



## Sinvastatina e lesão renal aguda isquêmica em ratos\*

*Simvastatin and acute ischemic renal injury in rats*

*Simvastatina y lesión renal aguda isquémica en ratas*

Claudia Akemi Shibuya Teshima<sup>1</sup>, Mirian Watanabe<sup>1</sup>, Cassiane Dezoti da Fonseca<sup>1</sup>, Maria de Fátima Fernandes Vattimo<sup>2</sup>

### RESUMO

**Objetivos:** O estudo visou verificar a ação renoprotetora da sinvastatina em modelo animal de isquemia/reperfusão por 30 minutos. **Métodos:** A isquemia foi obtida por meio do clampamento dos pedículos renais bilaterais por 30 minutos, seguida de reperfusão. Ratos Wistar, machos foram usados pesando entre 250-300g, distribuídos nos seguintes grupos: SHAM (controle, sem clampamento renal); Isquemia (isquemia renal por 30 minutos); Isquemia+Estatina (sinvastatina 0,5 mg/kg, via oral durante três dias). A função renal (*clearance* de creatinina, método de Jaffé), a osmolalidade urinária, os peróxidos urinários foram avaliados. **Resultados:** Os resultados mostraram que a estatina melhorou a função renal, a osmolalidade urinária e reduziu a excreção de PU. **Conclusão:** Em síntese, o estudo confirmou o efeito renoprotetor da estatina, com ação antioxidante de proteção renal.

**Descritores:** Lesão renal aguda; Isquemia; Simvastatina/efeitos adversos; Ratos

### ABSTRACT

**Objectives:** The study aimed to verify the protective renal action of *simvastatin* in an animal model of ischemia / reperfusion for 30 minutes. **Methods:** Ischemia was obtained by clamping bilateral renal pedicles for 30 minutes, followed by reperfusion. Male Wistar rats were used, weighing between 250-300g, distributed into the following groups: *SHAM* (control, without clamping renal), *Ischemia* (renal ischemia for 30 minutes), *Ischemia + Statin* (simvastatin 0.5 mg/kg, orally for three days). Renal function (creatinine clearance, Jaffé method), urinary osmolality, and urinary peroxides were evaluated. **Results:** The results showed that the statin improved renal function, and reduced urinary osmolality along with excretion of PU. **Conclusion:** In summary, the study confirmed the protective renal effects of statins, with an antioxidant action that protects the kidney.

**Keywords:** Acute kidney injury; Ischemia; Simvastatin/adverse effects; Rats

### RESUMEN

**Objetivos:** El estudio tuvo como objetivo verificar la acción renoprotectora de la sinvastatina en modelo animal de isquemia/reperfusión por 30 minutos. **Métodos:** La isquemia se obtuvo por medio del pinzamiento de los pedículos renales bilaterales por 30 minutos, seguida de la reperfusión. Fueron usadas ratas Wistar, machos que pesaban entre 250-300g, distribuidos en los siguientes grupos: SHAM (control, sin pinzamiento renal); Isquemia (isquemia renal por 30 minutos); Isquemia+Estatina (sinvastatina 0,5 mg/kg, via oral durante tres días). Fueron evaluadas la función renal (*clearance* de creatinina, método de Jaffé), la osmolaridad urinaria y los peróxidos urinarios. **Resultados:** Los resultados mostraron que la estatina mejoró la función renal, la osmolaridad urinaria y redujo la excreción de PU. **Conclusión:** En síntesis, el estudio confirmó el efecto renoprotector de la estatina, con acción antioxidante de protección renal.

**Descriptores:** Lesión renal aguda; Isquemia; Simvastatina/efectos adversos; Ratas

\* Estudo realizado no Laboratório Experimental de Modelos Animais – LEMA da Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo - USP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Mestre pela Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo - USP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Livre Docente. Professora responsável pelo Laboratório Experimental de Modelos Animais da Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo - USP – São Paulo (SP), Brasil.

## INTRODUÇÃO

O primeiro transplante renal com doador cadáver foi realizado no Brasil em 1964. Atualmente, o transplante renal evoluiu da condição de procedimento cirúrgico experimental a tratamento consagrado da insuficiência renal crônica em estágio terminal com maior sobrevida do órgão e melhor qualidade de vida para o receptor. O desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas, doadores falecidos ou intervivos, a descoberta de novas drogas imunossupressoras com menor ocorrência de efeitos adversos, a legislação nacional que permite a normatização de busca e captação de órgãos são os vários fatores que contribuem para realização de um transplante bem-sucedido<sup>(1-2)</sup>.

A realização de um transplante renal envolve mecanismo de isquemia/reperfusão (IR), onde a isquemia é determinada pela remoção do rim no doador e a implantação do órgão no espaço extraperitoneal do receptor. A implantação do enxerto confere a reperfusão ao órgão e restabelece condições para recuperação, porém, desencadeia uma nova lesão mediada pela ativação da resposta inflamatória e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no leito endotelial da microvasculatura do enxerto. A disfunção do enxerto é uma manifestação clínica com redução imediata da função renal pós transplante, sendo uma importante causa de lesão renal aguda isquêmica (LRAi)<sup>(3-4)</sup>.

Estudos em modelos animais de I/R permitem a transposição de situações clínicas à bancada, em uma tentativa de, no isolamento de variáveis não abordáveis no humano, poder identificar mecanismos fisiopatológicos e respostas fisiológicas às manipulações medicamentosas ou mecânicas, foco deste estudo. Esses modelos, predominantemente realizados em ratos ou em camundongos, representam cerca de 40% dos estudos publicados na *Kidney International e Nephrology Dialysis Transplantation* no último triênio<sup>(5)</sup>.

O modelo de I/R renal consiste no clampeamento da artéria renal ou do pedículo renal por um período variado de 15 a 60 minutos com subsequente reperfusão, reproduzindo o cenário clínico de um transplante renal. A aplicabilidade e a viabilidade desse modelo são resultantes da similaridade da resposta inflamatória, congestão medular e lesão tubular apresentada quando comparados com dados obtidos por meio de biópsia renal em pacientes com LRA<sup>(6)</sup>.

A hipótese deste estudo é que a estatina tenha, por seus efeitos pleiotrópicos, descolados de sua ação antilipídica, de anti-inflamação e antioxidação, ação renoprotetora no modelo de I/R reproduzido no rato. Evidências recentes confirmam a prevenção de reações vasculares inflamatórias em estudos clínicos e em modelos animais com a administração de estatinas<sup>(6-7)</sup>; no entanto, o estudo ora apresentado avança na investigação por seus mecanismos antioxidantes.

## OBJETIVO

Verificar a ação renoprotetora da simvastatina em modelo animal de I/R renal por 30 minutos.

## MÉTODOS

Os procedimentos realizados neste estudo estavam de acordo como os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo. Todos os animais tiveram acesso livre à água e alimentos permanecendo em condições térmicas com ciclos de dia e noite durante todo o experimento.

Ratos da raça Wistar, machos e adultos foram usados, pesando entre 250 – 300 gramas, divididos nos seguintes grupos: *SHAM* – controle cirúrgico com simulação do ato cirúrgico, *Estatina* – animais condicionados durante 3 dias com Sinvascor®-Baldacci 0,5 mg/kg por gavagem (v.o), *Isquemia* – clampeamento bilateral dos pedículos renais durante 30 minutos, *Isquemia + estatina* – isquemia renal em animais précondicionados durante 3 dias com Sinvascor®-Baldacci 0,5 mg/kg por gavagem (v.o).

Os animais foram anestesiados com tiopental de sódio 40-50 mg/kg, intraperitoneal (i.p.) e submetidos à laparotomia para clampeamento bilateral dos pedículos renais durante 30 minutos e restabelecimento da perfusão renal, sendo colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas. Após este período, foram anestesiados novamente com tiopental de sódio 60 mg/kg para nova laparotomia e coleta de sangue através da punção da aorta abdominal para estudos de função renal (FR), função tubular e estresse oxidativo.

FR: Avaliada por meio do *clearance* de creatinina por meio da mensuração de creatinina plasmática e urinária realizada pelo método de Jaffé<sup>(8)</sup>.

Função tubular: Mensuração da osmolalidade urinária (OU) por meio do osmômetro – *Advanced Osmometer*® – model 3D3.

Estresse oxidativo: Mensuração dos níveis de peróxidos urinários (PU) pelo método FOX-2. A mensuração dos níveis de PU é considerada biomarcador da geração de peróxidos de hidrogênio e preditor da extensão de estresse oxidativo em modelos experimentais *in vivo*<sup>(9)</sup>.

Utilizou-se o método GLM (Anova univariada) e testes de comparações múltiplas ajustados para Bonferroni para análise estatística. Os valores  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## RESULTADOS

Os dados da Tabela 1 apresentam a FR dos diversos grupos, onde os animais submetidos à isquemia renal

por 30 minutos apresentaram elevação não significativa de fluxo urinário, redução do *clearance* de creatinina ( $0,20 \pm 0,02$  vs  $0,60 \pm 0,07$ ;  $p < 0,05$  vs SHAM) e da osmolalidade urinária ( $766 \pm 188$  vs  $1793 \pm 191$ ;  $p < 0,05$  vs SHAM), quando comparados com o grupo controle SHAM, confirmando o modelo de LRA isquêmica com redução da filtração glomerular e função tubular. O condicionamento com sinvastatina durante três dias no grupo isquêmico resultou em melhora da FR, com elevação na taxa de filtração glomerular ( $0,49 \pm 0,04$  vs  $0,20 \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$  vs Isquemia) e maiores valores de OU ( $1153 \pm 404$  vs  $766 \pm 188$ ;  $p < 0,05$  vs Isquemia) em relação ao grupo isquemia.

**Tabela 1.** Função renal global dos diversos grupos.

Grupos	n <sup>a</sup>	FU (ml/min)	Clcr 100g (ml/min)	Osmolalidade Urinária (mOsm)
SHAM	6	0,006±0,001	0,60±0,07	1793±191
Estatina	6	0,008±0,002	0,85±0,19	1849±71
Isquemia	7	0,013±0,008	0,20±0,02 <sup>a</sup>	766±188 <sup>a</sup>
Isq + Estatina	10	0,016±0,011	0,49±0,04 <sup>b</sup>	1153±404 <sup>a</sup>

Sendo FU – fluxo urinário, Clcr 100g – *clearance* de creatinina por 100 gramas.

<sup>a</sup>p < 0,05 vs SHAM

<sup>b</sup>p < 0,05 vs Isquemia

Os dados representam média ± desvio padrão

Os dados da Tabela 2 demonstram os valores de PU dos animais submetidos à isquemia renal por 30 minutos. Valores superiores da excreção de PU foram observados nos ratos com isquemia renal quando comparados com o grupo SHAM, indicando desequilíbrio redox e presença de lesão oxidativa. O tratamento com sinvastatina induziu redução dos valores de PU, denotando efeito antioxidante da sinvastatina.

**Tabela 2.** Valores de peróxidos urinários dos diversos grupos

Grupos	n <sup>a</sup>	Peróxidos Urinários (nmol/g de creatinina)
SHAM	8	5,6±0,9
Isquemia	8	13,5±0,8 <sup>a</sup>
Isq + Estatina	8	7,9±1,0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p < 0,05 vs SHAM

<sup>b</sup>p < 0,05 vs Isquemia

Os dados representam média ± desvio padrão

## DISCUSSÃO

A estatina, inibidor da HMG-CoA redutase, promove benefícios que são independentes de sua função primária de redução dos níveis de colesterol sanguíneo, incluindo ação anti-inflamatória, antioxidante e capacidade de proteção vascular que são conhecidos como seus efeitos pleiotrópicos<sup>(8)</sup>.

Na prática clínica, a redução da dislipidemia com o uso de pravastatina em pacientes portadores de doença renal crônica determinou diminuição da progressão da doença e da ocorrência de eventos cardiovasculares<sup>(6)</sup>. Estudos em modelos animais também confirmaram esse dado com a administração de estatina e observaram renoproteção com preservação da função glomerular, evitando a progressão da doença renal crônica<sup>(7)</sup>.

Neste estudo, o condicionamento com sinvastatina em animais submetidos à isquemia renal durante 30 minutos demonstrou proteção renal por meio da elevação de filtração glomerular mensurada pelo *clearance* de creatinina associado à elevação da OU, confirmando melhora da função tubular e redução dos níveis de PU indicando menores níveis de EROs.

Outros estudos em modelos animais reforçaram a ação das estatinas como protetor renal. O condicionamento com cerivastatina durante 5 dias confirmou a proteção renal em animais submetidos à LRAi<sup>(10)</sup>, além disso a administração de sinvastatina em modelo de I/R renal induziu redução de área de necrose tubular aguda, confirmada com dados histológicos e melhora funcional tubular<sup>(11)</sup>.

Estudos reiteram o poder da estatina como agente renoprotetor por sua ação anti-inflamatória e antioxidante, dois significativos mecanismos na LRAi. O efeito anti-inflamatório também pode ser relacionado à menor rejeição do enxerto por meio de efeitos imunomodulatórios e a inibição de fatores que ativam a cascata de resposta inflamatória<sup>(12)</sup>. A administração de fluvastatina em indivíduos dislipidêmicos induz redução dos níveis de lípidos e proteção antioxidante pela redução de marcadores de lesão oxidativa<sup>(13)</sup>.

## CONCLUSÃO

Sumariamente, o condicionamento com sinvastatina em animais submetidos à isquemia renal por 30 minutos conferiu proteção renal com o aumento do ritmo de filtração glomerular, melhora da função tubular e redução de marcadores de lesão oxidativa. Esses dados confirmam o efeito renoprotetor da sinvastatina, provavelmente, determinado pelo seu efeito pleiotrópico de antioxidação.

## REFERÊNCIAS

1. Pereira WA, organizador. Manual de transplante de órgãos e tecidos. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. História dos transplantes; p.1-7.
2. Clarkson MR, Brenner BM, organizador. O rim – referência rápida. 7a ed. Porto Alegre: 2007. Cap.17. p. 703-24.
3. Hladunewich MA, Corrigan G, Derby GC, Ramaswamy D, Kambham N, Scandling JD, et al. A randomized, placebo-controlled trial of IGF-1 for delayed graft function: a human model to study postischemic ARF. *Kidney Int.* 2003; 64(2): 593-602.
4. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17(6): 1503-20.
5. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths – the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney Int.* 2010; 77(1): 9-16.
6. Billings FT 4th, Pretorius M, Siew ED, Yu C, Brown NJ. Early postoperative statin therapy is associated with a lower incidence of acute kidney injury after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* [Internet]. 2010 [cited 2010 Jul 2]; 24(6):913-20. Available from: [http://www.jcvaonline.com/article/S1053-0770\(10\)00121-7/abstract](http://www.jcvaonline.com/article/S1053-0770(10)00121-7/abstract)
7. Sharyo S, Yokota-Ikeda N, Mori M, Kumagai K, Uchida K, Ito K, et al. Pravastatin improves renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the mevalonate pathway. *Kidney Int.* 2008; 74(5): 577-84.
8. Dezoti C, Watanabe M, Pinto CF, Neiva LB, Vattimo MF. Proteção funcional da enzima heme-oxigenase-1 na lesão renal aguda isquêmica e tóxica. *Acta Paul Enferm.* 2009; 22 (Especial-Nefrologia): 490-3.
9. Wolff SP. Ferrous ion oxidant in presence of ferric ion indicator xylenol orange for mensurament of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 1994; 233:182-9.
10. Gueler F, Rong S, Park JS, Fiebeler A, Menne J, Elger M, et al. Postischemic acute renal failure is reduced by short-term statin treatment in a rat model. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(9):2288-98.
11. Todorovic Z, Nesic Z, Stojanovic R, Basta-Jovanovic G, Radojevic-Skodric S, Velickovic R, et al. Acute protective effect of simvastatin in the rat modelo of renal ischemia-reperfusion injury: it is never too late for the pretreatment. *J Pharmacol Sci.* 2008; 107(4): 465-70.
12. Elisaf M, Mikhailidis DP. Statins and renal function. *Angiology.* 2002; 53(5):493-502.
13. Yilmaz M, Baykal Y, Kilia M, Kilic M, Sonmez A, Bulucu F, et al. Effects of statins on oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2004; 98(2):119-27.