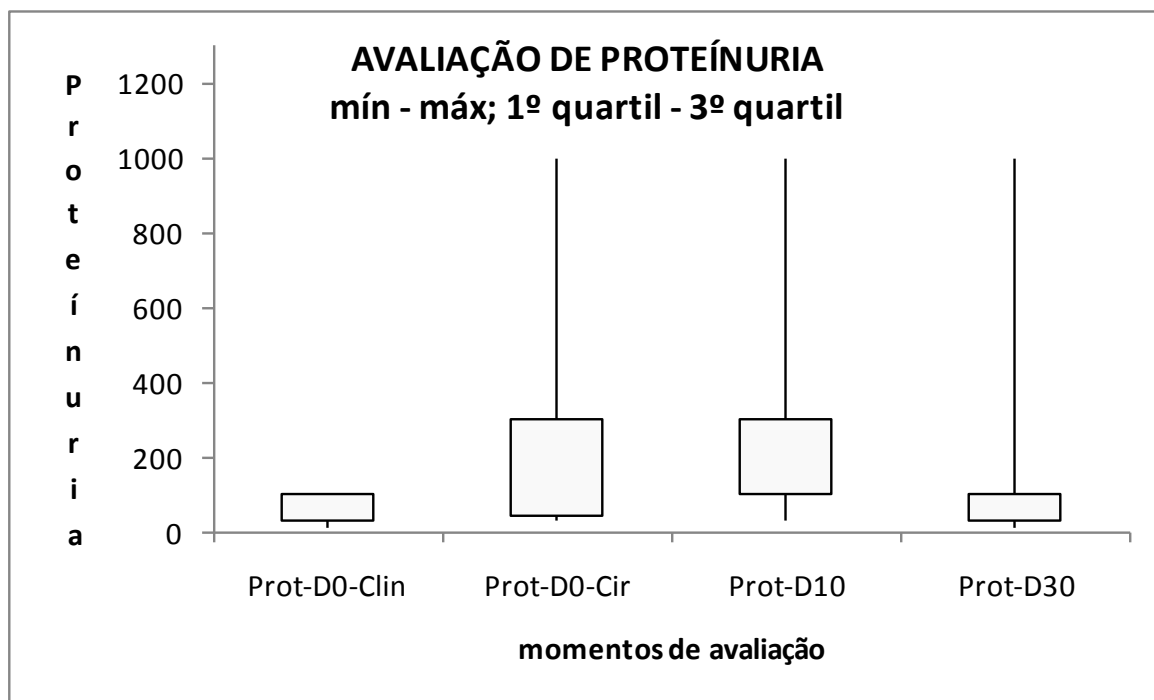


Figura 18 - Gráfico de caixa para variável proteinúria. Comparação da variação percentual de dosagens urinárias no dia do início do experimento e no dia da cirurgia. Grupo 1.

4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica é descrita em conjunto com a análise estatística de seus resultados, para cada uma das variáveis estudadas.

4.4.1 Índice de glomeruloesclerose (IG)

Não foi observada glomeruloesclerose na amostra estudada.

4.4.2 Índice de mesangiólise (IM)

Os achados histopatológicos da região glomerular incluíram sinais de mesangiólise, caracterizada por atenuação da matriz mesangial, presença de capilares convolutos e aneurismas capilares (Figura 20).

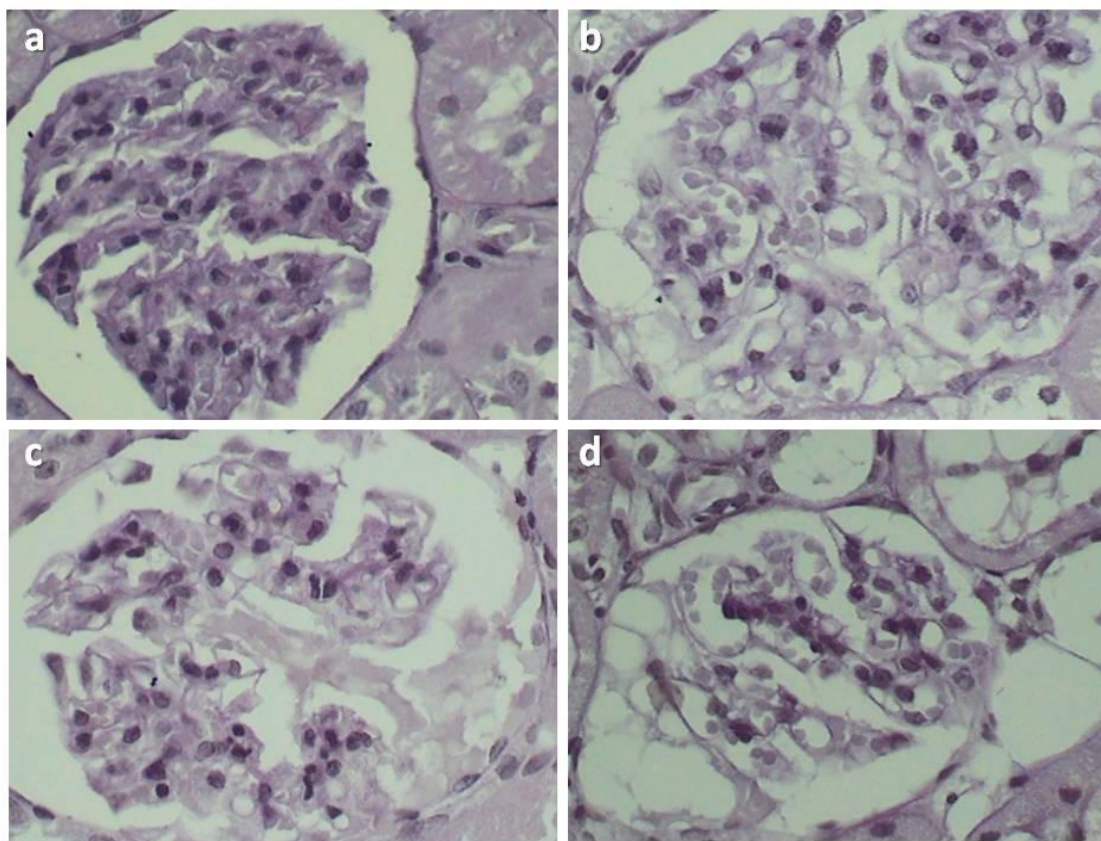


Figura 19 – Mesangiólise. Na coloração PAS podemos observar: a) IM pontuação 0 – sem alterações capilares; b) IM pontuação 1 – dilatação capilar e/ou 25% dos capilares convolutos; c) e d) IM pontuação 2 - dilatação capilar e/ou 25% dos capilares convolutos e/ou aneurismas capilares ou 50% de capilares convolutos.

Testou-se a hipótese nula de resultados iguais de IM nos três grupos versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com resultados diferentes dos demais. Na Tabela 16 é apresentada a distribuição, dentro de cada grupo, dos resultados obtidos no estudo.

Tabela 15 – Índice de Mesangiólise.

IM	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3
0	7 (50%)	11 (91,7%)	0 (0%)
1	6 (42,9%)	1 (8,3%)	3 (37,5%)
2	1 (7,1%)	0 (0%)	5 (62,5%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula ($p < 0,001$). Em função disto, os grupos foram comparados dois a dois, testando-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na Tabela 16 são apresentados os valores de p destes testes estatísticos.

Tabela 16 - Índice de Mesangiólise: comparação entre os grupos.

Grupos sob comparação	Valor de p
Grupo 1 x Grupo 2	0,012
Grupo 1 x Grupo 3	<0,001
Grupo 2 x Grupo 3	<0,001

4.4.3 Índice de lesão túbulo-intersticial (ILTI)

Os achados histopatológicos da região tubular, dentre os definidos pelo índice, incluíram dilatação tubular focal, hipotrofia tubular focal e a presença de cilindros protéicos (Figura 21).

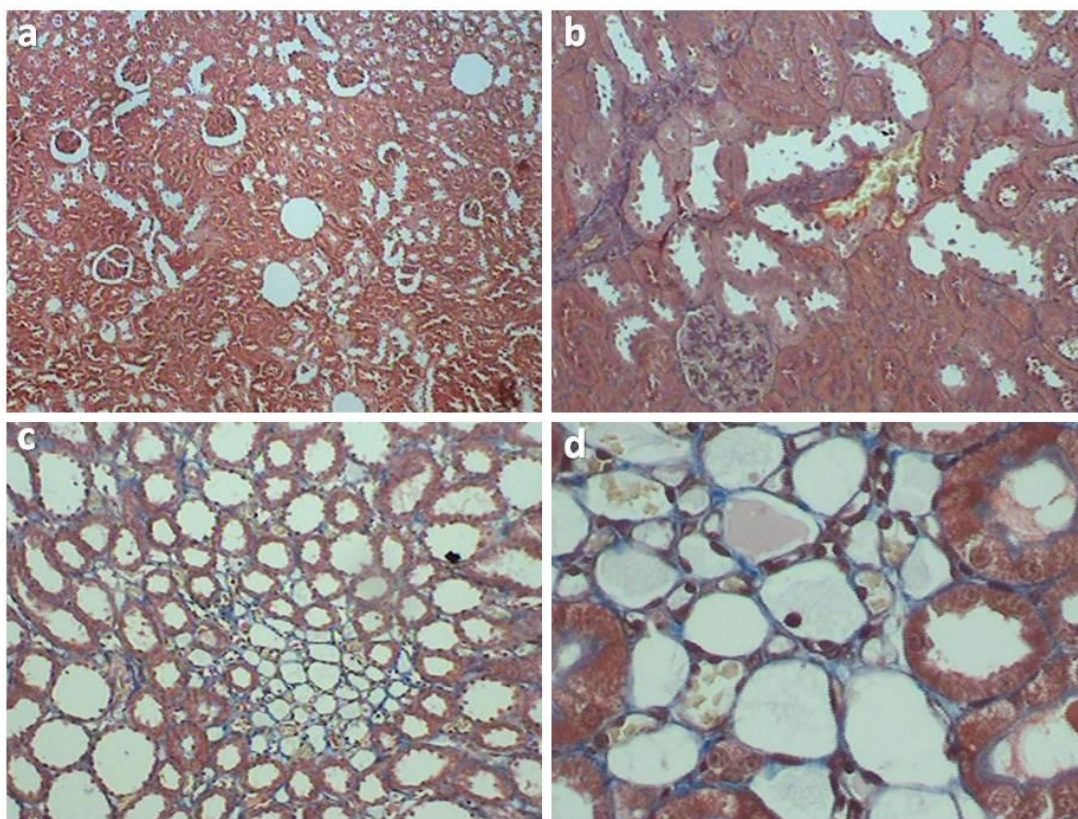


Figura 20 – Lesão Túbulo-Intersticial. Na coloração Tricrômio de Gomori podemos observar: a) e b) pontuação 1 – estrutura capilar normal; c e d) pontuação 2 – LTI envolvendo até 10% da área.

Em cinco ratos do Grupo 1 foram encontradas microcalcificações distróficas intra-tubulares. Infiltrados intersticiais amplos foram encontrados em três ratos dos grupos 1 e 3. Ambos os achados serão objeto de análise estatística em separado (ver subcapítulos 4.4.5.2 e 4.4.5.3). Os resultados de ILTI são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Índice de Lesão Túbulo-Intersticial.

ILTI	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
1	0 (0%)	12 (100%)	0 (0%)
2	14 (100%)	0 (0%)	8 (100%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Os resultados indicam uma igualdade entre os grupos 1 e 3, havendo resultados menores no grupo 2 (em função do número de resultados iguais o teste não foi aplicado).

4.4.4 Índice de lesão vascular (ILV)

Não foram observadas lesões vasculares na amostra estudada.

4.4.5 Outras alterações histopatológicas

Alguns achados histopatológicos adicionais, não previstos pelos índices padronizados escolhidos foram objeto de nossa atenção durante o estudo histopatológico, e foram submetidos a análise estatística quando procedente.

4.4.5.1 Presença de abscessos

Nas regiões limítrofes da ablação cirúrgica (pólos superior e inferior do rim esquerdo) foram encontradas áreas de infiltrado inflamatório, com reação gigantocelular e áreas de necrose, em todos os indivíduos estudados (n=34).

Em ratos dos Grupos 1 e 2 foram encontrados abscessos intraparenquimatosos extensos em contigüidade com as áreas de corte; e em um indivíduo do Grupo 1, portador de abscesso, foram encontrados leucócitos dentro dos túbulos (ver subcapítulo 4.4.5.4 e Figura 22).

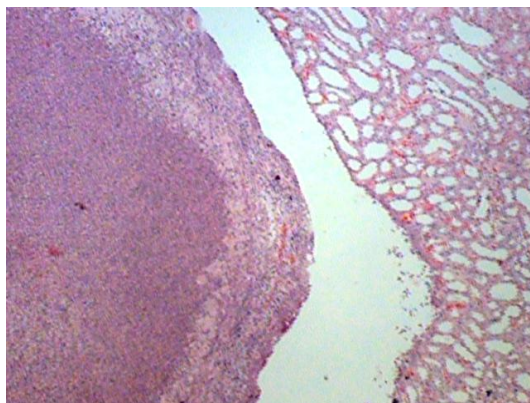


Figura 21 - Área de abscesso, Grupo 1.

Os grupos foram comparados dois a dois testando-se a hipótese nula de que a probabilidade de presença de abscessos é igual nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes. Os resultados da variável presença de abscessos são apresentados na Tabela 18. Na Tabela 19 são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois.

Tabela 18 - Presença de abscessos.

Presença de Abscessos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3
Não	9 (64,3%%)	8 (66,7%)	8 (100%)
Sim	5 (35,7%)	4 (33,3%)	0 (0%)
Total	14	12	8

Tabela 19 - Presença de abscessos: comparação entre os grupos.

Grupos sob comparação	Valor de p
Grupo 1 x Grupo 2	1,000
Grupo 1 x Grupo 3	0,115
Grupo 2 x Grupo 3	0,117

(*) Teste Exato de Fisher; correção de Bonferroni – valor de $p < 0,017$

4.4.5.2 Infiltrado intersticial

Os grupos foram comparados dois a dois testando-se a hipótese nula de que a probabilidade de presença de infiltrado intersticial é igual nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes.

Os resultados da variável Infiltrado Intersticial são apresentados na Tabela 20. Na Tabela 21 são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois.

Tabela 20 – Presença de infiltrado intersticial.

Infiltrado Intersticial	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3
Não	12 (85,7%)	12 (100%)	7 (87,5%)
Sim	2 (14,3%)	0 (0%)	1 (12,5%)
Total	14	12	8

Tabela 21 – Presença de infiltrado intersticial: comparação entre os grupos.

Grupos sob comparação	Valor de p
Grupo 1 x Grupo 2	0,483
Grupo 1 x Grupo 3	1,000
Grupo 2 x Grupo 3	0,400

(*) Teste Exato de Fisher; correção de Bonferroni – valor de $p < 0,017$

4.4.5.3 Microcalcificação distrófica intratubular

Os grupos foram comparados dois a dois testando-se a hipótese nula de que a probabilidade de presença de microcalcificação distrófica intratubular é igual nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes.

Os resultados da variável microcalcificação distrófica intratubular, são apresentados na Tabela 22. Na Tabela 23 são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois.

Tabela 22 – Microcalcificação distrófica intratubular.

Microcalcificação	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3
Distrófica			
Intratubular			
Não	9 (64,3%)	12 (100%)	8 (100%)
Sim	5 (35,7%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	14	12	8

Tabela 23 –Microcalcificação distrófica intratubular comparação entre os grupos.

Grupos sob comparação	Valor de p
Grupo 1 x Grupo 2	0,042
Grupo 1 x Grupo 3	0,115
Grupo 2 x Grupo 3	1,000

(*) Teste Exato de Fisher; correção de Bonferroni – valor de $p < 0,017$

4.4.5.4 Leucocitúria

Os grupos foram comparados dois a dois testando-se a hipótese nula de que a probabilidade de presença de leucocitúria é igual nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes. Os resultados de leucocitúria são apresentados na Tabela 24. Na Tabela 25 são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois.

Tabela 24 – Leucocitúria.

Leucocitúria	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3
Não	13 (92,9%)	12 (100%)	8 (100%)
Sim	1 (7,1%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	14	12	8

Tabela 25 – Leucocitúria: comparação entre os grupos.

Grupos sob comparação	Valor de p
Grupo 1 x Grupo 2	0,042
Grupo 1 x Grupo 3	0,115
Grupo 2 x Grupo 3	1,000

(*) Teste Exato de Fisher; correção de Bonferroni – valor de $p < 0,017$

5 DISCUSSÃO

A DRC está associada a complicações metabólicas, cardiovasculares e neurológicas⁵, a risco elevado de morte por doença cardiovascular^{6,7} e à progressão para IRC⁸. Em todas estas situações, o custo é imenso, em perdas humanas e materiais⁹, tornando extremamente importantes a descoberta e o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que retardem a progressão e/ou impeçam as complicações da doença.

Nas últimas décadas, o amplo uso de estatinas como hipolipemiantes permitiu a observação de vários de seus efeitos pleiotrópicos^{21,22,40,41}, antevendo seus usos no tratamento de várias doenças, ligadas^{6,17,39} ou não^{21,22,40,41} ao metabolismo lipídico. A existência de diversos estudos sobre os efeitos da estatina em quadros de inflamação e fibrose^{6,18,21-30}, evidências de seus efeitos nefroprotetores^{9,23,24} e, mais especificamente, estudos clínicos e experimentais indicando que estas drogas reduzem o risco cardiovascular em pacientes com DRC^{9,31,32,38} nos motivaram a estudar seus efeitos na doença renal crônica induzida em ratos.

O modelo do rim remanescente (nephrectomia 5/6), baseado na ablação cirúrgica de tecido renal¹² (nephrectomia direita e nephrectomia bipolar esquerda) permitiu realizar todas as avaliações pretendidas. A anestesia, realizada através de injeção intramuscular de uma associação de ketamina e xilazina possibilitou a realização dos procedimentos de coleta e as operações, sem necessidade de suplementação de oxigênio e/ou intubação orotraqueal na maioria dos casos^{12,15}. A microcoleta de amostras de sangue periférico por punção caudal causa menos impacto hemodinâmico que a punção cardíaca, em que pese a presença ou não de sinais como hipotermia, hipocoloração de mucosas e choque hipovolêmico. A ablação renal tem sido implicada no desenvolvimento de hipotermia nestes animais, tendo um estudo⁶⁰ apontado que, após nephrectomia 5/6, a temperatura basal dos ratos foi significativamente mais baixa que aquela dos animais de controle quando mantidos em um recipiente de imersão termoneutro.

A administração de fármacos por gavagem mostrou-se de fácil execução, podendo ser realizada sem necessidade de anestesia ou analgesia, permitindo a administração diária da dose exata da medicação.

Observamos em nosso projeto-piloto que a realização de coleta de sangue no mesmo dia do procedimento cirúrgico (nephrectomia 5/6) tem impacto sobre a mortalidade dos animais. Tendo em vista a existência de alterações sistêmicas relacionadas com a ablação renal operatória, descritas especialmente em modelos que fazem uso de ratos e camundongos³, recomendamos especial atenção na prevenção do sangramento per-operatório através de delicadeza no manuseio tecidual e hemostasia rigorosa, especialmente nas faces cruentas da nephrectomia bipolar esquerda. Em coelhos, advoga-se o uso de suturas nas áreas cruentas³, o que julgamos desnecessário realizar em ratos Wistar¹²: Estas áreas não apresentaram complicações hemorrágicas, e a presença de infiltrado inflamatório (com reação gigantocelular e necrose) estava restrita às regiões limítrofes da ablação cirúrgica, não afetando a análise histopatológica do tecido renal.

Avaliamos três variáveis clínico-laboratoriais em nosso estudo: uréia, creatinina e proteinúria; em três momentos de coleta: pré-operatório, décimo e trigésimo dias de pós-operatório.

O aumento da uremia após a nephrectomia 5/6 é inerente ao modelo^{3,12,45,48} e foi progressivo em nosso Grupo 3 ($p=0,001$). Este aumento foi confirmado quando avaliamos os três momentos de coleta dois a dois e também entre o décimo e o trigésimo dias de avaliação (aumento observado apenas neste grupo).

O aumento da uremia nos grupos tratados, por outro lado, foi precoce, compreendido especialmente entre o dia da cirurgia e o décimo dia de pós-operatório, sem diferença significativa entre o décimo e o trigésimo dia, onde, no Grupo 3, o aumento de uréia persistiu ($p=0,049$).

Quando analisamos as variações percentuais de uréia entre os grupos, as médias dos Grupos 1 e 3 são maiores no pós-operatório, mas não há diferença significativa entre elas. Já o Grupo 2 apresenta médias menores em relação aos outros dois grupos ($p=0,001$ quando comparado ao Grupo 1 e $p=0,035$ quando comparado ao Grupo 3), o que sugere que o uso de estatina teve impacto sobre os valores de uréia no grupos tratados, mais evidentemente no grupo que recebeu a droga somente no pós-operatório.

O uso da dosagem sérica de creatinina é amplo na prática clínica^{23,37} e é observado também em modelos experimentais como o do rim remanescente^{3,12,17,45,48,56}, em que pese a inexistência de trabalhos analisando o uso

de estatinas neste modelo. Análises *post-hoc* de estudos desenhados para testar a eficácia das estatinas na redução do risco cardiovascular^{31,32} mostraram efeitos benéficos destas à função renal^{9,18}, fazendo uso das dosagens séricas e do clearance de creatinina como marcadores.

Em nosso estudo, os níveis séricos de creatinina aumentaram nos três grupos, especialmente dez dias após a cirurgia. Não houve diferença, em nenhum dos grupos, entre os valores séricos de creatinina obtidos nas coletas do décimo e trigésimo dias. A análise das variações percentuais para dosagens de creatinina tampouco resultou em achados significativos. Estas evidências sugerem que a estatina não teve impacto sobre as dosagens de creatinina na amostra estudada.

Em pacientes não-portadores de DRC foi observado que todas as estatinas podem induzir certo grau de proteinúria, que é dose-dependente e diretamente proporcional à potência da estatina empregada, sendo mais comum quando se faz uso de rosuvastatina em altas doses⁹, o que pode ser explicado pelo maior grau de concentração e excreção renal desta estatina em relação às outras drogas do grupo. A proteinúria induzida pelas estatinas é de padrão tubular, sendo constituída basicamente por proteínas de baixo peso molecular - normalmente filtradas pelos glomérulos e reabsorvidas no túbulo contornado proximal, e não representa um estado patológico, podendo representar apenas a capacidade que as estatinas têm de inibir a reabsorção tubular de proteínas filtradas^{9,19}.

No Grupo 1, foi realizada uma coleta a mais para as três variáveis (uréia, creatinina e proteinúria), antes do início da administração de estatina no pré-operatório. O uso do fármaco não afetou as dosagens de uréia e creatinina, mas foi observado um aumento de proteinúria anterior à nefrectomia 5/6 ($p=0,002$), correspondendo a um aumento percentual de 556,7% em média ($p=0,008$).

Estudos anteriores^{18,19,20} demonstraram a diminuição da proteinúria associada ao uso de estatinas, em pacientes portadores de DRC, e sugerem três mecanismos para este efeito: diminuição da filtração proteica glomerular¹⁸, bloqueio da endocitose de proteínas filtradas¹⁹ e inibição da resposta inflamatória²⁰. Douglas *et al.*, em metanálise¹⁸ que avaliou quinze ensaios clínicos de estatinas que relatam medidas basais e de seguimento para albuminúria e proteinúria medidas por coleta de urina de vinte e quatro horas ou por taxas albumina-creatinina, concluiu que as estatinas têm efeito benéfico sobre a albuminúria patológica. O estudo ALERT³⁷, por

outro lado, mostrou que o grau de proteinúria não foi afetado pelo uso de fluvastatina em comparação ao grupo placebo. A metanálise realizada por Strippoli *et al.* constatou que a discreta redução na proteinúria observada no grupo de pacientes tratados com estatinas não correspondeu a melhora na taxa de filtração glomerular⁵⁵, questionando se os discretos benefícios encontrados nas avaliações laboratoriais correspondem, a médio e longo prazo, a benefícios clínicos relevantes para o paciente, tais como aumento no tempo livre de diálise⁹.

Em nosso Grupo 1, em que pese a presença de proteinúria já no pré-operatório, houve diminuição dos níveis de proteína urinária até o décimo dia de pós-operatório ($p=0,005$ na análise direta, não referendado pela análise da variação percentual), seguida de novo aumento entre o décimo e o trigésimo dia de pós-operatório ($p=0,005$ pela análise direta, $p=0,009$ ao avaliarmos a variação percentual).

A análise específica da evolução de proteinúria no Grupo 1, que recebeu estatina pré-operatória, incluindo as dosagens pré-medicação, confirmou o aumento desta no pré-operatório ($p=0,002$) mas não encontrou diferença significativa entre aquelas e as dosagens finais (trigésimo dia de pós-operatório), ou entre as dosagens do dia da cirurgia e as finais, sugerindo efeito benéfico da estatina sobre esta variável na amostra estudada.

Os níveis de proteinúria aumentaram entre o dia da cirurgia, o décimo e o trigésimo dia de pós-operatório no Grupo 3, *sham* ($p=0,025$), como esperado para o modelo¹²; e foi mais evidente nos primeiros dez dias ($p=0,044$). Entre o décimo e o trigésimo dias, a proteinúria não aumentou ($p=0,254$).

No Grupo 2, tratado exclusivamente no pós-operatório, observamos um aumento dos níveis de proteinúria nos primeiros dez dias ($p<0,001$, não referendado pela análise da variação percentual), seguido de diminuição da proteinúria entre o décimo e o trigésimo dia ($p<0,001$ na análise direta, $p=0,009$ na avaliação da variação percentual), aliados à ausência de diferença significativa entre as dosagens de proteinúria do dia da cirurgia e do final do experimento ($p=0,545$), sugerindo um possível impacto do uso de estatina sobre a variável proteinúria neste grupo.

Quando confrontamos os grupos, não encontramos diferença estatisticamente significativas nos valores de proteinúria entre os grupos tratados (1 e 2) entre si, mas

ambos apresentam valores menores de proteinúria em relação ao Grupo 3, exceto nos primeiros dez dias.

Dos quatro índices padronizados⁵⁶ utilizados para análise das alterações histopatológicas, os Índices de Mesangiólise e de Lesão Túbulo-Intersticial foram úteis na caracterização e determinação da progressão da DRC na amostra estudada, de maneira similar à encontrada por Tsunenari *et al.* na avaliação dos efeitos renoprotetores da telmisartana¹⁵.

A ausência de glomeruloesclerose e lesões vasculares na amostra estudada, inclusive para o Grupo 1 (*sham*), pode ser explicada pelo tempo de observação clínica ter sido de apenas quatro semanas. Alguns trabalhos^{42,48,49} somente obtiveram alterações histopatológicas mais evidentes de desenvolvimento de DRC em períodos de tempo maiores, em torno de dez semanas, e nestes, a glomeruloesclerose foi mais freqüente. Santos *et al.*, porém, ao avaliarem as diferenças entre os diversos modelos de indução experimental de DRC em ratos Wistar, descreveram recuperação funcional do rim remanescente em oito semanas¹², o que pode significar que estes animais apresentam uma janela curta para observação da DRC, e conseqüentemente, para experimentação.

Sinais de mesangiólise, que antecedem o aparecimento de glomeruloesclerose, foram mais evidentes no grupo *sham* (Grupo 3), em comparação aos grupos tratados. No grupo que recebeu estatina somente no pós-operatório (Grupo 2), foram obtidos os menores resultados, inclusive em comparação ao Grupo 1 ($p=0,012$).

O ILTI também mostrou uma menor pontuação para o Grupo 2, enquanto os Grupos 1 e 3 obtiveram resultados semelhantes. No Grupo 2, achados concomitantes à avaliação dos índices nas áreas tubulares renais, sugeriram, em uma análise subjetiva, menor grau de dilatação tubular, cilindros protéicos intratubulares mais freqüentes (em relação ao Grupo 3), ausência de infiltrados intersticiais, ausência de microcalcificações distróficas intratubulares ou leucocitúria (presentes exclusivamente no Grupo 1). Estes resultados, porém, não foram corroborados por significância estatística. A associação entre o uso de estatinas e a presença de abscessos renais não foi relatada até o momento.

Os achados histopatológicos demonstraram que o grupo que recebeu estatina exclusivamente no pós-operatório apresenta, em comparação com os outros grupos, menor grau de lesão glomerular e tubular.

Os efeitos do uso de estatina sobre o desenvolvimento de DRC nesta amostra - diminuição dos valores de uréia nos grupos tratados, especialmente no grupo que recebeu a droga somente no pós-operatório; a indução de proteinúria em indivíduos normais; a diminuição da proteinúria após o décimo dia de pós-operatório nos grupos tratados; menor Índice de Mesangiólise no grupo que recebeu a droga no pós-operatório e menor Índice de Lesão Túbulo-Intersticial no grupo que recebeu estatina no pós-operatório - são promissores, podem corroborar achados clínicos e criam a perspectiva de aprofundarmos este estudo através de análise imuno-histoquímica do material coletado.

O modelo do rim remanescente (nephrectomia 5/6) nos parece útil para estudar os efeitos de outras drogas sobre o desenvolvimento de DRC em ratos. Dosagens seriadas de ureia, creatinina e proteinúria podem ser utilizadas para comparar os efeitos de outras drogas entre si, e em relação a estatina.

6 CONCLUSÃO

O uso de estatina teve impacto na progressão da DRC induzida neste modelo experimental em ratos, evidenciado pela diminuição dos valores de ureia sérica e proteinúria, e por menores índices de mesangiólise e lesão túbulo-intersticial nos grupos tratados. Melhores resultados foram obtidos no grupo que recebeu a droga exclusivamente no pós-operatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Kidney Foundation. NKF KDOQI Guidelines. Disponível em: http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p1_exec.htm . Acesso em 8 de dez. de 2011.
2. Romão Jr JE, Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. J Bras Nefrol Volume XXVI.2004. 26(3):1-3.
3. Costa AFN, Pereira LPM, Ferreira ML, Silva PC. Modelo cirúrgico de insuficiência renal crônica. Estudo em coelhos. Rev Col Bras Cir. 2009. 36(1):78-84.
4. Aunapuu M, Pechter U, Arend A, Suuroja T, Ots M. Ultrastructural changes in the remnant kidney (after 5/6 nephrectomy) glomerulus after losartam and atenolol treatment. Medicina 2003. 39(10):975-979.
5. Bukhari FJ, Moradi H, Gollapudi P, Ju Kim H, Vaziri ND, Said HM. Effect of chronic kidney disease on the expression of thiamin and folic acid transporters. Nephrol Dial Transplant 2011. 26(7):2137-44.
6. Vaziri ND. Lipotoxicity and impaired high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport in chronic kidney disease. J Ren Nutr 2010. 20(5 Suppl): S35-43.
7. Kuncova J, Svirglerova J, Kummer W, Rajdl D, Chottova-Dvorakova M, Tonar Z, et al. Parasympathetic regulation of heart rate in rats after 5/6 nephrectomy is impaired

despite functionally intact cardiac vagal innervation. *Nephrol Dial Transplant* 2009. 24(8): 2362-70, 2009 Aug.

8. Kelley R, Werdin ES, Bruce AT, Choudhury S, Wallace SM, Ilagan RM, et al. Tubular cell-enriched subpopulation of primary renal cells improves survival and augments kidney function in rodent model of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010. 299(5): F1026-39.

9. Laurinavicius AG, Santos RD. Dislipidemia, estatinas e insuficiência renal crônica. *Rev Bras Hipertens* 2008. 15(3):156-161.

10. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation*. 2003. 107: 87-92.

11. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med*. 2003. 115(8A):99-106.

12. Santos LS, Chin EWK, Ioshii SO, Tambara Filho R. Surgical reduction of renal mass in rats. Morphologic and functional analysis on the remnant kidney. *Acta Cir Bras*. 2006. 21(4):252-257.

13. Zhao G, Zhao H, Tu L, Xu X, Zheng C, Jiang M, et al. Effects and mechanism of irbesartan on tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2010. 30(1):48-54.

14. Combination therapy with Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, et al. A Combination therapy with aniotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol*. 2007. 18(6):1796-1806.

15. Tsunenari I, Ohmura T, Seidler R, Chachin M, Hayashi T, Konomi A, et al. Renoprotective effects of telmisartan in the 5/6 nephrectomised rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2007. 8(2):93-100.

16. Pascoal IF. Nefroproteção: os efeitos da manipulação farmacológica. *HiperAtivo*. 1998. 5(4):286-289.

17. Zoja C, Corna D, Rottoli D, Cattaneo D, Zanchi C, Tomasoni S et al. Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropathy. *Kidney International*. 2002. 61(5):1635–1645.

18. Douglas K, O'Malley PG, Jackson JL. Meta-analysis: the effect of statins on albuminuria. *Ann Intern Med*. 2006.145(2):117-24.

19. Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S et al. Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPasep21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *PNAS*. 2002. 99(12):8301-5.

20. Zoja C, Corna D, Camozzi D, Cattaneo D, Rottoli D, Batani C, et al. How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach. *J Am Soc Nephrol*. 2002. 13(12):2898-908.

21. Birnbaum Y, Lin Y, Ye Y, Merla R, Perez-Polo JR, Uretsky BF. Pretreatment with high-dose statin, but not low-dose statin, ezetimibe, or the combination of low-dose statin and ezetimibe, limits infarct size in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2008. 13(1):72-9.

22. Paraskevas KI, Liapis CD, Hamilton G, Mikhailidis DP. Are statins an option in the management of abdominal aortic aneurysms? *Vasc Endovascular Surg.* 2008. 42(2):128-34.

23. Patti G, Nusca A, Chello M, Pasceri V, D'Ambrosio A, Vetrovec GW et al. Usefulness of Statin Pretreatment to Prevent Contrast-Induced Nephropathy and to Improve Long-Term Outcome in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Am J Cardiol.* 2008. 101(3):279-285.

24. Wiesbauer F, Heinze G, Mitterbauer C, Harnoncourt F, Höri WH, Oberbauer R. Statin Use is Associated with Prolonged Survival of Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2008. 19(11):2211-2218.

25. Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K, Takeji M, Horio M, Ando A, et al. Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2001. 59(6):2095-2103.

26. Vieira JM, Mantovani E, Rodrigues LT, Dellê H, Noronha IL, Fujihara CK et al. Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant.* 2005. 20(8):1582-1591.

27. Michli E, Gulmi FA, Chou SY, Mooppan UM, Kim H. Atorvastatin preserves renal function in chronic complete unilateral ureteral obstruction. *J Urol*. 2007. 177(2): 781-5..

28. Chade AR, Zhu XY, Grande JP, Krier JD, Lerman A, Lerman LO. Simvastatin abates development of renal fibrosis in experimental renovascular disease. *J Hypertens*. 2008. 26(8):1651-1660.

29. Haydont V, Bourgier C, Pocard M, Lusinchi A, Aigueperse J, Mathé D, et al. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin Cancer Res*. 2007. 13(18 Pt 1):5331-40.

30. Abe Y, Izumi T, Urabe A, Nagai M, Taniguchi I, Ikewaki K, et al. Pravastatin prevents myocardium from ischemia-induced fibrosis by protecting vascular endothelial cells exposed to oxidative stress. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2006. 20(4):273-80.

31. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002. 360:7-22.

32. Tonelli M, Moyé L, Sacks FM, Cole T, Curhan GC. Cholesterol and recurrent events trial I. Pravastatin for secondary prevention of cardiovascular events in persons with mild chronic renal insufficiency. *Ann Intern Med*. 2003. 138:98-104.

33. Asselbergs FW, Diercks GF, Hillege HL, van Boven AJ, Janssen WM, Voors AA, et al. Effects of fosinopril and pravastatin on cardiovascular events in subjects with microalbuminuria. *Circulation*. 2004. 110:2809-16.

34. Wanner C, Krane V, März W, Olschewski M, Mann JF, Ruf G, Ritz E; German Diabetes and Dialysis Study Investigators. Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2005. 353:238-248.

35. Fellström BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, et al. Rosuvastatin and Cardiovascular Events in Patients Undergoing Hemodialysis. *N Engl J Med* 2009. 360(14):1395-1407.

36. Holdaas H, Fellström B, Jardine AG, Holme I, Nyberg G, Fauchald P, et al. Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in renal transplant recipients: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003. 361:2024–2031.

37. Fellström B, Holdaas H, Jardine AG, Holme I, Nyberg G, Fauchald P, et al. Effect of fluvastatin on renal end points in the Assessment of Lescol in Renal Transplant (ALERT) trial. *Kidney International*. 2004. 66:1549–1555.

38. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011. 377(9784): 2181–2192.

39. Moradi H, Yuan J, Ni Z, Norris K, Vaziri N. Reverse Cholesterol Transport Pathway in Experimental Chronic Renal Failure. *Am J Nephrol* 2009. 30:147–154.

40. Almeida JL, Sampietre SN, Mendonca Coelho AM, Trindade Molan NA, Machado MC, et al. Statin pretreatment in experimental acute pancreatitis. *JOP* 2008. 9(4): 431-9.
41. Favero GM, F Otuki M, Oliveira KA, Bohatch MS Jr, Borelli P, Barros FE, et al. Simvastatin impairs murine melanoma growth. *Lipids in Health and Disease*. 2010.142-148.
42. Fleck C, Appenroth D, Jonas P, Koch M, Kundt G, Nizze H, Stein G. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats--influence of sex, strain, and surgical procedure. *Exp Toxicol Pathol*. 2006. 57(3):195-205.
43. Fu RG, Wang Y, Yuan HZ, Zhou JP, Wang L, Liu XD, et al. Effects of chronic renal failure on gastrointestinal motility: a study on the changes of gastric emptying, small intestinal transit, interdigestive myoelectric complex, and fecal water content. *Ren Fail*. 2011. 33(6):615-21.
44. Muller-Krebs S, Kihm LP, Zeier B, Gross ML, Wieslander A, Haug U, et al. Glucose degradation products result in cardiovascular toxicity in a rat model of renal failure. *Perit Dial Int* 2010. 30(1):35-40.
45. McMahon AC, Greenwald SE, Dodd SM, Hurst MJ, Raine AE. Prolonged calcium transients and myocardial remodelling in early experimental uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 May. 17(5):759-764.
46. Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, von Wasielowski R, Lindschau C et al. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin

alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation* 2010. 110(8):1006-1012.

47. Kennedy DJ, Elkareh J, Shidyak A, Shapiro AP, Smaili S, Mutgi K, et al. Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008. 294(2): 450-4.

48. Erdely A, Wagner L, Muller V, Szabo A, Baylis C. Protection of Wistar Furth Rats from Chronic Renal Disease Is Associated with Maintained Renal Nitric Oxide Synthase. *J Am Soc Nephrol*. 2003 October ; 14(10): 2526–2533.

49. Lemos CC, Mandarim-de-Lacerda CA, Dorigo D, Coimbra TM, Bregman R. Chronic renal failure in male and female rats. *J Nephrol* 2005. 18(4): 368-73.

50. Kleinknecht C, Terzi F, Burtin M, Laouari D, Maniar S. Experimental models of nephron reduction: some answers, many questions. *Kidney Int Suppl*. 1995. 49:S51-4.

51. Mahley RW, Bersot TP. Terapia farmacológica para a hipercolesterolemia e a dislipidemia. In : Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill; 2006. p. 851-6.

52. Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Bessler H. Effect of pravastatin, simvastatin and atorvastatin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages. *Exp Mol Pathol*. 2006. 80(2): 160-4.

53. Biasucci LM, Biasillo G, Stefanelli A. Inflammatory markers, cholesterol and statins: patophysiological role and clinical importance. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48(12): 1685-91.
54. Hartner A, Klanke B, Cordasic N, Amann K, Schmieder RE, Veelken R, Hilgers KF. Statin treatment reduces glomerular inflammation and podocyte damage in rat deoxycorticosterone-acetate-salt hypertension. *J Hypertens*. 2009. 27(2):376-85.
55. Strippoli GF, Navaneethan SD, Johnson DW, Perkovic V, Pellegrini F, Nicolucci A, et al. Effects of statins in patients with chronic renal disease: a meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials. *BMJ*. 2008. 336:645-51.
56. Jung O, Jansen F, Mieth A, Barbosa-Sicard E, Pliquet RU, Babelova A, et al. Inhibition of the Soluble Epoxide Hydrolase Promotes Albuminuria in Mice with Progressive Renal Disease. *PLoS ONE*. 2006. 5(8): e11979.
57. Haas CS, Amann K, Schittny J, Blaser B, Müller U, Hartner A. Glomerular and renal vascular structural changes in alpha8 integrin-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*. 2010. 14: 2288–2296.
58. Dimmler A, Haas CS, Cho S, Hattler M, Forster C, Peters H, et al. Laser capture microdissection and real-time PCR for analysis of glomerular endothelin-1 gene expression in mesangiolysis of rat anti-Thy 1.1 and murine Habu Snake Venom glomerulonephritis. *Diagn Mol Pathol*. 2003. 12: 108–117.

59. Véniant M, Heudes D, Clozel JP, Bruneval P, Ménard J. Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats. *Kidney Int.* 1994. 46: 421–429.

60. Lutaif NA; Rocha EM; Veloso LA; Bento LM; Gontijo JA. Renal contribution to thermolability in rats: role of renal nerves. *Nephrol Dial Transplant.* 2008. 23(12): 3798-805.

ANEXO

ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 29 de setembro de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 572 – 4ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Análise da utilização de estatina pré e pós-operatória na insuficiência renal

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fernando Meyer

EQUIPE DE PESQUISA:

Fernando Meyer, Renato Van Wilpe Bach

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS – Mestrado em Cirurgia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>)	Machos	2 meses 200 – 250 g	C	30

O colegiado do CEUA em reunião no dia 29/09/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

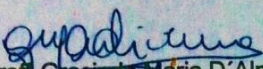
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

ANEXO

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof. Graziela Maria D. Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais

