

André Carnevali da Silva

**Efeitos da dose única de parecoxibe sobre a morte celular em
rins de ratos submetidos à hemorragia aguda**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Titular Yara Marcondes Machado Castiglia

Botucatu – SP

2014

Dedico este trabalho ao meu pai.

Além de ser um exemplo de chefe de família, nunca mediu esforços para me ver um cidadão ético, formado e satisfeito.

Dedico este trabalho à minha mãe,

minha primeira e eterna professora. Pessoa de essência angelical que costuma projetar seus sonhos e felicidades no próximo, especialmente nos filhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a minha companheira Juliana,

que sempre esteve ao meu lado, independente das dificuldades. Seu amor, apoio e carinho foram fundamentais para a concretização deste trabalho;

à minha filha Marina,

por quem exerço amor incondicional e genuíno. Ela me tranquiliza em momentos complicados, mesmo sem consciência plena disso;

aos meus irmãos, Alexandre e Tiago,

exemplos de inteligência e caráter. Passam a certeza de saber com quem posso contar.

AGRADECIMENTOS À MINHA ORIENTADORA

À Profª Titular Yara Marcondes Machado Castiglia,

que muito me ensinou neste processo de aprendizagem. Sem seu apoio e experiência, este trabalho não seria possível.

Obrigado por ter me aceito como seu aluno.

Obrigado por me fazer sentir capaz.

Obrigado pelas palavras e conselhos, mesmo que não referentes à pesquisa.

Obrigado por tudo.

Aos professores do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP, que muito me auxiliaram e instruíram neste período de doutoramento.

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP, Joana Jacirene Costa Teixeira, Sônia Maria Martins da Silva, André Renato Passaroni, Neli Aparecida Pavan e Tatiane de Fátima Pineiz, pelo auxílio em todas as etapas da pós-graduação;

às Doutoradas Mariana Takaku e Nathalie Izumi Iritsu, pela contribuição imprescindível na ocasião do estudo experimental;

às Doutoradas Marjorie de Assis Golim e Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, pela contribuição na execução e análise da Citometria de Fluxo;

aos técnicos do Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, pela ajuda na realização experimental deste trabalho;

ao meu colega de pós-graduação Erick Freitas Curi, pelas longas discussões acadêmicas que fazíamos quando chegávamos toda vez em Botucatu;

aos mantenedores do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória, local objeto da minha formação. Aqui cito sua principal representante e exemplo de dedicação profissional, Dra Maria da Penha Rodrigues D'Ávila;

aos demais colaboradores e funcionários do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória, principalmente aos colegas Hideki Nakamura, José Eduardo Pereira e Marcelo Esteves Teixeira, por manter o funcionamento dos trabalhos, mesmo com minhas ausências para realizar este trabalho;

ao amigo Dr. Leopoldo Muniz da Silva, pelos preciosos conselhos durante a pesquisa;

à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro a esta pesquisa, Processo número 2010/18469-7.

Da Silva AC. Efeitos da dose única de parecoxibe sobre a morte celular em rins de ratos submetidos à hemorragia aguda. Botucatu 2014. 71p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Resumo

Introdução: O parecoxibe tem comprovada eficácia analgésica no tratamento da dor, entretanto seus efeitos adversos renais não estão esclarecidos. Se por um lado os inibidores da ciclooxygenase-2 geram danos ao rim por alterar a dinâmica vascular renal, por outro lado bloqueiam a inflamação, e admite-se que a inflamação esteja relacionada com prejuízos ao rim. Em casos de hipoperfusão renal, como em situação de hemorragia e hipovolemia, há diminuição direta do aporte de nutrientes e a isquemia estimula a produção de mediadores inflamatórios. O objetivo desta pesquisa foi avaliar se a dose única de parecoxibe influi na ocorrência de apoptose ou necrose em rins de ratos submetidos à hemorragia. **Métodos:** Vinte e quatro ratos Wistars adultos anestesiados com sevoflurano foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=6): grupo placebo/ sem hemorragia (plac/ sh); grupo parecoxibe/ sem hemorragia (PCX/ sh); grupo placebo/ hemorragia (plac/ H) e grupo parecoxibe/ hemorragia (PCX/ H). Receberam bolus endovenoso em dose única de parecoxibe, 20mg/kg, ou placebo de acordo com a distribuição por grupos. Os animais dos grupos com hemorragia sofreram sangria correspondente a 30% da volemia durante 20 min. Após 80 min da administração do bolus de parecoxibe ou placebo e 30 min do fim da hemorragia, foi realizada nefrectomia bilateral para avaliação de necrose ou apoptose pela citometria de fluxo. **Resultados:** Os grupos que receberam parecoxibe (PCX/ sh e PCX/ H) apresentaram maior quantidade de necrose, menor quantidade de apoptose e maior quantidade de células viáveis renais pela citometria de fluxo. **Conclusão:** A dose única de parecoxibe gerou necrose renal, mas associou-se à proteção do órgão contra apoptose e à maior quantidade de células viáveis precocemente após hemorragia.

Palavras chave: ratos; rim; parecoxibe; hemorragia; necrose; apoptose

Da Silva AC. Effects of single dose of parecoxib on cell death in kidneys of rats submitted to acute hemorrhage. Botucatu 2014. 71p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology) – Botucatu Medical School, UNESP.

Abstract

Introduction. Parecoxib has proven analgesic efficacy in the treatment of pain, however its adverse renal effects are unclear. The cyclooxygenase-2 inhibitors generate damage to the kidney through renal vascular dynamic changes, on the other hand they block the inflammation, and it is believed that inflammation is related to kidney damage. In cases of renal hypoperfusion, as in situation of hemorrhage and hypovolemia, there is direct reduction of nutrient input and ischemia stimulates the production of inflammatory mediators. The aim of this study was to evaluate whether a single dose of parecoxib influences the occurrence of apoptosis or necrosis in kidneys of rats submitted to hemorrhage. **Methods.** Twenty-four adult Wistar rats anesthetized with sevoflurane were randomly distributed into four groups (n=6): placebo/ no hemorrhage (plac/ nh), parecoxib/ no hemorrhage (PCX/ nh); placebo/ hemorrhage (plac/ H) and parecoxib/ hemorrhage (PCX/ H). The animals received single intravenous bolus of parecoxib, 20mg/kg, or placebo according to the group distribution. The animals in groups with hemorrhage suffered bleeding corresponding to 30 % of volemia during 20 min. Eighty min after the administration of parecoxib or placebo and 30 minutes after the end of the hemorrhage period, bilateral nephrectomy was performed to assess necrosis or apoptosis by flow cytometry. **Results.** The groups which received parecoxib (PCX/ nh and PCX/ H) showed a higher amount of renal necrosis, minor amounts of apoptosis, and higher amount of viable cells by flow cytometry. **Conclusion.** A single dose of parecoxib generated renal necrosis, but was associated with kidney protection against apoptosis and with increased number of viable cells early after hemorrhage.

Key words: rats; kidney; parecoxib; hemorrhage; necrosis; apoptosis

Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas...

Luís Fernando Veríssimo

Esquema 1	Representação esquemática da inibição da síntese de prostaglandinas pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (adaptado de Sinha et al, 2013).....	17
Esquema 2	Representação esquemática da relação entre alguns subtipos de prostaglandinas e algumas de suas respectivas funções fisiológicas (adaptado de Harris, 2006)...	18
Esquema 3	Principais reações enzimáticas a partir do ácido araquidônico (adaptado de Livingston, 2000).....	19
Figura 1	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da variável peso (g) nos grupos estudados.....	34
Figura 2	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da variável temperatura (°C) no momento inicial (Mi) nos grupos estudados.....	37
Figura 3	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da variável pressão arterial média (mmHg) no momento inicial (Mi) nos grupos estudados.....	37
Figura 4	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da variável hematócrito (%) no momento inicial (Mi) nos grupos estudados.....	38
Figura 5	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da variável temperatura (°C) no momento final (Mf) nos grupos estudados.....	41
Figura 6	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da variável pressão arterial média (mmHg) no momento final (Mf) nos grupos estudados.....	41
Figura 7	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da variável hematócrito (%) no momento final (Mf) nos grupos estudados.....	42
Figura 8	Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu parecoxibe e que não foi submetido à hemorragia (PCX/ sh).....	47
Figura 9	Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu placebo e que não foi submetido à hemorragia (plac/ sh).....	48
Figura 10	Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu placebo e que foi submetido à hemorragia (plac/ H).....	49
Figura 11	Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu parecoxibe e foi submetido à hemorragia (PCX/ H).....	50
Figura 12	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células necrosadas representadas pelo iodeto de propídeo (PI) dos rins esquerdos (RE) nos grupos estudados.....	51
Figura 13	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células em apoptose avançada dos rins esquerdos (RE) nos grupos estudados.....	51
Figura 14	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células viáveis dos rins esquerdos (RE) nos grupos estudados.....	52
Figura 15	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células em estágios de apoptose precoce dos rins esquerdos (RE) nos grupos estudados.....	52
Figura 16	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células necrosadas dos rins direitos (RD) nos grupos estudados.....	53

LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

Figura 17	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células em estágio de apoptose avançada dos rins direitos (RD) nos grupos estudados.....	53
Figura 18	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células viáveis dos rins direitos (RD) nos grupos estudados.....	54
Figura 19	Representação gráfica (tipo <i>boxplot</i>) da porcentagem de células em estágios de apoptose precoce do rim direito nos grupos estudados.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias, desvios padrão, medianas, menores valores e maiores valores referentes ao peso (em grama) dos animais dos grupos estudados.....	33
Tabela 2	Resultados dos testes de comparação do peso entre os grupos.....	33
Tabela 3	Caracterização da amostra: estatísticas descritivas dos resultados das variáveis temperatura, pressão arterial média e hematócrito – momento inicial.....	35
Tabela 4	Resultados dos testes de comparação entre os grupos quanto aos valores de temperatura, pressão arterial média e hematócrito – momento inicial.....	36
Tabela 5	Caracterização da amostra: estatísticas descritivas das variáveis temperatura, pressão arterial média e hematócrito – momento final.....	39
Tabela 6	Resultados dos testes de comparação entre os grupos para valores de temperatura, pressão arterial média e hematócrito – momento final.....	40
Tabela 7	Caracterização da amostra: estatísticas descritivas das variáveis necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis dos rins esquerdos.....	43
Tabela 8	Caracterização da amostra: estatísticas descritivas das variáveis necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis dos rins direitos.....	44
Tabela 9	Resultados dos testes de comparação entre os grupos: variáveis necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis dos rins esquerdos.....	45
Tabela 10	Resultados dos testes de comparação entre os grupos: variáveis relacionadas com a citometria de fluxo que indicam porcentagem de morte celular nos rins direitos: necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis.....	46

APRESENTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO.....	16
<i>Justificativa.....</i>	25
2 OBJETIVO.....	27
3 MATERIAL E MÉTODO.....	28
3.1 Grupos Experimentais.....	28
3.2 Sequência Experimental.....	28
3.3 Avaliação por Citometria de Fluxo.....	30
3.4 Atributos Estudados.....	32
3.5 Método Estatístico.....	32
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7 CONCLUSÃO.....	63
8 REFERÊNCIAS.....	64

APRESENTAÇÃO

Este texto trata da relação de um analgésico com a morte de células do rim em vigência de hipovolemia causada por sangramento. É um assunto, no mínimo, razoável para explanação, pois os profissionais da saúde, em sua prática, principalmente os anestesiológicos, prescrevem analgésicos e devem trabalhar de forma a minimizar os possíveis prejuízos advindos da intervenção médica a que submetem seus pacientes. Além disso, estão constantemente à frente de pacientes que sofrem sangramentos.

Portanto, serão abordados os assuntos '*sangramento*', '*analgesia*' e '*proteção de órgãos*' que, apesar de serem tópicos distintos dentro do escopo da prática da medicina e da anestesiologia, apresentam-se corriqueiramente em circunstâncias simultâneas, pois a rotina de trabalho pode se mostrar em contexto muito dinâmico – não é raro encontrarmos situações que envolvem a necessidade de conhecimento desses três assuntos.

Desse modo, contribuir para a geração de maiores conhecimentos a respeito da intersecção desses temas é a principal finalidade deste trabalho. Para isso, foi praticado um estudo que utilizou a experimentação animal, determinado analgésico e a indução de estado hipovolêmico por perda sanguínea. A proteção do órgão (relacionada com a quantidade de morte celular) foi analisada por estatística, o que classifica este estudo como quantitativo.

O analgésico utilizado foi o parecoxibe. Sua escolha foi baseada em dois motivos. Primeiro, porque este medicamento apresenta seletividade na inibição da ciclooxigenase (COX). Este aspecto, que será mais bem abordado adiante, seria uma evolução para esta classe de medicamentos, pois gera analgesia com menos efeitos colaterais, pelo menos em teoria (Nussmeier et al, 2006). Em segundo lugar, o parecoxibe é o único medicamento de sua classe que está disponível para uso venoso (Cheer & Goa, 2001), e esta é a via de administração mais utilizada pelo anestesiológico.

O estado de hipovolemia por perda sanguínea foi obtido através de retirada de sangue de modo sistemático baseado em estudos anteriores (de Souza Silva et al, 2006;

Diego et al, 2007) e posteriormente confirmado por leitura de teste amplamente aceito para tal (hematócrito).

O órgão analisado neste estudo foi o rim. Foi indicado porque existe forte associação apresentada na ciência entre o uso de inibidores da COX e a segurança das funções renais e sua preservação (Clive & Stoff, 1984). Esta relação é baseada principalmente em mecanismo muito difundido e que estará contemplado adiante. Mas, de qualquer modo, determinar a segurança do uso de medicamentos em situações comuns, como hipovolemia por sangramento, parece ser uma necessidade científica para aprimorar a prática clínica.

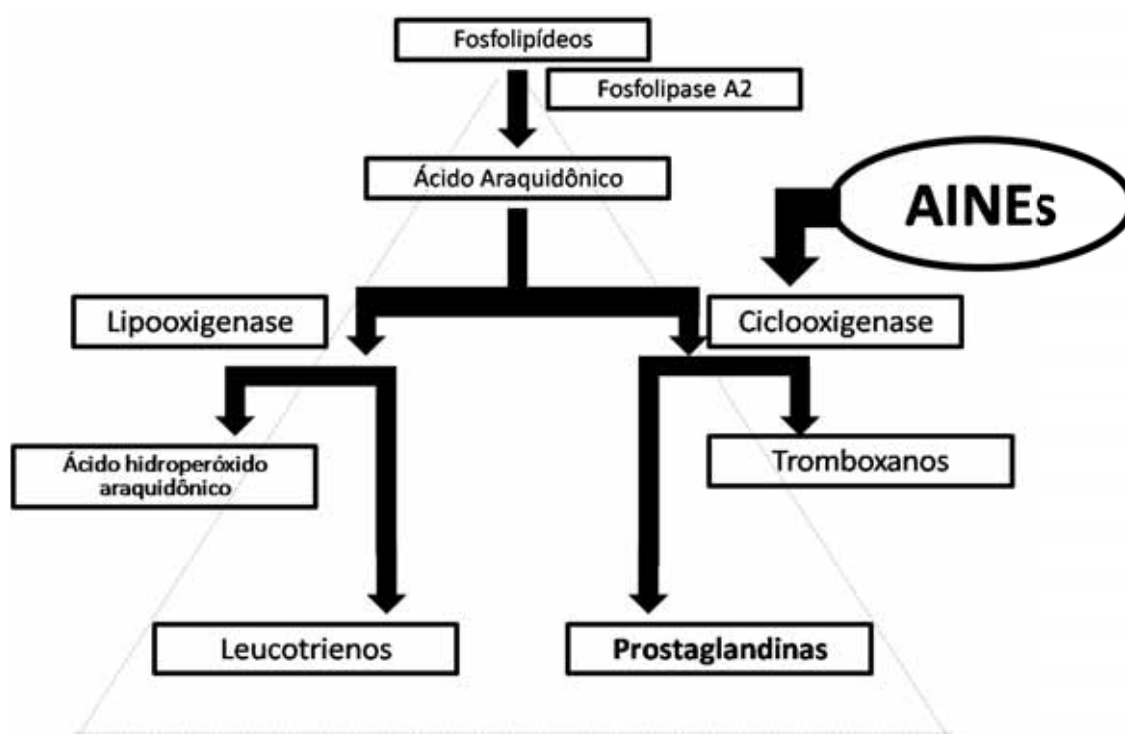
A segurança ou proteção desse órgão, neste estudo, foi analisada através da quantidade de morte celular ocorrida após a intervenção experimental. Para isso, foram utilizados os critérios morfológicos de morte celular, que são, basicamente, apoptose e necrose. E, após a determinação de suas quantidades relativas, através de citometria de fluxo (que também é tema que será explanado posteriormente), os valores obtidos foram tratados e discutidos para se definir a conclusão do estudo.

1 INTRODUÇÃO

Um importante texto científico foi publicado em 2010 (Merry et al) a respeito dos padrões internacionais da anestesia segura. Este artigo considerou os contextos de localidades mundiais para a prática da anestesiologia e considerou alguns padrões mínimos ou obrigatórios – o que é chamado de *altamente recomendável* na terminologia criada pela Organização Mundial de Saúde. Este texto, portanto, indica o que é básico para um procedimento anestésico. Diversos elementos foram classificados assim e *alívio da dor* aparece de modo enfático. Desse modo, conclui-se que o tratamento da dor e consequentemente o uso de analgésicos vão muito além do que simples sugestão no escopo da prática.

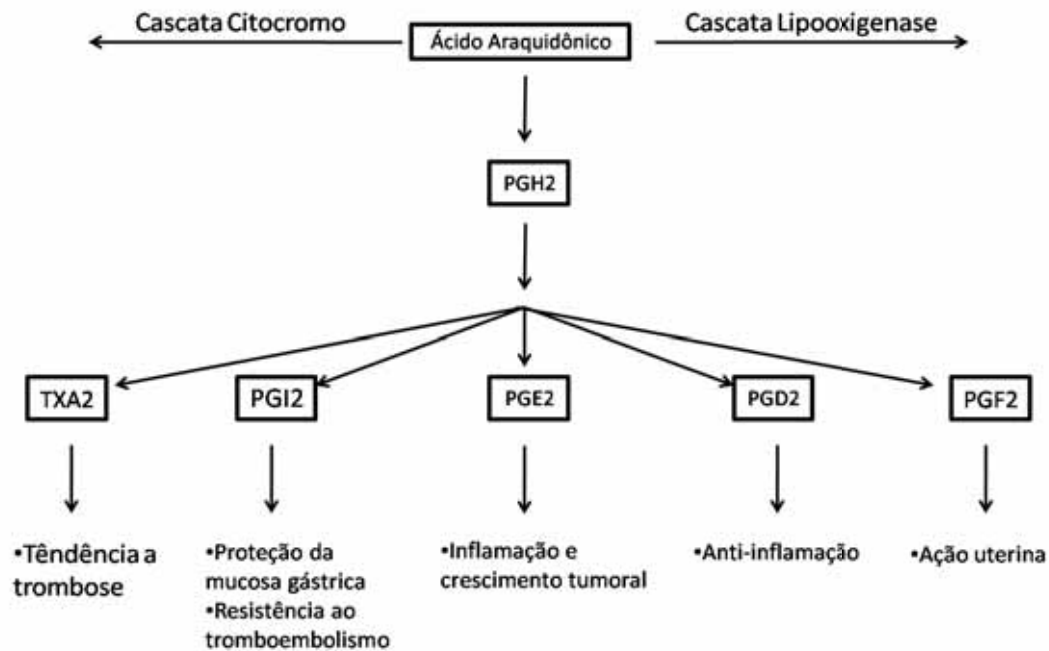
Dentre as formas de promover analgesia, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são medicamentos amplamente utilizados na prática clínica – estima-se que seu uso mundial ultrapasse 30 milhões de administrações por dia (Singh & Triadafilopoulos, 1999). São medicamentos também muito utilizados no contexto perioperatório, pois mostram-se eficazes na dor de intensidade moderada e grave (Fredheim et al, 2011) e reduzem a necessidade do uso de morfina no pós-operatório (Maund et al, 2011).

O mecanismo de ação dos AINEs baseia-se na inibição da síntese de prostaglandinas (PGs) (Vane, 1971). As PGs são dos principais mediadores da inflamação, dor e febre. São sintetizadas a partir do ácido araquidônico, e esta reação é catalisada pela enzima COX, referida anteriormente como prostaglandina-sintetase (Livingston, 2000). Os AINEs bloqueiam a formação de PGs por ligação com a COX e inibição da mesma (Sinha et al, 2013), como mostrado no esquema 1.



Esquema 1. Representação esquemática da inibição da síntese de prostaglandinas pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (adaptado de Sinha et al, 2013)

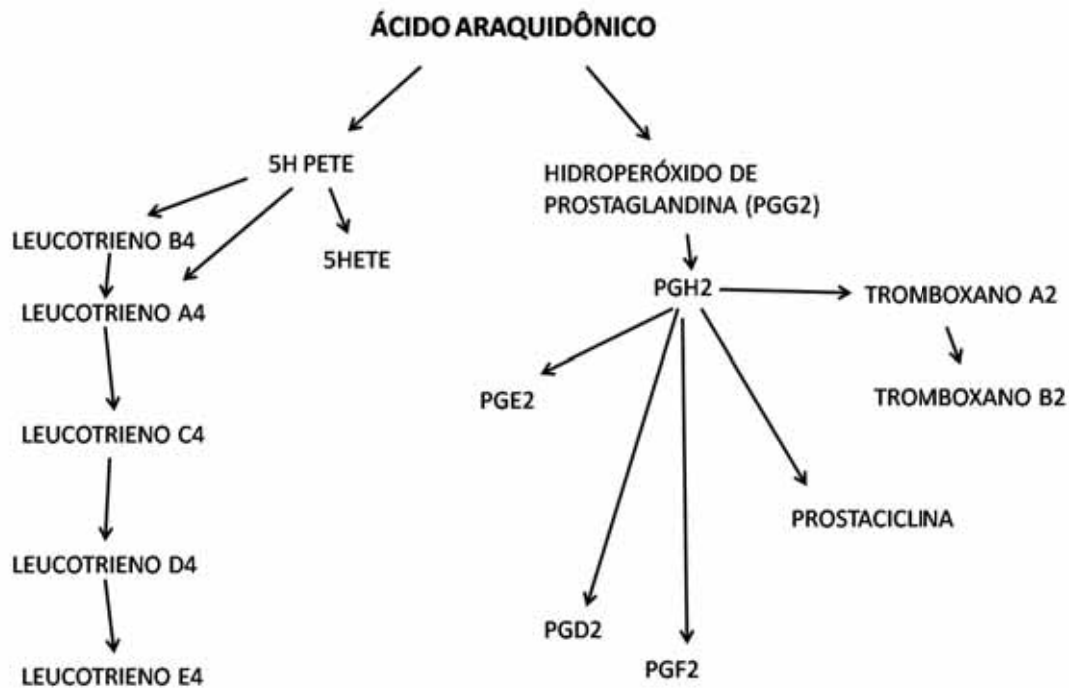
Assim, ao bloquear as PGs, promove-se a redução da dor e inflamação. Ocorre, porém, que as PGs também exercem outras funções, como mediadoras - ação nos vasos sanguíneos e na proteção gástrica (Wang & Doboys, 2006), controle do fluxo sanguíneo renal, hemostasia e respostas autoimunes (Vane & Botting, 1998). Como consequência, a utilização de AINEs pode gerar eventos indesejáveis pelo bloqueio destas funções, como se pode observar no esquema 2.



PGH2 - Prostaglandina H2; TXA2 - Tromboxano A2; PGI2 - Prostaglandina I2;
 PGE2 - Prostaglandina E2; PGD2 - Prostaglandina D2; PGF2 - Prostaglandina F2

Esquema 2. Representação esquemática da relação entre alguns subtipos de prostaglandinas e algumas de suas respectivas funções fisiológicas (adaptado de Harris, 2002)

O esquema 3 mostra as principais reações enzimáticas a partir do ácido araquidônico. É possível observar que todo o lado direito da figura está relacionado com a COX. Desse modo, bloquear esta enzima causa inibição de uma série de mediadores, como subtipos de PGs, prostaciclina e tromboxano A₂ (Livingston, 2000). Entretanto, ocorre que apenas um subtipo (Prostaglandina E2) é o responsável principal pela inflamação, enquanto que os demais mediadores são relacionados com outras funções fisiológicas. Assim, bloquear a COX gera o esperado efeito anti-inflamatório além de demais efeitos, relacionados com demais subtipos de PGs (além da própria PGE2), que podem ser considerados adversos.



5H PETE - Ácido 5 hidroxieucosatetrânico; 5HETE - Ácido 5 hidroxieucosatetrânico; PGH2 - Prostaglandina H2; PGE2 - Prostaglandina E2; PGD2- Prostaglandina D2; PGF2 - Prostaglandina F2

Esquema 3. Principais reações enzimáticas a partir do ácido araquidônico (adaptado de Livingston, 2000).

Desse modo, são evidentes os possíveis efeitos indesejáveis causados pelo bloqueio das PGs. No entanto, há duas décadas, uma segunda isoforma da COX foi descoberta. A diferença mais significativa entre as duas isoformas é que, em muitas das situações estudadas, uma isoforma parece ser constitutiva, ou seja, mostra-se como componente normal da célula e está presente em concentração relativamente constante. A outra isoforma parece ser induzida, isto é, o aumento de sua concentração é verificado principalmente em resposta a algum estímulo. Estes estímulos podem ser, por exemplo, moléculas derivadas da própria inflamação (Xie et al, 1991).

Foi constatado, inclusive, que a isoforma constitutiva da COX (COX-1) associa-se normalmente aos tecidos em que as PGs têm função fisiológica, como proteção da mucosa gástrica, enquanto que a expressão da COX-2 é mais elevada em tecidos inflamados (Batlouni, 2010). Assim, verificou-se a necessidade de criar uma

forma de inibir seletivamente as funções induzidas da COX (COX-2) e preservar as ações fisiológicas da COX-1.

Desse modo, os efeitos adversos, principalmente gástricos (ulceração e sangramento), renais (diminuição da perfusão renal e do ritmo de filtração glomerular) e de hemostasia (interferência na agregação plaquetária), derivados da inibição da COX-1, poderiam ser minimizados com a inibição seletiva da COX-2 (Nussmeier et al, 2006). Como consequência, foram desenvolvidos medicamentos com capacidade de inibir seletivamente a COX-2, que poderiam, portanto, reduzir os efeitos indesejáveis com eficácia semelhante à dos AINEs convencionais que inibem ambas as isoformas (Lloyd et al, 2009).

A partir do desenvolvimento dos inibidores seletivos da COX-2 (COXIBEs), vários estudos foram criados para definir seu potencial de toxicidade em comparação aos inibidores convencionais da COX (Jones & Lamdin, 2010). Em relação à toxicidade renal, admite-se teoricamente o potencial nefrotóxico de todos os inibidores da COX, porém os efeitos adversos renais dos COXIBEs não estão esclarecidos (Cheng & Harris, 2005).

Pois, se por um lado os COXIBEs podem prejudicar a função renal ao inibir as PGs – e as PGs vasodilatadoras derivadas da COX-2 mantêm o fluxo sanguíneo renal e o ritmo de filtração glomerular (Harris, 2006), por outro lado, alguns autores citam experimentos que evidenciam proteção renal com o uso destes fármacos (Komers et al, 2001). Assim, observa-se que é possível encontrar na literatura conclusões controversas sobre o assunto.

Dentre alguns autores que evidenciaram proteção, Norregaard et al (2005), por exemplo, observaram aumento da expressão da COX-2 na medula renal de ratos submetidos à obstrução ureteral bilateral aguda e verificaram efeitos benéficos do parecoxibe (um exemplo de fármaco COXIBE) na prevenção das alterações do transporte de sódio. Höcherl et al (2009) verificaram que o pré-tratamento com o uso do mesmo fármaco melhorou o *clearance* de creatinina em ratos submetidos a modelo experimental de sepse grave com infusão de endotoxinas, além de ter prevenido reduções do *clearance* de para-aminohipurato após agressão renal, tanto por endotoxemia quanto por isquemia-reperfusão. Feitoza et al (2005) observaram melhora

da função renal e redução de necrose tubular após agressão promovida por isquemia-reperusão em camundongos tratados com rofecoxibe, que é outro COXIBE.

Dentre exemplos de autores que demonstraram evidências de prejuízo renal com o uso de COXIBEs, citam-se Patel et al (2007), que observaram aumento da disfunção e lesão renais em ratos submetidos à agressão de isquemia-reperusão por inibição, pelo parecoxibe, dos metabólitos derivados da ação da COX-2. Whelton et al (2000) demonstraram semelhança entre COXIBEs e AINEs convencionais no desenvolvimento de edema das extremidades inferiores e de hipertensão, diferentemente do placebo. Swan et al (2000) evidenciaram reduções significativas nas taxas de filtração glomerular de pacientes tratados com rofecoxibe.

Tais exemplos são poucos no universo desse assunto, mas é possível concluir que existem importantes estudos publicados sobre a relação entre a inibição da COX-2 e a função renal, alguns demonstrando relação favorável, outros não. Esta relação pode ser explicada pelo papel desempenhado pelas PGs no rim, sua regulação e seu balanço. Além disso, é marcante a presença da enzima COX-2 neste órgão.

Pois se sabe que em rins de mamíferos adultos a enzima COX-2 expressa-se de modo importante na mácula densa, na região cortical da alça ascendente fina e nas células intersticiais medulares (Harris, 2002). Além disso, a expressão constitutiva da COX apresenta-se com ambas as isoformas no rim, ou seja, a COX-2 é constante (além de induzida) neste tecido (Giovanni & Giovanni, 2002). Assim, o suposto benefício dos COXIBEs em bloquear as funções da COX apenas em tecido inflamado (induzido), preservando as funções fisiológicas, não ocorre no rim, uma vez que a COX-2 é também constante neste local.

Logo, com o uso de COXIBEs, são bloqueados os prostanóides derivados da ação da COX-2 que desempenham funções importantes na fisiologia renal. Dentre estas funções, destacam-se a manutenção do fluxo sanguíneo renal, a taxa de filtração glomerular, a perfusão medular renal, a excreção tubular de sódio e água, a liberação de renina e a regulação da pressão arterial sistêmica (Gambaro & Perazella, 2003). Tais bloqueios acometem o rim principalmente em situações de hipoperfusão renal (Cheng & Harris, 2005).

Isso é explicado porque as PGs vasodilatadoras derivadas da ação da COX-2 mantêm o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular através da oposição à constrição das arteríolas aferentes em resposta aos vasoconstritores. Assim, em situações de hipovolemia, em que a resposta compensatória mais precoce é a vasoconstrição causada pela atividade simpática e pelo sistema renina-angiotensina (de Souza Silva et al, 2006), a inibição da COX-2 é teoricamente deletéria.

Dessa forma, constata-se que o uso de COXIBs, apesar de útil na prevenção da dor pós-operatória na maioria dos procedimentos cirúrgicos, pode prejudicar a perfusão renal agravada por situações de hipovolemia, como na hemorragia intraoperatória, o que propicia o aparecimento de isquemia renal.

Todavia, por outro lado, admite-se que o bloqueio da inflamação pelo uso dos COXIBs pode ser favorável ao rim pela inibição da ação prejudicial das moléculas inflamatórias no tecido renal – reconhece-se que a inflamação desempenha importante papel na fisiopatologia das lesões renais (Bonventre & Zuk, 2004). Há evidências em modelos experimentais que relacionam alterações morfológicas e funcionais em células endoteliais renais e do epitélio tubular com mediadores inflamatórios elevados, como em casos de sepse e isquemia (Akçay et al, 2009).

Esta relação entre anti-inflamação e proteção renal é bem conhecida. Alguns autores dedicaram-se a esta relação ao estudar as propriedades anti-inflamatórias de alguns fármacos, como os agentes anestésicos voláteis e suas relações com o rim. Lee et al (2006), por exemplo, estudaram os efeitos do sevoflurano sobre a lesão renal *in vitro*, mimetizando uma situação de inflamação, pelo tratamento de culturas de células renais com fator de necrose tumoral, e demonstraram os efeitos protetores anti-inflamatórios e antinecróticos deste anestésico. Outro estudo, que utilizou modelo experimental de isquemia-reperfusão em rim de ratos, demonstrou que os agentes anestésicos voláteis conferem significativa proteção renal durante e após a isquemia deste órgão, por suas propriedades anti-inflamatórias (Lee et al, 2004). Semelhantemente, Curtis et al (2008) observaram que ratos anestesiados com sevoflurano apresentaram melhores resultados na histologia renal quando comparados com aqueles anestesiados com S(+)-cetamina, após isquemia renal.

Percebe-se, portanto, que efeitos anti-inflamatórios parecem proteger o rim. Desse modo, mesmo ao ponderar sobre as repercussões negativas relacionadas com o bloqueio da síntese dos prostanóides causado pelos COXIBEs, é razoável considerar seus benefícios ao rim advindos do bloqueio da inflamação. Esta dualidade provavelmente gera a controvérsia citada anteriormente referente à proteção renal com o uso de COXIBEs.

Ao menos em teoria, essa dualidade também ocorre em caso de sangramento, pois foi verificado que a hemorragia aumenta a produção e liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea (Ayala et al, 1990), e isso acarreta redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular, além de estimular a síntese de outros mediadores pró-inflamatórios e aumentar a permeabilidade, o depósito de fibrina e a infiltração celular nos glomérulos (Donnahoo et al, 1999).

Em caso de sangramento, portanto, se por um lado os COXIBEs podem propiciar ou agravar a isquemia renal em situações de vasoconstrição gerada por hipovolemia, por outro conhece-se a relação entre hemorragia e liberação de mediadores inflamatórios, e os COXIBEs podem ser favoráveis, neste caso, à inibição da inflamação gerada por esta circunstância.

Conclui-se, então, que há necessidade de encontrar respostas sobre este dilema. Os COXIBEs são benéficos para a recuperação pós-operatória ao reduzir a dor e o consumo de opióides, mas sua relação com a proteção renal apresenta-se controversa, tanto em experimentações apresentadas pela literatura em situações diversas, quanto em teoria, como em caso de hipovolemia por perda sanguínea.

Uma prática modernamente aceita para avaliação de proteção renal (como de outros órgãos) tem sido a análise em nível molecular ou celular (Gluhovschi et al, 2004) e a quantidade de morte celular é um método amplamente utilizado. O modo morfológico, que é uma forma de distinguir o tipo de morte celular, varia basicamente entre necrose e apoptose (Kroemer et al, 2009).

Necrose ou apoptose podem ser observadas em modelos experimentais de lesão renal tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Lieberthal et al, 1998), e um dos grandes avanços na compreensão de morte celular foi o reconhecimento de que os caminhos associados à apoptose podem ser decisivos na forma de lesão celular associada com necrose (Ueda et

al, 2000). Além disso, foram encontradas evidências concretas que relacionam a classificação morfológica da morte celular com doenças renais. Como exemplo, a pesquisa de Ortiz et al (2003), que sugere que a apoptose e suas moléculas reguladoras contribuem para a patogênese da insuficiência renal, e a de Bonegio & Lieberthal (2002), que demonstra que a apoptose de células tubulares é fator primário e fundamental para a fisiopatologia do dano renal por isquemia.

Uma das formas de avaliar a morfologia celular é com o uso de citometria de fluxo. O método, além de identificar e quantificar as células mortas (ou em processo de morte), também revela o modo como estas células morreram – se por apoptose ou necrose (Pozarowski et al, 2004). A citometria de fluxo avalia as propriedades de dispersão de luz ou alterações na superfície da membrana, o que pode indicar ou diferenciar os tipos de morte celular (Bertho et al, 2000). Uma das alterações de membrana celular em apoptose, por exemplo, é a translocação da fosfatidilserina (FS) da camada de dentro da membrana para fora. A Anexina V é uma proteína com alta afinidade à FS que pode ser utilizada neste método como elemento que permite detectar a exposição da FS sobre a membrana celular (Vermes et al, 1995). Então, dessa forma, sinaliza-se a apoptose. De modo análogo, com o uso de outros marcadores, encontra-se a porcentagem de necrose e assim é possível obter a quantidade e os tipos morfológicos de morte celular e de células viáveis, o que possibilita conclusão para o estudo.

JUSTIFICATIVA

Na medida em que a prática médica se desenvolve, torna-se cada vez mais prudente gerar conhecimentos para aprimorar a segurança das intervenções clínicas. Este possivelmente é um dos paradigmas mais ativos da ciência médica moderna.

Em determinadas áreas do conhecimento médico, procurar compreender os possíveis danos relacionados com a execução da medicina é tão importante quanto conhecer a eficácia da terapêutica.

No caso da anestesiologia, tratar a dor cirúrgica é uma das principais ações. Provavelmente, é considerada como fundamental por pacientes ou por outros profissionais da saúde. Contudo, reconhecem-se as possíveis e diversas ocasiões em que a terapia antálgica ou analgésica trouxe prejuízos ao organismo – desde os mais graves, como morte ou sequelas, até os despercebidos. Isto gera os inúmeros estudos científicos que testam a segurança das intervenções e que ajudam a promover a qualidade na execução desta especialidade.

Dentre as várias formas de conceber o tratamento da dor, o medicamentoso é o principal. E os anti-inflamatórios não hormonais são exemplos populares e eficazes. Assim, possivelmente por esta notoriedade, a ciência produziu vários estudos no sentido da compreensão desta categoria de fármacos, e proporcionou a criação de uma nova classe, teoricamente isenta de determinados efeitos colaterais.

Apesar de a promessa da segurança integral desta classe não se ter consolidado (pela ocorrência de alguns efeitos), estes medicamentos estão disponíveis para uso clínico e têm eficácia comprovada. Desse modo, torna-se praticamente essencial descobrir as situações em que estes fármacos apresentam-se seguros, e esta tarefa deve ser considerada complexa, haja vista a variedade de circunstâncias possíveis.

Dentre as situações vivenciadas pelo anestesiológico, observa-se desde a trivial, básica e esperada, até a incomum, complexa e imprevista. Uma condição normalmente não esperada, mas também não incomum, é a ocorrência de sangramento. E sangramento, neste caso, deve ser enfaticamente considerado, pois assemelha-se com a classe de analgésicos citada anteriormente (que será representada pelo parecoxibe) – ambos possuem forte associação com a fisiologia renal.

Desse modo, gerar conhecimento a respeito da segurança desse fármaco para o rim em vigência de sangramento pode trazer alguma contribuição no caminho da geração de evidências para uma prática médica com mais qualidade.

2 OBJETIVO

Determinar a relação, por citometria de fluxo, dos efeitos da dose única de parecoxibe e hemorragia aguda com a morte celular em rins de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Após a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, o estudo foi desenvolvido com 24 ratos da raça Wistar, machos, com pesos superiores a 300g, fornecidos pelo Biotério Central do campus de Botucatu, UNESP, os quais foram distribuídos em quatro grupos, de forma aleatória realizada eletronicamente.

3.1 *Grupos Experimentais*

- Grupo placebo/ sem hemorragia (plac/ sh): ratos mantidos normovolêmicos e que receberam solução de NaCl 0,9% por via intravenosa (IV) (2 mL/kg) após anestesia (n = 6);
- Grupo parecoxibe/ sem hemorragia (PCX/ sh): ratos mantidos normovolêmicos e que receberam parecoxibe (20mg/kg em 2 mL/kg de solução de NaCl 0,9% IV) após anestesia (n = 6);
- Grupo placebo/ hemorragia (plac/ H): ratos submetidos à hemorragia de 30% da volemia e que receberam solução de NaCl 0,9% (2 mL/kg IV) após anestesia (n = 6);
- Grupo parecoxibe/ hemorragia (PCX/ H): ratos submetidos à hemorragia de 30% da volemia e que receberam parecoxibe (20mg/kg em 2 mL/kg solução de NaCl 0,9% IV) após anestesia (n = 6).

O número definido de animais para este estudo segue os quesitos ditados pela literatura especializada em metodologia (Volpato, 2007), além de estar baseado em recente estudo no qual foram encontradas evidências significativas com número de elementos semelhantes (Caetano et al, 2011).

3.2 *Sequência experimental*

Os animais foram induzidos à anestesia geral com sevoflurano e a manutenção anestésica foi realizada com o mesmo agente (Vaporizador Ohmeda, EEUU) em

concentrações necessárias para a manipulação cirúrgica. Todos os animais estiveram em ventilação espontânea com fração inspirada de oxigênio aproximada de 0,3. Após a instalação da hipnose, os animais foram colocados entre duas bolsas térmicas pré-aquecidas com o objetivo de manter a temperatura corporal entre 37,0 e 38,5°C.

Em todos os animais:

- 1) utilizou-se termômetro digital acoplado em monitor multiparamétrico (Datex Engstron, Finlândia) para leitura contínua da temperatura retal;
- 2) dissecou-se a veia jugular interna direita e introduziu-se *venocath* número 24 G. Por esta via foi iniciada a administração de solução de Ringer lactato na velocidade de 5 mL/kg/h e a administração de bolus de parecoxibe (20mg/kg em 2 mL/kg de solução de NaCl 0,9%) ou placebo (solução de NaCl 0,9%, 2mL/kg) de acordo com a distribuição dos grupos. As soluções foram preparadas por técnico que conhecia o estudo e as seringas que as continham foram envoltas em papel opaco. Dessa forma, o pesquisador não tinha conhecimento do conteúdo da solução. A dose escolhida de parecoxibe baseou-se em estudo prévio que utilizou este fármaco em modelo de isquemia/reperfusão em ratos (Sivarajah et al, 2005);
- 3) dissecou-se a artéria carótida esquerda, cateterizando-a com *venocath* número 24 G para leitura da pressão arterial média (PAM). O *venocath* foi conectado ao aparelho Datex Engstron (Finlândia) que forneceu a leitura contínua da PAM dos animais.

Após 30 minutos da administração do parecoxibe ou placebo (nos grupos correspondentes), nos ratos dos grupos que não sofreram hemorragia foi colhida amostra de sangue, pela artéria carótida, para leitura do hematócrito (momento Mi). Neste mesmo tempo, os animais dos grupos com hemorragia sofreram sangria correspondente a 30% da volemia pela artéria carótida. O volume de sangue a ser retirado foi dividido em três volumes de 10%, com intervalo de 10 min entre as retiradas. Da primeira sangria de 10% colheu-se a amostra para leitura do hematócrito nos grupos plac/ H e PCX/ H (momento Mi). A volemia foi calculada como sendo igual a 6% dos pesos corpóreos (Erni et al, 1995). Em cada tempo de sangria (ou nos períodos

correspondentes nos grupos sem hemorragia) foram observadas a PAM e temperatura retal.

Trinta minutos após o terceiro tempo de sangria (ou tempo correspondente nos grupos sem hemorragia), foi coletada amostra sanguínea para determinação do hematócrito (momento final Mf). Na determinação do hematócrito foi empregado o método do microhematócrito, utilizando-se o aparelho Centremicro da Fanem (Brasil), sendo o resultado expresso em porcentagem.

Neste momento (Mf), foi realizada laparotomia para nefrectomia bilateral. Imediatamente após, os ratos ainda anestesiados sofreram eutanásia com injeção IV de pentobarbital sódico em dose necessária para a cessação da atividade cardíaca. Os rins foram encaminhados a fresco para laboratório que realiza citometria de fluxo.

3.3 Avaliação por Citometria de Fluxo

O método da citometria de fluxo avalia a viabilidade e a morte celulares (apoptose ou necrose). Os fragmentos dos rins destinados a esta análise foram colocados em cultura apropriada e com as células extraídas de cada rim utilizou-se *kit* constituído de anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) e iodeto de propídeo (Pharmingen®, USA) para detecção de apoptose ou necrose. Assim, possibilita-se determinar quantitativamente o percentual de viabilidade em população celular amostral (células vivas, mortas e em processo apoptótico inicial), definido pelos parâmetros de tamanho e granulosidade celulares.

As análises foram realizadas no citômetro de fluxo modelo FACSCalibur® (Becton Dickinson™, EEUU), constituído de três detectores de fluorescências, com uso dos programas CellQuest® e Paint-a-gate (BD).

A citometria de fluxo avalia a apoptose em estágio inicial pelo marcador anexina-V, a necrose celular pelo marcador iodeto de propídeo e a apoptose tardia pela marcação conjunta de anexina-V com iodeto de propídeo.

Em estágios iniciais do processo apoptótico, ocorrem alterações da membrana plasmática e, entre estas, destaca-se a translocação da fosfatidilserina da superfície interior da membrana, expondo-a na superfície celular externa (Vermes et al, 1995). A

anexina V é uma proteína anticoagulante que se liga preferencialmente aos fosfolipídios carregados negativamente. No início do processo apoptótico, ocorre rompimento da assimetria fosfolipídica, levando a exposição da anexina V à fosfatidilserina no folheto externo da membrana citoplasmática (O'Donnell et al, 2010).

Alguns fosfolipídios, como fosfatidilcolina, estão principalmente no folheto externo da membrana celular. Outros, como o ácido fosfatídico, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina, são segregados no folheto interno. A exposição da fosfatidilserina no folheto externo é conhecida como importante sinal biológico. Ativação plaquetária e lesão de células endoteliais, por exemplo, causam rápida translocação da fosfatidilserina para a superfície externa da membrana celular. As células normais apresentam a proteína fosfatidilserina no interior de suas membranas celulares. Esta proteína é essencial para manter a conformação e o fluido da membrana celular. Nos estágios iniciais da apoptose (morte celular programada), a fosfatidilserina é exposta pela célula (lado exterior da membrana celular) como marcador de apoptose para as células fagocíticas (Seaton & Dedman, 1998).

A anexina V tem alta afinidade pela fosfatidilserina, portanto liga-se a ela intensamente. A apoptose encontrada no tecido submetido ao dano da isquemia/reperfusão lesa as células tubulares renais e reduz a função renal (Ueda et al, 1995).

Todas as células são impermeáveis ao iodeto de propídeo. Portanto, ele somente penetra na célula com ruptura de membrana, ligando-se ao seu DNA. É o que ocorre na morte celular por necrose. E o mesmo fenômeno não ocorre durante a apoptose.

A anexina V marcada com fluorocromo (como, por exemplo, o FITC), permite identificar células apoptóticas pela ligação à fosfatidilserina exposta na superfície externa e em combinação com fluorocromos de DNA, como iodeto de propídeo (PI), possibilitando a discriminação de células viáveis (FITC-/PI-), células em processo apoptótico precoce (FITC+/PI-) e células mortas (FITC+/PI+) (Koopman et al, 1994).

O pesquisador que realizou a citometria de fluxo não tinha conhecimento da condição do experimento.

3.4 *Atributos estudados*

Os atributos estudados foram:

- temperatura retal
- pressão arterial média
- hematócrito
- presença de necrose, apoptose e células viáveis nos rins

3.5 *Método Estatístico*

Os dados foram analisados inicialmente para determinação de normalidade, contudo, houve rejeição desta hipótese, tendo se optado, então, pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

O teste de Kruskal-Wallis é um método não paramétrico usado para mais de duas amostras e ele testa se um conjunto de amostras provém da mesma distribuição. É empregado para testar a hipótese nula de que todas as populações possuem distribuição igual, contra a hipótese alternativa de que possuem distribuições diferentes. A comparação dos grupos é realizada por meio da média dos postos (postos médios). Apesar de o teste de Kruskal-Wallis declarar diferença entre os grupos, não há indicação de quais grupos diferem um dos outros. Para isso, são necessários testes de múltiplas comparações, os chamados testes “post hoc”. Estes testes envolvem todas as comparações possíveis entre os grupos. Neste trabalho foi utilizado o teste de Dunn.

O nível de significância utilizado foi de 5%, e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, sendo p a probabilidade de erroneamente se concluir pela significância (Curi, 1998).

4 RESULTADOS

Os dados apresentados na tabela 1 representam resultados referentes ao peso dos animais de acordo com os grupos. Não houve diferença significativa em relação ao peso dos ratos segundo grupos ($p=0,058$), sendo, portanto, os animais de todos os grupos homogêneos quanto ao peso.

Tabela 1. Médias, desvios padrão, medianas, menores valores e maiores valores referentes ao peso (em grama) dos animais dos grupos estudados

Grupo	Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio padrão
plac/ sh	340	430	365,00	371,67	31,89
PCX/ sh	340	380	345,00	350,00	15,49
plac/ H	340	380	345,00	350,00	15,49
PCX/H	350	390	370,00	371,67	17,22

Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

Tabela 2. Resultados dos testes de comparação do peso entre os grupos

Grupos	Postos médios	(Resultado teste de Dunn)
plc/ sh	15,00	-
PCX/ sh	8,75	-
plc/ H	8,75	-
PCX/ H	17,50	-
p*	0,058	-

* p - valor referente ao teste de Kruskal-Wallis. Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

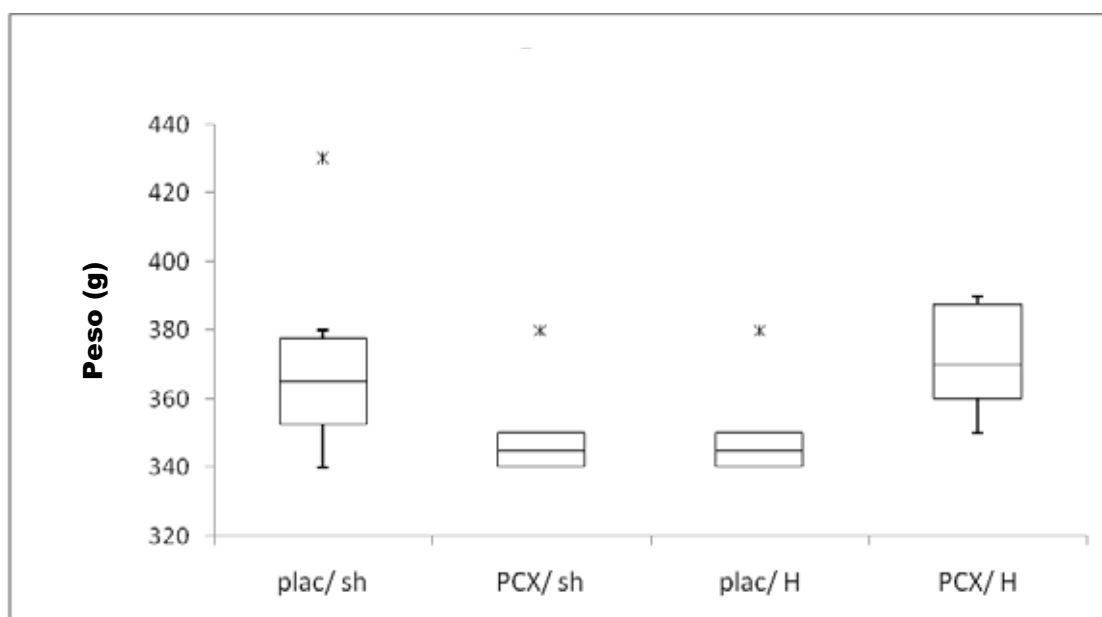


Figura 1. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da variável peso (g) nos grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. As marcas no gráfico representam *outliers*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, os grupos não apresentam diferenças significativas entre eles.

As tabelas 3 e 4 representam os dados encontrados no momento inicial para as variáveis temperatura, PAM e hematócrito. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos neste momento para estas variáveis.

Tabela 3. Caracterização da amostra: estatísticas descritivas dos resultados das variáveis temperatura, pressão arterial média (PAM) e hematócrito, todas em momento inicial

Variável	Grupo	Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Temperatura	plac/ sh	37,6	38,4	38,00	37,97	0,27
	PCX/ sh	37,1	38,1	37,75	37,60	0,41
	plac/ H	37,1	38,1	37,75	37,60	0,41
	PCX/ H	36,7	37,8	37,50	37,32	0,50
PAM	plac/ sh	53	94	77,50	75,33	17,35
	PCX/ sh	72	109	81,00	85,50	14,76
	plac/ H	72	109	80,50	85,00	15,23
	PCX/ H	62	129	81,50	85,67	23,75
Hematócrito	plac/ sh	40	47	43,50	43,17	2,48
	PCX/ sh	41	44	43,00	42,67	1,51
	plac/ H	41	44	43,00	42,67	1,51
	PCX/ H	40	44	43,50	43,00	1,55

Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

Tabela 4. Resultados dos testes de comparação entre os grupos quanto aos valores de temperatura, pressão arterial média (PAM) e hematócrito – momento inicial

Variável	Grupo	Postos médios	(Resultado teste de Dunn)
Temperatura	plc/ sh	18,00	-
	PCX/ sh	12,25	-
	plc/ H	12,25	-
	PCX/ H	7,50	-
	p*	0,078	-
PAM	plc/ sh	10,75	-
	PCX/ sh	13,83	-
	plc/ H	13,17	-
	PCX/ H	12,25	-
	p*	0,886	-
Hematócrito	plc/ sh	12,92	-
	PCX/ H	12,08	-
	plc/ H	12,08	-
	PCX/ H	12,92	-
	p*	0,993	-

* p - valor referente ao teste de Kruskal-Wallis. Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

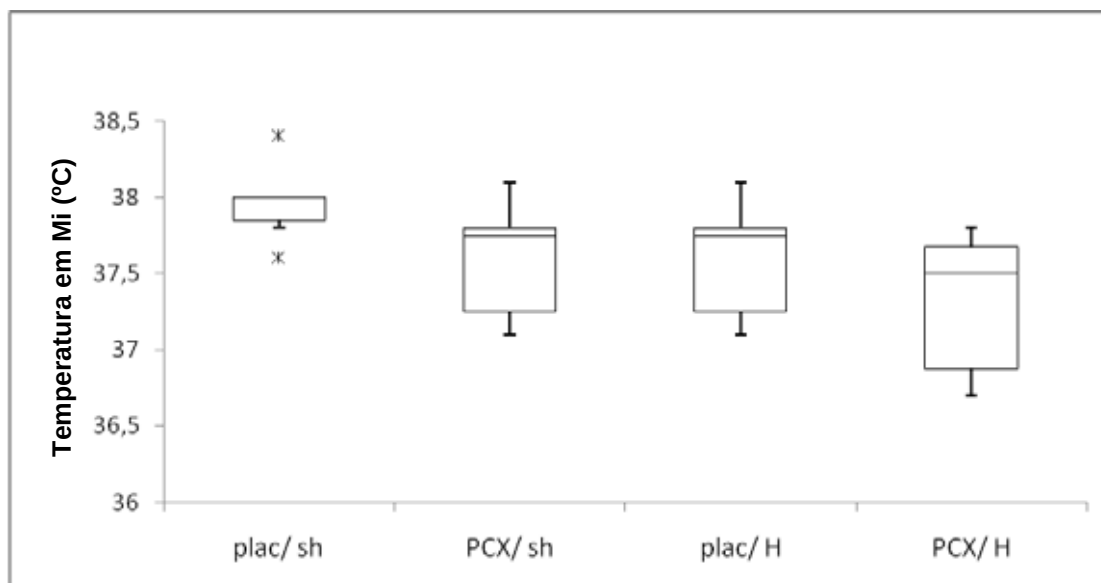


Figura 2. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da variável temperatura (°C) no momento inicial (Mi) nos grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. As marcas no gráfico representam *outliers*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, os grupos não apresentam diferenças significativas entre eles.

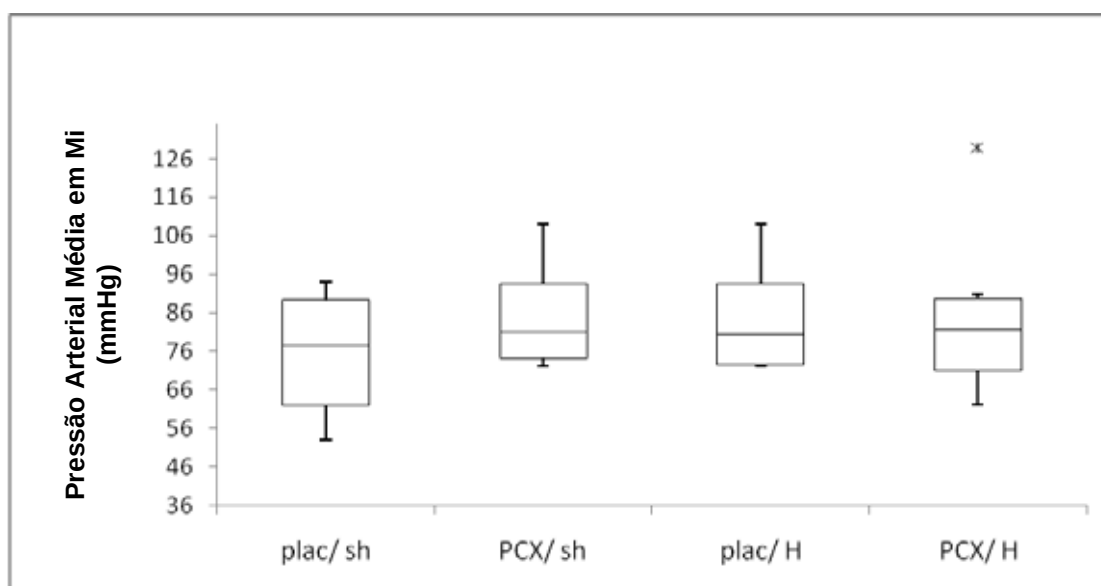


Figura 3. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da variável pressão arterial média (mmHg) no momento inicial (Mi) nos grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. A marca no gráfico representa *outlier*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, os grupos não apresentam diferenças significativas entre eles.

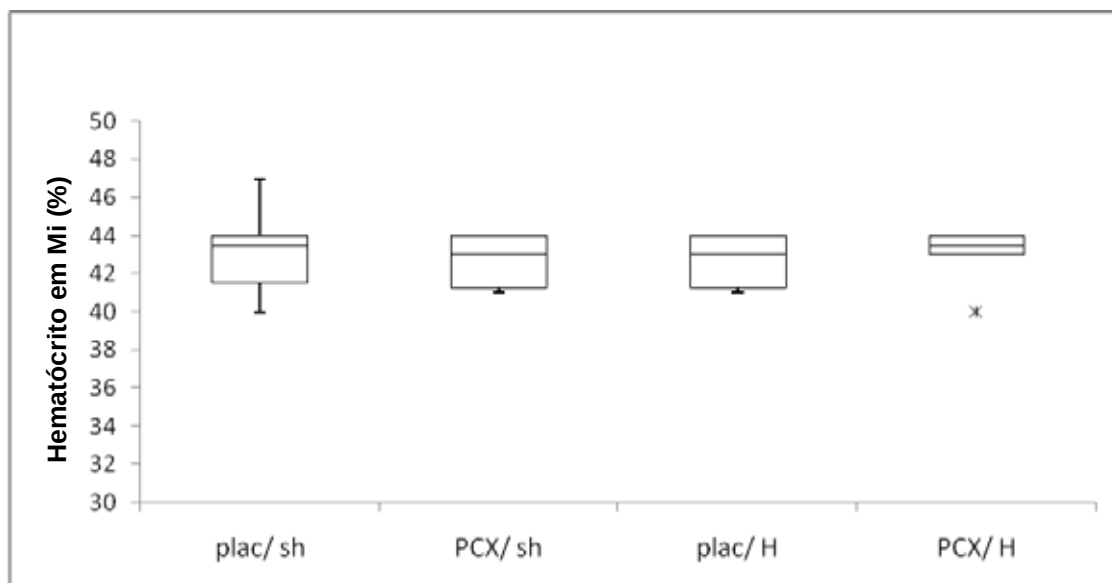


Figura 4. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da variável hematócrito (%) no momento inicial (Mi) nos grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. A marca no gráfico representa *outlier*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, os grupos não apresentam diferenças significativas entre eles.

As tabelas 5 e 6 representam os dados encontrados no momento final (Mf) para as variáveis temperatura, PAM e hematócrito. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos neste momento para a variável temperatura. Para as variáveis PAM e hematócrito, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Os grupos de ratos submetidos à hemorragia (grupos plac/ H e PCX/ H) apresentaram os menores valores, tanto da PAM quanto do hematócrito, quando comparados com os grupos não submetidos à hemorragia.

Tabela 5. Caracterização da amostra: estatísticas descritivas das variáveis temperatura, pressão arterial média (PAM) e hematócrito – momento final (Mf)

Variável	Grupo	Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Temperatura	plac/ sh	37,0	38,1	37,75	37,72	0,41
	PCX/ sh	36,8	38,0	37,60	37,55	0,41
	plac/ H	36,8	38,0	37,60	37,55	0,41
	PCX/ H	37,0	37,7	37,55	37,45	0,26
PAM	plac/ sh	59	90	80,50	75,00	12,92
	PCX/ sh	76	97	86,50	86,67	8,89
	plac/ H	46	57	51,00	50,83	4,07
	PCX/ H	42	57	47,00	49,17	5,67
Hematócrito	plac/ sh	38	45	41,00	40,83	2,64
	PCX/ sh	39	42	40,00	40,50	1,22
	plac/ H	32	35	34,00	33,83	1,17
	PCX/ H	33	35	34,50	34,17	0,98

Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

Tabela 6. Resultados dos testes de comparação entre os grupos para valores de temperatura, pressão arterial média (PAM) e hematócrito – momento final

Variável	Grupo	Posto médio	Grupos diferentes (Resultado teste de Dunn)
Temperatura	plac/ sh	16,33	-
	PCX/ sh	12,17	-
	plac/ H	12,17	-
	PCX/ H	9,33	-
	p-valor*	0,379	-
PAM	plac/ sh	17,17	plac/ H e PCX/ H
	PCX/ sh	19,83	plac/ H e PCX/ H
	plac/ H	7,00	plac/ sh e PCX/ sh
	PCX/ H	6,00	plac/ sh e PCX/ sh
	p-valor*	0,000	-
Hematócrito	plac/ sh	18,67	plac/ H e PCX/ H
	PCX/ sh	18,33	plac/ H e PCX/ H
	plac/ H	6,00	plac/ sh e PCX/ sh
	PCX/ H	7,00	plac/ sh e PCX/ sh
	p*	0,001	-

* p - valor referente ao teste de Kruskal-Wallis. Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

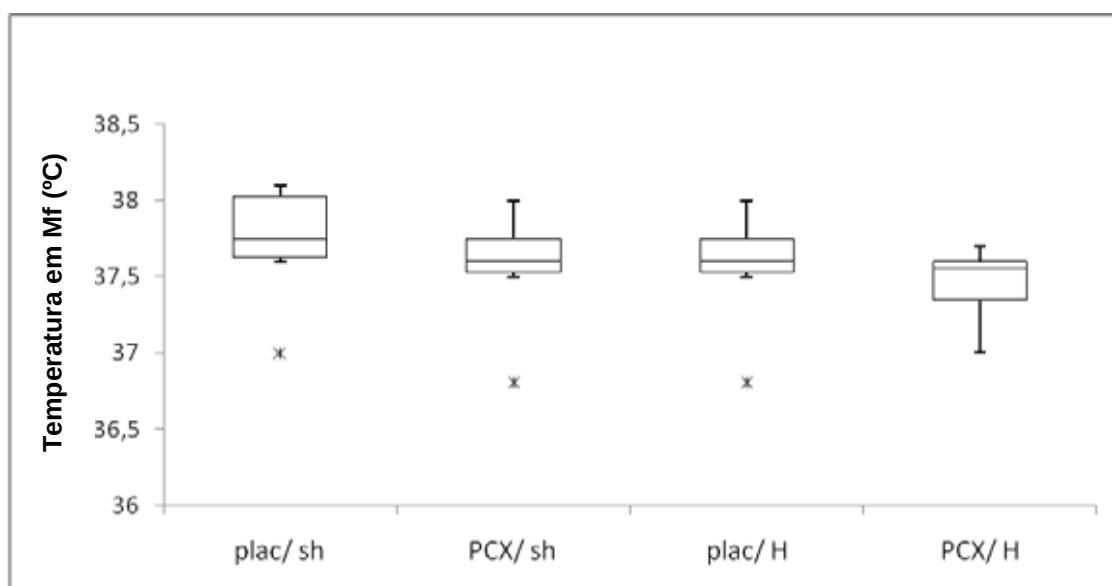


Figura 5. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da variável temperatura (°C) no momento final (Mf) nos grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. As marcas no gráfico representam *outliers*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, os grupos não apresentam diferenças significativas entre eles.

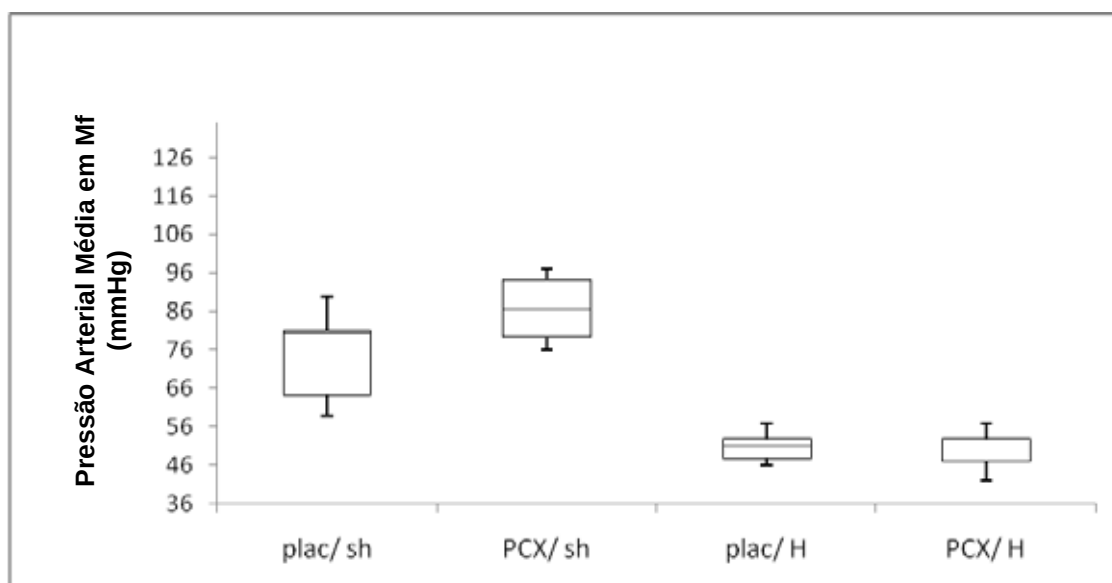


Figura 6. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da variável pressão arterial média (mmHg) no momento final (Mf) nos Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes com relação à pressão arterial média ($p < 0,001$). Os ratos submetidos à hemorragia apresentaram menores valores quando comparados com os dos grupos não submetidos à hemorragia.

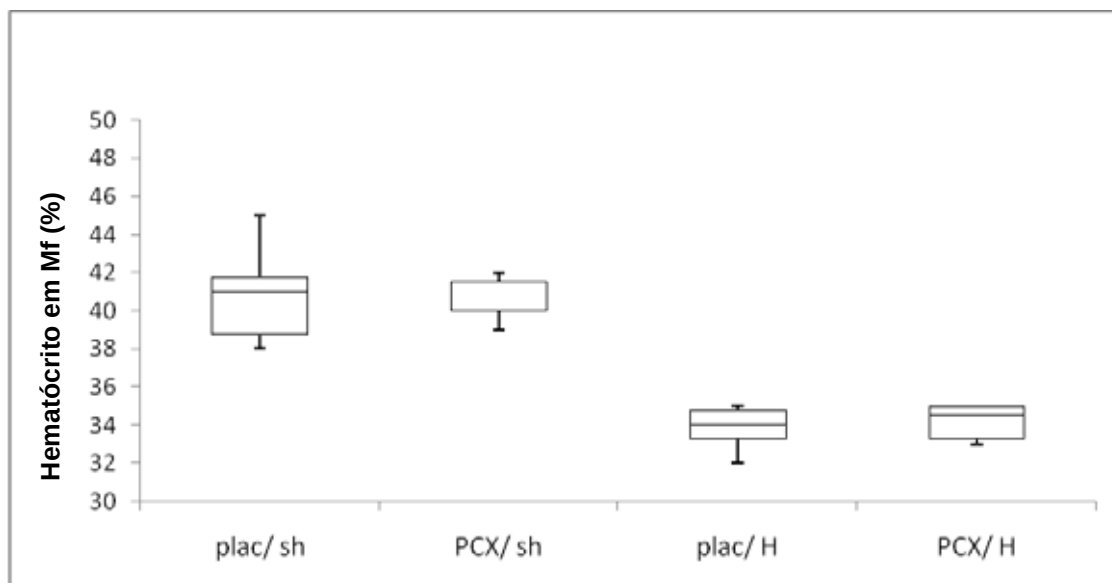


Figura 7. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da variável hematócrito (%) no momento final (Mf) nos grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes com relação ao hematócrito ($p = 0,001$). Os ratos submetidos à hemorragia apresentaram menores valores quando comparados com os ratos de grupos não submetidos à hemorragia.

As tabelas 7 e 8 apresentam os dados que caracterizam os resultados obtidos após a técnica de citometria de fluxo nos rins esquerdos e direitos, respectivamente. As variáveis representam a quantidade relativa expressa em porcentagem das células dos rins, que podem estar necrosadas, marcadas com iodeto de propídeo; em estágios precoces de apoptose, relacionados com a anexina V; em estágio de apoptose avançada (com ambos os marcadores); ou viáveis, quando ambos são negativos.

Tabela 7. Caracterização da amostra: estatísticas descritivas das variáveis necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis do rim esquerdo

Variável	Grupo	Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Iodeto de propídeo (PI) (necrose)	plac/ sh	0,38	1,89	0,64	0,98	0,71
	PCX/ sh	8,78	17,88	13,43	13,38	3,35
	plac/ H	0,36	10,14	6,73	5,75	4,13
	PCX/ H	9,68	22,29	13,91	14,64	4,36
Anexina V + PI (apoptose avançada)	plac/ sh	0,10	22,05	4,52	7,98	8,76
	PCX/ sh	1,65	12,72	9,95	8,24	4,81
	plac/ H	11,87	20,41	17,36	16,79	3,88
	PCX/ H	0,16	12,31	1,21	2,82	4,69
Células Viáveis	plac/ sh	1,76	99,34	5,88	21,20	38,39
	PCX/ sh	43,73	82,06	52,01	57,11	15,39
	plac/ H	1,16	21,35	5,43	7,03	7,33
	PCX/ H	49,46	86,79	73,32	72,01	13,70
Anexina V (apoptose precoce)	plac/ sh	0,10	93,07	82,27	69,85	34,78
	PCX/ sh	7,51	29,34	18,06	19,48	8,42
	plac/ H	54,97	86,62	67,06	70,44	11,77
	PCX/ H	3,95	58,03	13,83	19,81	19,66

Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

Tabela 8. Caracterização da amostra: estatísticas descritivas das variáveis necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis dos rins direitos

Variável	Grupo	Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio Padrão
Iodeto de propídeo (PI) (necrose)	plac/ sh	0,32	18,42	1,11	4,04	7,10
	PCX/ sh	11,49	19,31	13,72	14,27	2,68
	plac/ H	1,51	8,58	4,72	4,99	3,06
	PCX/ H	5,85	14,89	13,07	11,83	3,53
Anexina V + PI (apoptose avançada)	plac/ sh	0,86	16,81	8,14	8,44	7,58
	PCX/ sh	2,02	14,14	8,89	8,24	5,21
	plac/ H	10,37	24,28	18,16	17,60	4,63
	PCX/ H	0,04	2,28	0,97	1,19	0,88
Células Viáveis	plac/ sh	1,99	64,11	6,05	15,20	24,04
	PCX/ sh	33,93	75,14	53,72	55,38	17,27
	plac/ H	2,60	10,58	7,04	6,59	2,91
	PCX/ H	65,68	89,75	74,47	75,80	8,64
Anexina V (apoptose precoce)	plac/ sh	15,61	90,84	79,58	72,32	28,40
	PCX/ sh	8,84	40,44	20,52	22,11	12,94
	plac/ H	62,08	84,16	69,06	70,82	8,09
	PCX/ H	0,81	22,14	10,77	11,19	7,98

Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

As tabelas 9 e 10 mostram os resultados obtidos após análise estatística com o uso do teste de Kruskal-Wallis. Para os grupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas com este teste foi aplicado posteriormente o teste de Dunn para que se conheçam os grupos diferentes.

Tabela 9. Resultados dos testes de comparação entre os grupos: variáveis necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis dos rins esquerdos

Variável	Grupo	Postos médios	Grupos diferentes (Resultado teste de Dunn)
Iodeto de propídeo (PI) (necrose)	plac/ sh	4,83	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ sh	17,92	plac/ sh e plac/ H
	plac/ H	8,67	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ H	18,58	plac/ sh e plac/ H
	p-valor*	0,001	-
Anexina V + PI (apoptose avançada)	plac/ sh	12,17	plac/ H
	PCX/ sh	12,17	plac/ H
	plac/ H	19,50	plac/ sh, PCX/ sh, PCX/ H
	PCX/ H	6,17	plac/ H
	p-valor*	0,013	-
Células Viáveis	plac/ sh	9,00	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ sh	15,67	plac/ sh e plac/ H
	plac/ H	6,00	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ H	19,33	plac/ sh e plac/ H
	p-valor*	0,004	-
Anexina V (apoptose precoce)	plac/ sh	17,67	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ sh	8,17	plac/ sh e plac/ H
	plac/ H	17,17	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ H	7,00	plac/ sh e plac/ H
	p-valor*	0,008	-

* p-valor referente ao teste de Kruskal-Wallis. Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

Tabela 10. Resultados dos testes de comparação entre os grupos: variáveis relacionadas com a citometria de fluxo que indicam porcentagem de morte celular nos rins direitos: necrose, apoptose precoce e avançada e células viáveis

Variável	Grupo	Posto médio	Grupos diferentes (Resultado teste de Dunn)
Iodeto de propídeo (PI) (necrose)	plac/ sh	6,67	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ sh	18,33	plac/ sh e plac/ H
	plac/ H	8,67	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ H	16,33	plac/ sh e plac/ H
	p-valor*	0,009	-
Anexina V + PI (apoptose avançada)	plac/ sh	12,00	plac/ H e PCX/ H
	PCX/ sh	12,67	plac/ H e PCX/ H
	plac/ H	20,33	plac/ sh, PCX/ sh, PCX/ H
	PCX/ H	5,00	plac/ sh, PCX/ sh, plac/ H
	p-valor*	0,003	-
Células Viáveis	plac/ sh	6,83	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ sh	15,83	plac/ sh e plac/ H
	plac/ H	6,83	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ H	20,50	plac/ sh e plac/ H
	p-valor*	0,001	-
Anexina V (apoptose precoce)	plac/ sh	19,17	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ sh	8,50	plac/ sh e plac/ H
	plac/ H	17,00	PCX/ sh e PCX/H
	PCX/ H	5,33	plac/ sh e plac/ H
	p-valor*	0,001	-

* p-valor referente ao teste de Kruskal-Wallis. Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia

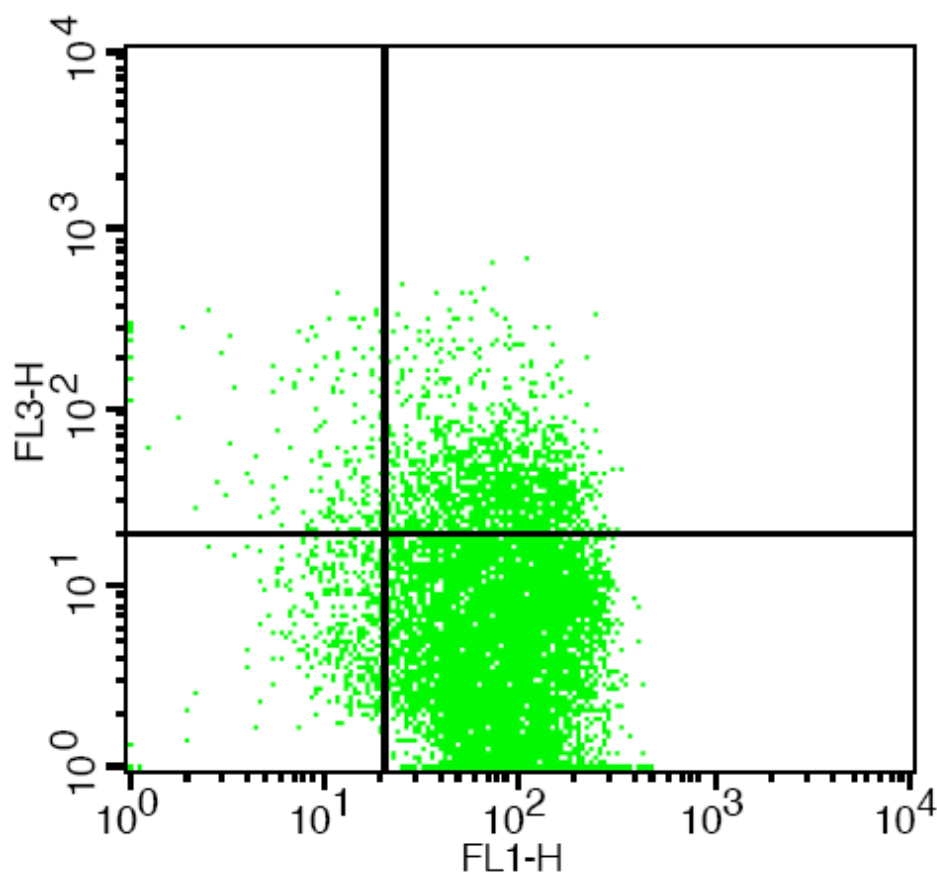


Figura 8. Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu placebo e que não foi submetido à hemorragia (plac/ sh). É possível observar quatro quadrantes na figura. Os pontos no quadrante superior esquerdo representam células necrosadas identificadas pelo iodeto de propídeo (PI). Os pontos no quadrante inferior direito representam células em estágio de apoptose precoce identificadas pela anexina V. Os pontos no quadrante superior direito representam as células em estágios de apoptose avançada identificadas tanto pelo PI quanto pela anexina V. Os pontos no quadrante inferior esquerdo representam as células viáveis não associadas ao PI e nem à anexina V.

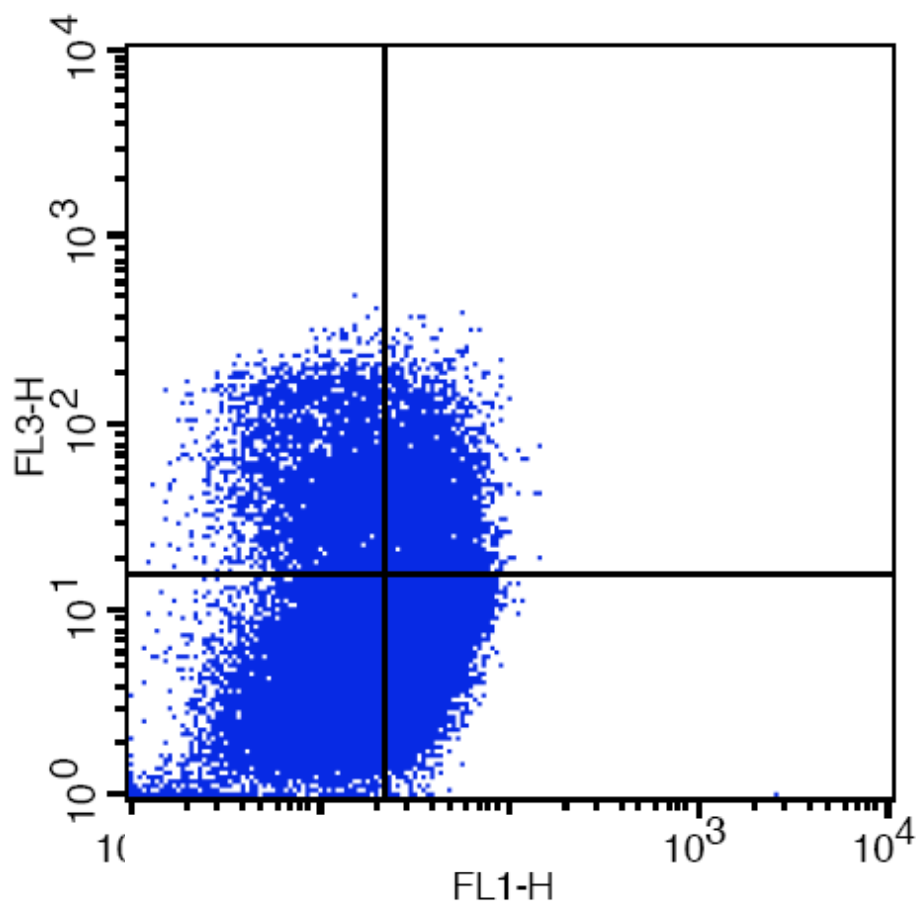


Figura 9. Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu parecoxibe e que não foi submetido à hemorragia (PCX/ sh). Os pontos no quadrante superior esquerdo representam células necrosadas identificadas pelo iodeto de propídeo (PI). Os pontos no quadrante inferior direito representam células em estágio de apoptose precoce identificadas pela anexina V. Os pontos no quadrante superior direito representam as células em estágios de apoptose avançada identificadas tanto pelo PI quanto pela anexina V. Os pontos no quadrante inferior esquerdo representam as células viáveis não associadas ao PI e nem à anexina V.

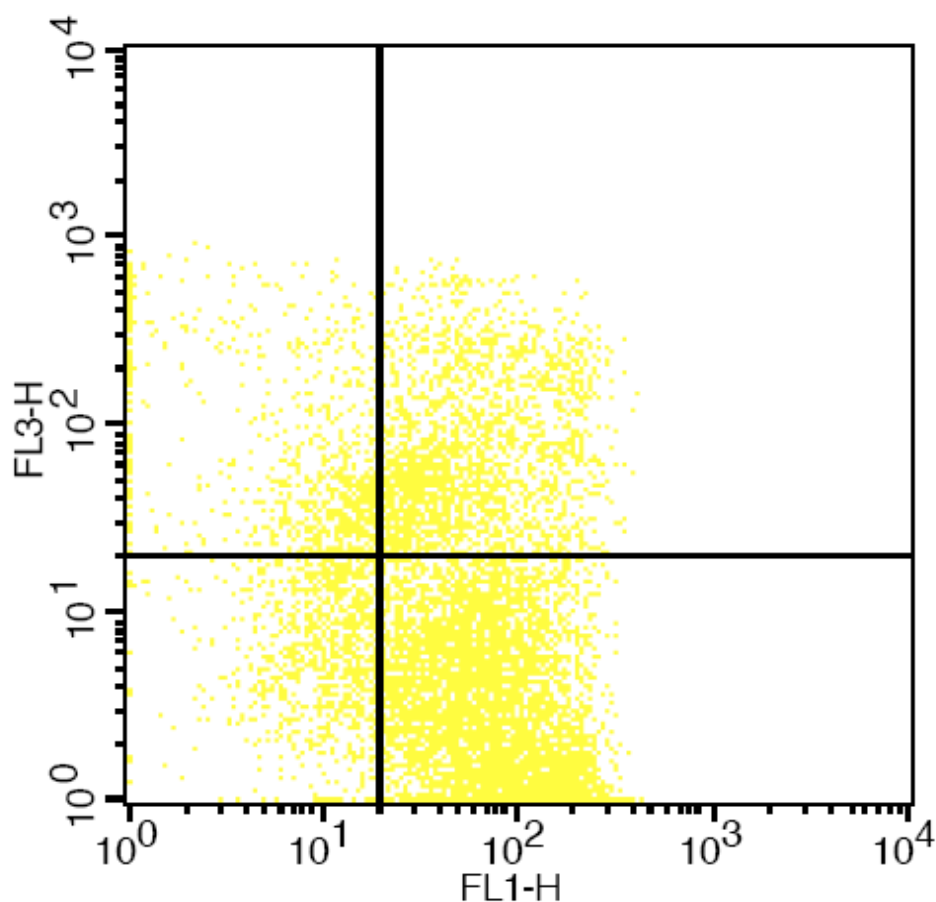


Figura 10. Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu placebo e que foi submetido à hemorragia (plac/ H). Os pontos no quadrante superior esquerdo representam células necrosadas identificadas pelo iodeto de propídeo (PI). Os pontos no quadrante inferior direito representam células em estágio de apoptose precoce identificadas pela anexina V. Os pontos no quadrante superior direito representam as células em estágios de apoptose avançada identificadas tanto pelo PI quanto pela anexina V. Os pontos no quadrante inferior esquerdo representam as células viáveis não associadas ao PI e nem à anexina V.

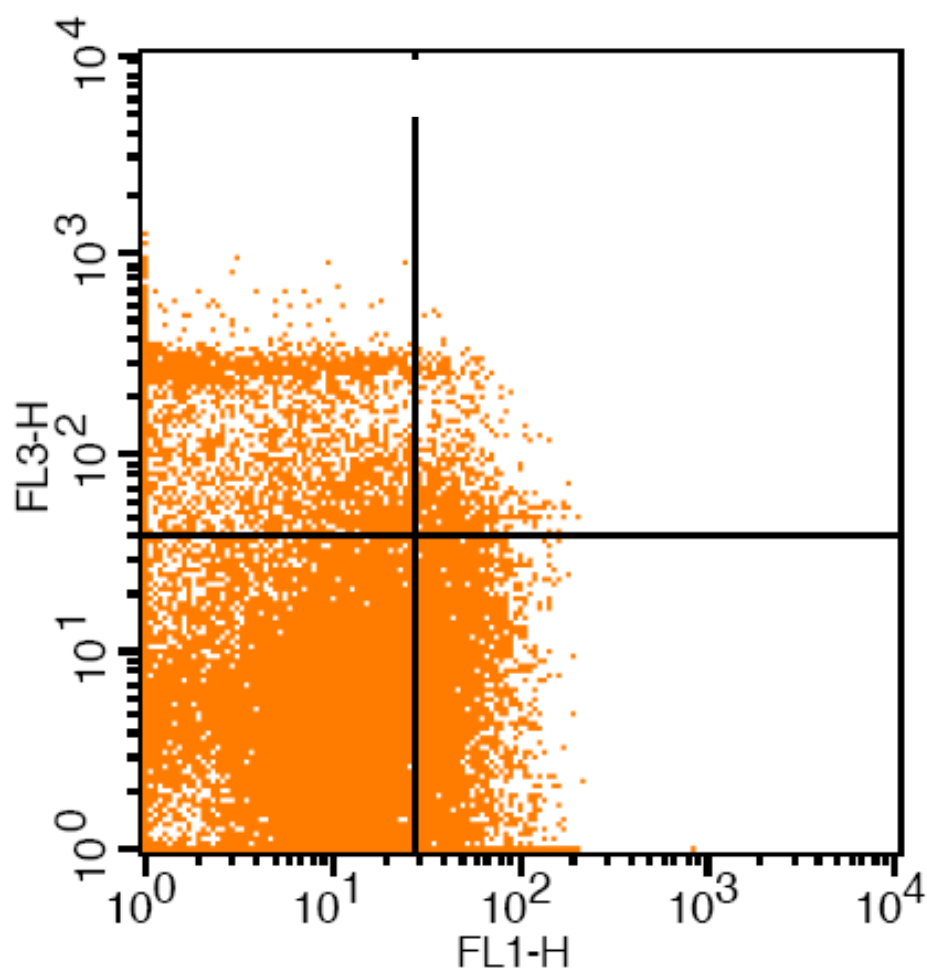


Figura 11. Exemplo de imagem de citometria de fluxo de rim de rato do grupo que recebeu parecoxibe e foi submetido à hemorragia (PCX/ H). Os pontos no quadrante superior esquerdo representam células necrosadas identificadas pelo iodeto de propídeo (PI). Os pontos no quadrante inferior direito representam células em estágio de apoptose precoce identificadas pela anexina V. Os pontos no quadrante superior direito representam as células em estágios de apoptose avançada identificadas tanto pelo PI quanto pela anexina V. Os pontos no quadrante inferior esquerdo representam as células viáveis não associadas ao PI e nem à anexina V.

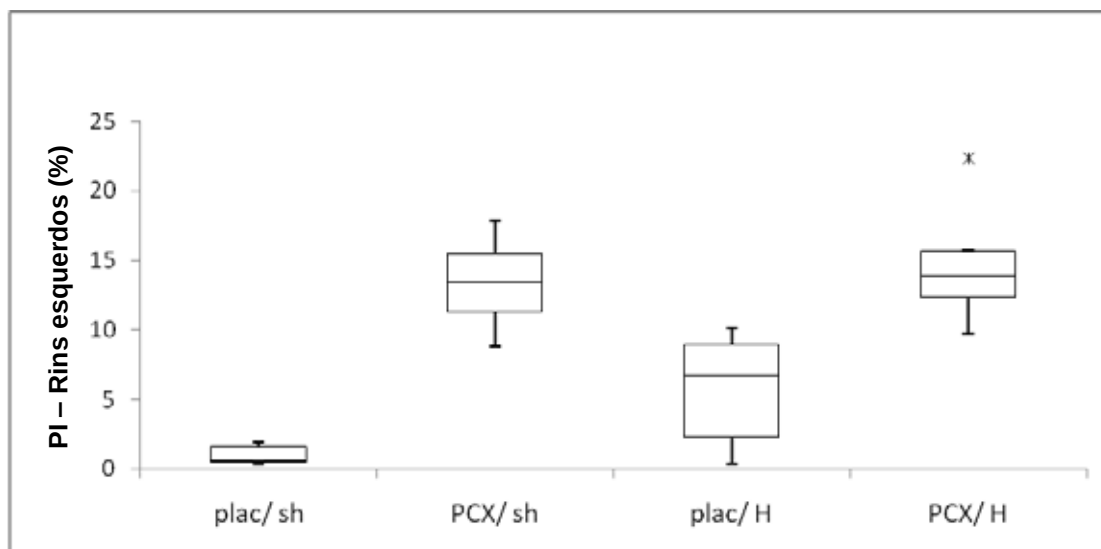


Figura 12. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células necrosadas representadas pelo iodeto de propídeo (PI) dos rins esquerdos (RE). Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. A marca no gráfico representa *outlier*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes ($p = 0,001$). Os ratos que receberam parecoxibe (PCX/ sh e PCX/ H) apresentaram maiores valores quando comparados com os grupos de ratos que receberam placebo (plac/ sh e plac/ H).

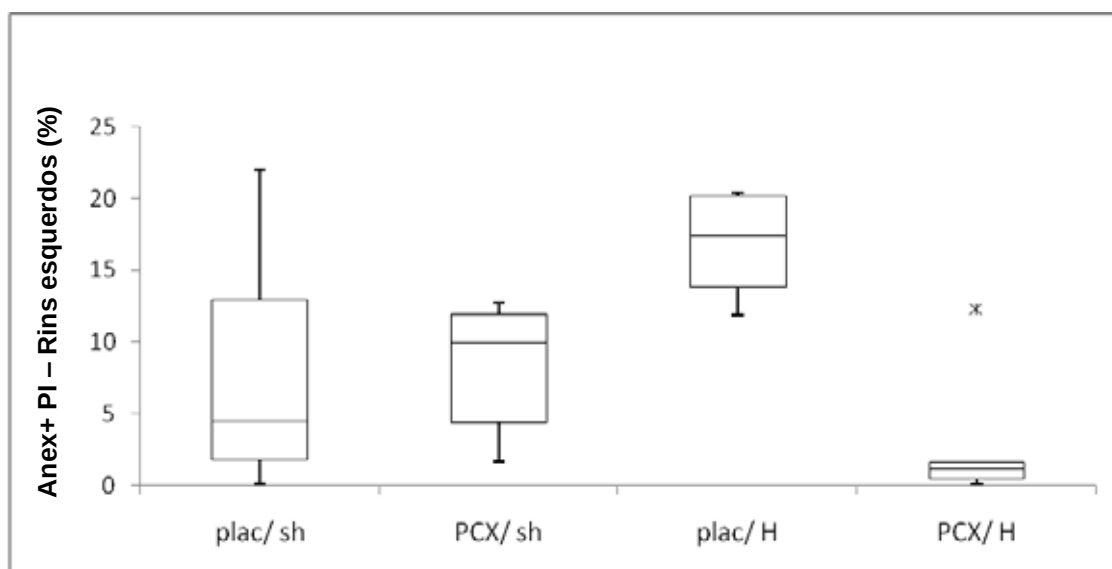


Figura 13. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células em apoptose avançada (Anex+ PI = anexina V+ iodeto de propídeo) dos rins esquerdos (RE). Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. A marca no gráfico representa *outlier*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes ($p = 0,013$). Os ratos que receberam placebo e foram submetidos à hemorragia (plac/ H) apresentaram maiores valores quando comparados com os dos outros três grupos.

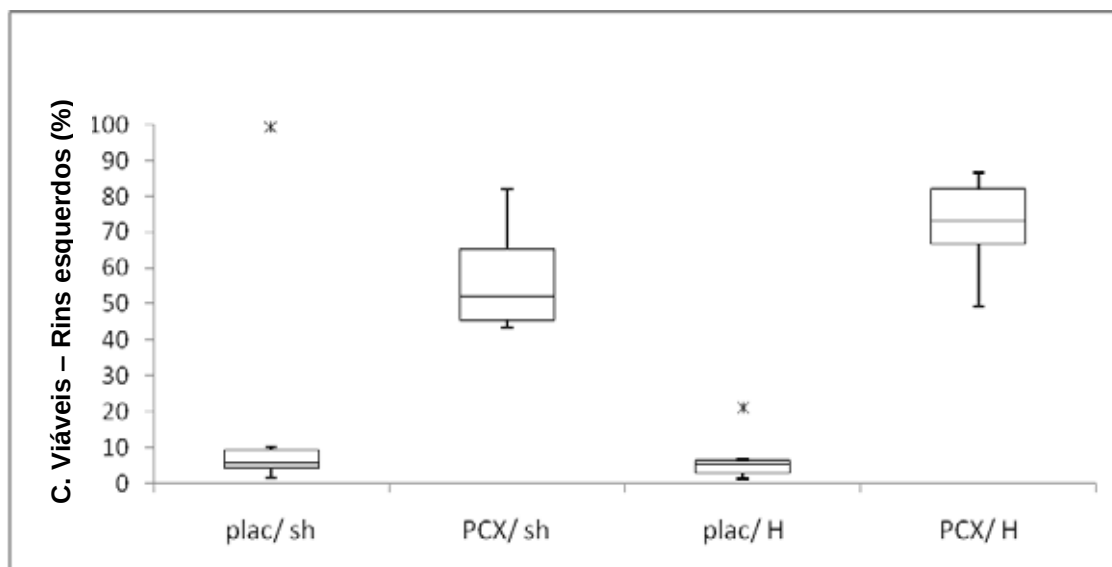


Figura 14. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células viáveis dos rins esquerdos (RE). Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. As marcas no gráfico representam *outliers*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes ($p = 0,004$). Os ratos que receberam parecoxibe (PCX/ sh e PCX/ H) apresentaram maiores valores quando comparados com os dos grupos que receberam placebo (plac/ sh e plac/ H).

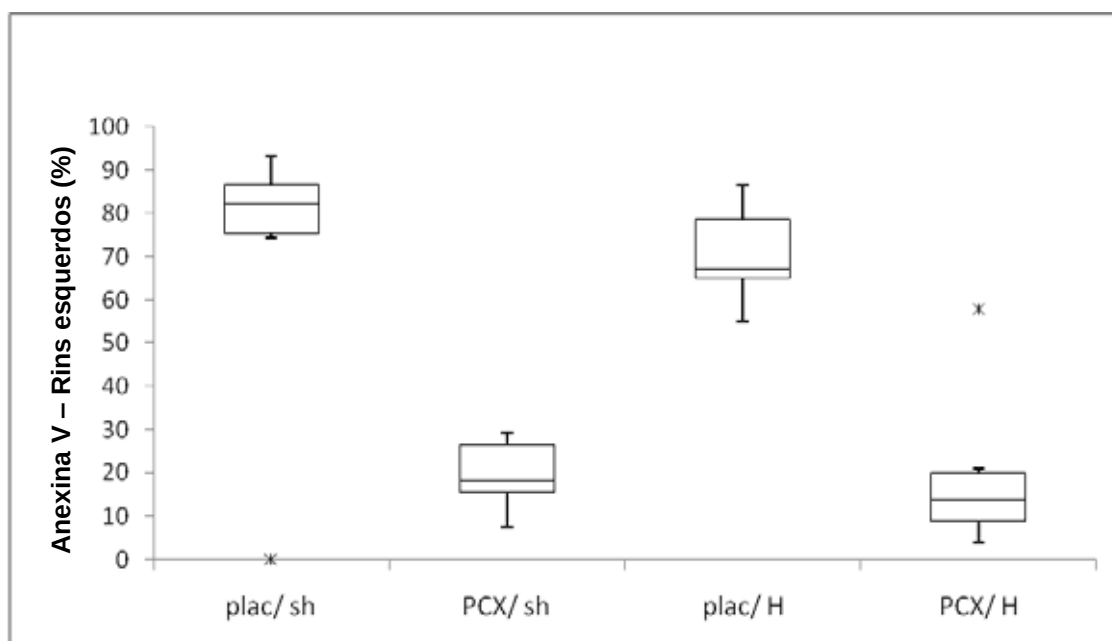


Figura 15. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células em estágios de apoptose precoce (Anexina V) dos rins esquerdos (RE). Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. As marcas no gráfico representam *outliers*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes ($p = 0,008$). Os ratos que receberam parecoxibe (PCX/ sh e PCX/ H) apresentaram menores valores quando comparados com os dos grupos que receberam placebo (plac/ sh e plac/ H).

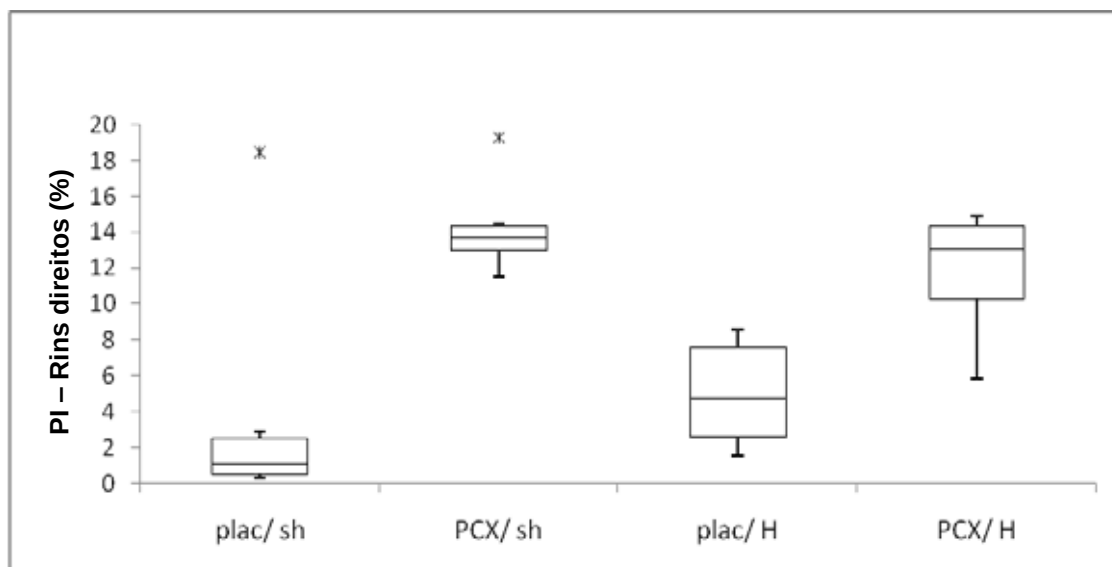


Figura 16. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células necrosadas (iodeto de propídeo – PI) dos rins direitos (RD). Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. As marcas no gráfico representam *outliers*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes ($p = 0,009$). Os ratos que receberam parecoxibe (PCX/ sh e PCX/ H) apresentaram maiores valores quando comparados com os dos grupos que receberam placebo (plac/ sh e plac/ H).

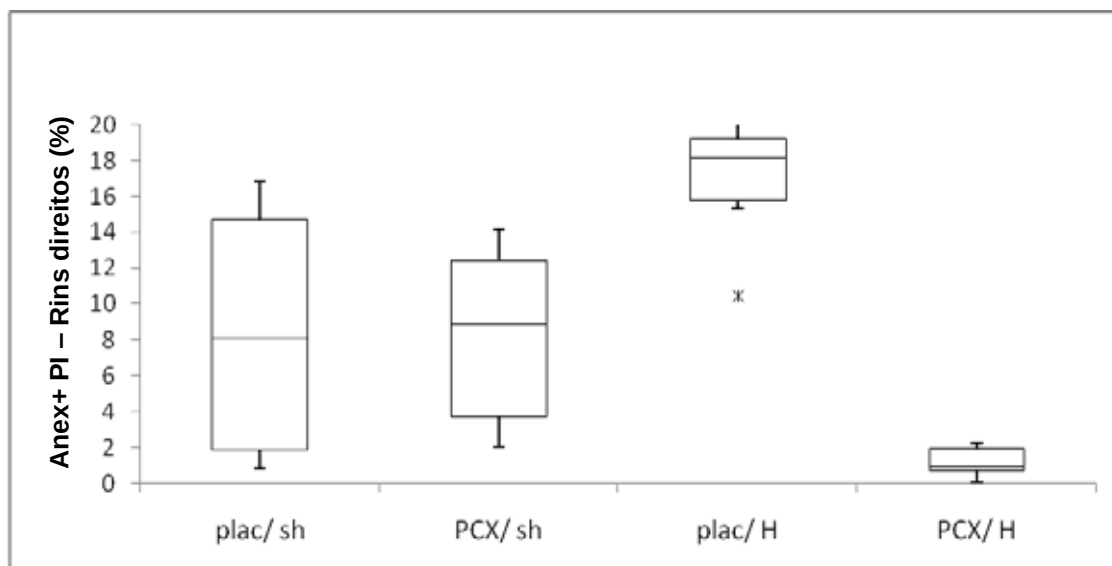


Figura 17. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células em estágio de apoptose avançada (Anex+ PI = anexina V e iodeto de propídeo) dos rins direitos (RD). Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. A marca no gráfico representa *outlier*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes ($p = 0,003$). Os ratos que receberam placebo e foram submetidos à hemorragia (plac/ H) apresentaram maiores valores quando comparados com os demais grupos. Os grupos de ratos não submetidos à hemorragia (plac/ sh e PCX/ sh) apresentaram resultados semelhantes. O grupo PCX/ H apresentou menores valores, quando comparado com os outros três grupos.

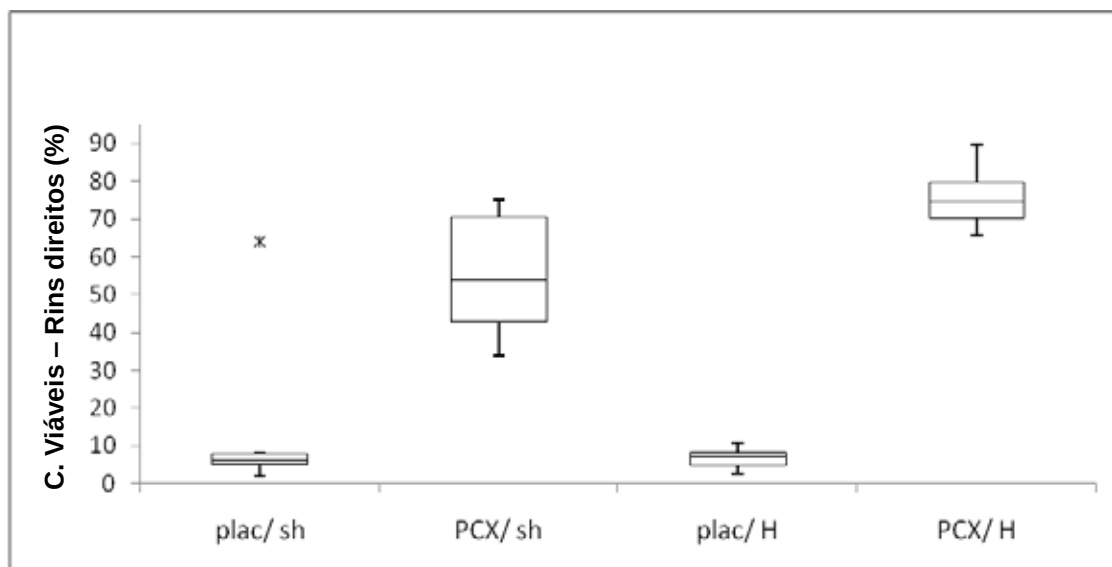


Figura 18. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células viáveis dos rins direitos (RD). Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. A marca no gráfico representa *outlier*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, conclui-se que os grupos não são semelhantes ($p = 0,001$). Os ratos que receberam parecoxibe (PCX/ sh e PCX/ H) apresentaram maiores valores quando comparados com os dos grupos que receberam placebo (plac/ sh e plac/ H).

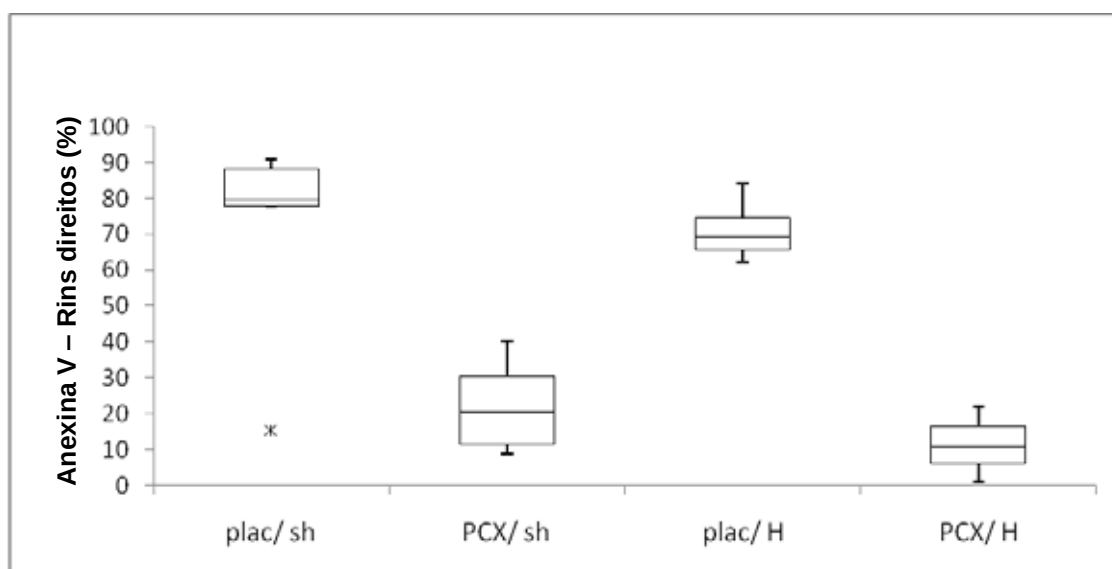


Figura 19. Representação gráfica (tipo *boxplot*) da porcentagem de células em estágios de apoptose precoce (Anexina V) do rim direito. Grupos: plac/ sh = placebo sem hemorragia; PCX/ sh = parecoxibe sem hemorragia; plac/ H = placebo com hemorragia; PCX/ H = parecoxibe com hemorragia. A marca no gráfico representa *outlier*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, se conclui que os grupos não são semelhantes ($p = 0,001$). Os ratos que receberam parecoxibe (PCX/ sh e PCX/ H) apresentaram menores valores quando comparados com os dos grupos que receberam placebo (plac/ sh e plac/ H).

5 DISCUSSÃO

O peso dos animais foi semelhante entre os grupos, assim como a temperatura, tanto no momento inicial quanto no final. O hematócrito e a PAM também foram semelhantes, entre os quatro grupos, no momento inicial do estudo. Desse modo, isso pode demonstrar homogeneidade entre os grupos antes da intervenção.

No momento final houve diferença entre os grupos, tanto com relação à PAM quanto ao hematócrito. Os grupos submetidos ao sangramento (plc/ H e PCX/ H) tiveram valores semelhantes entre eles, assim como ocorreu nos grupos que não foram submetidos à hemorragia (plc/ sh e PCX/ sh), que também apresentaram resultados semelhantes entre eles. Contudo, os grupos com hemorragia apresentaram menores valores de PAM e hematócrito quando comparados com os animais dos grupos sem hemorragia, o que significa que a indução à hemorragia foi suficiente para determinar a redução dos valores de hematócrito e da PAM.

Os dados provenientes da citometria de fluxo foram comparados entre os quatro grupos, na procura por células viáveis, apoptóticas (precoces e tardias), ou necróticas. Células dos rins de ambos os lados foram analisadas, e suas análises ocorreram separadamente, pois, apesar de não se conhecerem diferenças significativas na função renal relacionadas à lateralidade (Salehipour et al, 2008), admite-se que os rins não são totalmente idênticos (Kay et al, 2006). Além disso, a ocorrência de resultados semelhantes entre os rins (direitos e esquerdos) do mesmo grupo pode representar validação do método ou do próprio resultado.

Os resultados dos rins direitos e esquerdos foram iguais no que se refere à diferença entre grupos relacionada com necrose observada na citometria. Nos rins de ambos os lados, os ratos submetidos ao parecoxibe necrosaram mais, independentemente de terem sido submetidos à hemorragia. Portanto, percebe-se que o parecoxibe gerou necrose em tecido renal.

De modo semelhante, os resultados dos rins direitos e esquerdos foram iguais no que se refere à diferença entre grupos relacionada com apoptose precoce observada pela citometria. Porém, nos rins de ambos os lados, os ratos submetidos ao parecoxibe

tiveram menos apoptose (ao contrário da necrose), independentemente de terem sido submetidos à hemorragia. Percebe-se, portanto, que o parecoxibe protegeu o tecido renal contra apoptose.

Existe, como se observa, um paradoxo quando se verificam os resultados da pesquisa. Por um lado, o parecoxibe parece maléfico ao rim por gerar necrose, por outro, beneficia o rim por protegê-lo contra apoptose.

Interessante notar que, apesar das evidências que demonstram que os danos relacionados com o uso de inibidores da COX (AINEs ou COXIBEs) sejam intensificados em situações de hemorragia ou hipovolemia (Harris, 2006), neste estudo, a hemorragia não interferiu nos resultados, tanto que os grupos PCX/ sh e PCX/ H foram semelhantes em relação à necrose, apoptose precoce e quantidade de células viáveis. O mesmo ocorreu com os grupos plac/ sh e plac/ H em relação a essas variáveis. Desse modo, percebe-se que o parecoxibe foi determinante exclusivo nas diferenças estatísticas relacionadas com a geração de necrose ou apoptose, e que a hipovolemia causada pela hemorragia não interferiu na quantidade de necrose ou apoptose celulares.

Quanto à necrose, encontram-se na literatura diversas citações de autores que relacionam o bloqueio das prostaglandinas com necrose em tecido renal (Black, 1986; Bach & Nguyen, 1998). John & Herzenberg (2009), por exemplo, publicaram revisão de literatura que relaciona a toxicidade renal e certos fármacos terapêuticos. Neste estudo, os autores apresentam os mecanismos associados com a maioria das lesões renais possíveis advindas do uso de medicamentos, e necrose é citada com forte relação com a alteração da dinâmica vascular proveniente do bloqueio das prostaglandinas.

Esta lógica, de que a necrose se relaciona com a depleção de nutrientes a determinado tecido, proveniente de alteração da hemodinâmica local, inclusive, é um raciocínio básico no contexto médico. É possível identificar diversos estudos semelhantes que demonstram esta conexão, em vários tecidos. Desse modo, a necrose provavelmente ocorra pela alteração da regulação vascular proveniente da inibição de prostaglandinas, portanto de causa isquêmica (Zadrazil, 2006). Inclusive, existem evidências experimentais que apontam que a necrose é normalmente associada com

alterações da microcirculação renal, com consequente prejuízo à sua oxigenação (Rosenberger et al, 2006).

Com a isquemia tecidual no rim, em conjunto com a hipóxia local, esgotam-se as reservas celulares de energia, e isso é seguido de desequilíbrio iônico, alterações mitocondriais e sobrecarga de cálcio. A membrana sofre lise e o conteúdo celular externa-se (Szabó, 2005).

Em relação à apoptose, percebe-se que o parecoxibe gerou proteção ao rim ao diminuir a quantidade de morte celular por este tipo de padrão morfológico. Alguns autores dedicaram trabalhos para demonstrar a relação entre os inibidores da COX-2 e a apoptose. Um exemplo é o de Rudner et al (2010), que demonstraram a expressão de algumas proteínas celulares e o consequente efeito pró-apoptótico ou antiapoptótico do celecoxibe (um exemplo de COXIBE), dependente da proteína relacionada. El-Awady et al (2011) analisaram o celecoxibe com quimioterápicos e algumas linhagens celulares e demonstraram que o COXIBE apresenta estreita relação com apoptose, ora induzindo, ora inibindo, com dependência da linhagem estudada.

O efeito pró-apoptótico causou interesse em pesquisadores, pois poderia ser um adjuvante para o tratamento oncológico ao gerar morte celular em ocasiões relacionadas com o câncer. Inclusive, é bastante conhecida na literatura a relação entre a inibição da COX e o tratamento ou prevenção do câncer. Cuzick et al (2009) publicaram um consenso que demonstra que o uso de inibidores da COX está associado com a redução de riscos de alguns tipos de cânceres. Rizzo (2010) demonstrou que a COX-2 desempenha papel crucial na oncogênese, pois há regulação aberrante da COX-2, em certos tumores sólidos e neoplasias hematológicas, que leva ao crescimento tumoral e ao efeito pró-inflamatório. Valle et al (2013) demonstraram experimentalmente que inibidores da COX podem gerar efeitos antiproliferativos em tumores de ovário, provavelmente relacionados com transcrição genética.

Assim, percebe-se que, em algumas situações, como em certos tipos de tumores, a inibição da COX (por AINEs ou COXIBEs) está relacionada com o tratamento ou controle do câncer, possivelmente proveniente de efeitos pró-apoptóticos relacionados com alterações (típicas do câncer) na expressão da COX ou de outras proteínas (Surh & Kundu, 2005; Lai & Chen, 2013).

Entretanto, os resultados da presente pesquisa não apresentam o efeito pró-apoptótico do parecoxibe no tecido renal. Isso possivelmente ocorreu pelo fato de o tecido renal ser hígido previamente à experimentação, ou seja, a alteração da expressão da enzima COX-2 observada em alguns casos de tumores não ocorreu nos animais do estudo, tampouco a expressão de outras proteínas relacionadas com o câncer, que poderiam estar associadas com o efeito gerador de apoptose.

Os efeitos antiapoptóticos apresentados no trabalho possivelmente estão relacionados com o controle da inflamação, pois está comprovado que mediadores inflamatórios, como citocinas, contribuem para a lesão renal causada por liberação de radicais de oxigênio e vasoconstritores, além da lesão endotelial direta, via endotelina e redução do óxido nítrico (Akçay et al, 2009).

Desse modo, ao considerar o fato de que inflamação causa prejuízos ao rim, prudente se faz conhecer tais mecanismos, para que se produzam meios de proteger o órgão. Neste sentido, pesquisas apareceram para verificar a relação entre inflamação e apoptose.

Izquierdo et al (2012) demonstraram que a apoptose pode ser gerada (em cascatas extrínscas e intrínscas) por mediadores inflamatórios. Sanz et al (2011) descrevem a indução de apoptose no rim em células tubulares associadas com a condição de inflamação. Ortiz et al (2009) demonstram que citocinas derivadas da inflamação podem ser objetos de estudos científicos, na intenção de criar modos de proteger o rim. Percebe-se, portanto, que a inflamação é prejudicial ao rim e esses estudos mostram que isso deve estar relacionado com a morte celular morfológicamente descrita como apoptose. Assim, ao considerar esta lógica, conclui-se que os COXIBs podem beneficiar o rim ao bloquear a inflamação.

Além do raciocínio de que o bloqueio da inflamação reduz apoptose, alguns autores (Elrod et al, 2009; Yu et al 2011) evidenciaram que os COXIBs podem gerar, por si só, efeitos antiapoptóticos, e este mecanismo possivelmente está na via mitocondrial (ou intrínscas), antes da ativação da família das proteínas BAX e BAK e independentemente de seu efeito relacionado com as prostaglandinas (Cerella et al, 2011).

De todo modo, os resultados desta pesquisa somados às evidências da literatura fazem crer que o parecoxibe protege o rim contra apoptose, apesar de estar associado à geração de necrose neste órgão.

Em relação à apoptose tardia ou avançada, observada pela citometria de fluxo, os resultados demonstram que tanto os rins direitos quanto os esquerdos do grupo submetido ao placebo e à hemorragia (plac/ H) foram aqueles que mais a apresentaram. Contudo, ocorreu diferença entre os rins, quanto à lateralidade, no grupo de animais submetidos ao parecoxibe e hemorragia (PCX/ H). Nos rins esquerdos, este grupo diferenciou-se apenas de plac/ H, enquanto que nos rins direitos este grupo apresentou-se diferente de todos os outros, com menores valores.

A apoptose tardia, como resultado obtido pela citometria de fluxo, é representada pelas células que apresentaram componentes de necrose e de apoptose, ou seja, quando se verifica a ligação tanto com a anexina V quanto com o PI. É possível considerar duas possibilidades para este tipo de categoria – as células podem ter sido acometidas por apoptose que evoluiu para necrose e, em outra análise, podem ter ocorrido, concomitantemente, as duas lesões, apoptose e necrose, sem que tenha havido, necessariamente, evolução de uma forma para a outra (McConkey, 1998; Chandra et al, 2000).

Se for considerada a ocorrência concomitante, pode-se dizer que o grupo plac/ H (maior grau de apoptose tardia, em rins de ambos os lados) sofreu provável parcela de necrose derivada da falta de nutrientes determinada pelo sangramento, que provocou depleção de suas reservas, e sofreu parcela de apoptose pela falta da proteção proveniente do COXIBE, o que reforça os demais resultados deste estudo.

Porém, ao considerar a possibilidade de evolução de apoptose para necrose, admite-se que as células sofreram lesões que levaram à morte programada (apoptose) e que, em algum momento após, estas células evoluíram para lise da membrana plasmática (como na necrose). Nesta lógica, a morte celular não foi proveniente do mecanismo gerador de necrose, mas de mera consequência da apoptose.

Se pensarmos exclusivamente nesta última lógica, os animais que receberam parecoxibe teriam menos apoptose avançada do que os dos outros dois grupos, ao considerar os demais resultados do trabalho e os mecanismos associados com geração

de apoptose, pois necessariamente seriam a evolução da apoptose precoce. Contudo, isso não foi observado. Os grupos que receberam parecoxibe mostraram-se semelhantes ao grupo plac/ sh nos rins esquerdos, em relação à apoptose tardia, e, nos rins direitos, os grupos submetidos ao parecoxibe apresentaram resultados diferentes entre eles. PCX/ H apresentou menores valores nos rins direitos e PCX/ sh foi semelhante ao plac/ sh.

Pode ser que ambas as possibilidades tenham acontecido, em parcelas relativas e imensuráveis de ocorrência. E isso prejudicou as análises, uma vez que os mecanismos geradores de necrose e de apoptose mostram-se bem distintos. Porém, de modo geral, observou-se que o grupo plac/ H apresentou maior quantidade de apoptose avançada.

Em relação às células viáveis vistas pela citometria, os resultados dos rins direitos e esquerdos foram iguais no que se refere à diferença entre grupos. Nos rins de ambos os lados, os ratos submetidos ao parecoxibe apresentaram maiores quantidades de células viáveis, independentemente de terem sido submetidos à hemorragia. Percebe-se, assim, que o uso de parecoxibe está associado com maior quantidade de células renais viáveis. Esta informação pode ser considerada crucial neste estudo, pois foi evidenciado ora proteção, ora prejuízo com o uso do parecoxibe, nas associações com apoptose e necrose, respectivamente. Assim, ao demonstrar que os grupos submetidos ao parecoxibe apresentaram maior quantidade de células viáveis, pode-se concluir que a proteção foi superior ao prejuízo nesses grupos, mesmo com a ocorrência de necrose.

Neste estudo é possível admitir que os grupos que apresentaram maiores quantidades de células viáveis, necessariamente obtiveram menores quantidades nas outras três possibilidades – apoptose precoce, necrose e apoptose tardia. Isso porque são possíveis apenas estas quatro possibilidades no método empregado na citometria de fluxo, e os dados foram trabalhados com suas representações relativas em porcentagem. Assim, se um grupo apresentou maiores quantidades em uma ocorrência percentual, certamente apresentou menos ocorrência dentro das outras três possibilidades.

Portanto, pode-se concluir que os grupos submetidos ao parecoxibe, embora tenham mostrado maior quantidade de necrose que os demais, apresentaram menores quantidades de apoptose, e isso foi suficiente para determinar maior número de células viáveis.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa demonstrou que, nas condições estudadas, o parecoxibe determinou maior quantidade de necrose, menor quantidade de apoptose e maior quantidade de células viáveis nos rins dos ratos submetidos ou não à hemorragia aguda.

Esses resultados, que podem contribuir para geração de conhecimentos relacionados a esta classe de medicamentos, prudente notar-se, também podem ter trazido novas questões.

A literatura mostra resultados conflitantes relacionados com o uso de COXIBEs e proteção renal, talvez pela diversidade metodológica. Este estudo, dentro das condições estabelecidas, sugere tendência ao benefício do uso do fármaco em relação à proteção renal.

Entretanto, esta pesquisa focou os critérios morfológicos da morte celular, e este tipo de classificação tem sido muito estudado recentemente por pesquisadores, inclusive, novas classificações sendo continuamente propostas. Desse modo, em futuro próximo, pode ser que os critérios morfológicos aqui estudados não sejam os mais acurados para entender a dinâmica da proteção relacionada com esta classe de medicamentos.

Além desta questão taxonômica, este estudo apresentou limitação quanto à determinação das vias de apoptose relacionadas com a proteção evidenciada. Isso pode ser algo sensato a ser considerado, pois, na identificação da via (e suas cascatas) podem-se criar modos de focalizar a terapia ou a proteção, sem demais prejuízos.

No sentido da anatomia, conhecem-se sítios renais específicos para as afecções – túbulos, medula, vasos e células corticais intersticiais. Neste estudo, como o rim foi visto como um todo, o método não contemplou os sítios anatômicos relacionados com os padrões morfológicos de morte celular, e esta questão também permanece aberta.

Um ponto intrigante pode ser a relação temporal entre inflamação, uso do medicamento e análise da citometria de fluxo. Será que a prevenção da apoptose significou verdadeiro salvamento da morte celular, ou será que simplesmente ocorreu um atraso da sinalização apoptótica? Esta questão prudentemente deve ser levantada.

Além de tudo, o entendimento da biologia molecular está cada vez mais presente na ciência moderna. Assim, considerar o estudo das proteínas relacionadas com dano ou proteção também pode ser algo a se pesquisar. Métodos de avaliação de proteínas, como Western Blot, ou análises de imagens de microscopia eletrônica no intuito de observar os fosfolipídeos sinalizadores de apoptose podem ser caminhos científicos futuros.

De qualquer modo, com a criação de pequenas evidências, são possíveis novas questões no sentido de trazer maiores benefícios para esta e próximas gerações, e assim a dinâmica da ciência estabelece-se e perpetua-se.

7 CONCLUSÃO

Em rins de ratos analisados por citometria de fluxo, independentemente de os animais terem sido submetidos à hemorragia, a dose única de parecoxibe gerou maior quantidade de necrose, menor quantidade de apoptose e maior quantidade de células viáveis.

8 REFERÊNCIAS

Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm*. 2009; 2009:137072.

Ayala A, Perrin MM, Meldrum DR, Ertel W, Chaudry IH. Hemorrhage induces an increase in serum TNF which is not associated with elevated levels of endotoxin. *Cytokine*. 1990;2(3):170-4.

Bach PH, Nguyen TK. Renal papillary necrosis – 40 years on. *Toxicol Pathol*. 1998;26(1):73-91.

Batlouni M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(4):556-63.

Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(3):429-33.

Black HE. Renal toxicity of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Toxicol Pathol*. 1986;14(1):83-90.

Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(3):301-8.

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

Caetano AM, Vianna Filho PT, Castiglia YM, Golim MA, de Souza AV, de Carvalho LR, Deffune E, de Oliveira C, Vianna PT. Erythropoietin attenuates apoptosis after ischemia-reperfusion-induced renal injury in transiently hyperglycemic Wistar rats. *Transplant Proc*. 2011;43(10):3618-21.

Cerella C, Sobolewski C, Chateauvieux S, Henry E, Schnekenburger M, Ghelfi J, Dicato M, Diederich M. COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(10):1277-90.

- Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):323-33.
- Cheer SM, Goa KL. Parecoxib (parecoxib sodium). *Drugs*. 2001;61(8):1133-41.
- Cheng HF, Harris RC. Renal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr Pharm Des*. 2005;11(14):1795-804.
- Clive DM, Stoff JS. Renal syndromes associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *N Engl J Med*. 1984;310(9):563-72.
- Curi PC. Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas. Botucatu: Gráfica e Editora Tipomic; 1997.
- Curtis FG. Sevoflurano e dexmedetomidina em isquemia e reperfusão renais no rato [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2008.
- Cuzick J, Otto F, Baron JA, Brown PH, Burn J, Greenwald P, Jankowski J, La Vecchia C, Meyskens F, Senn HJ, Thun M. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):501-7.
- de Souza Silva M, Castiglia YM, Vianna PT, Viero RM, Braz JR, Cassetari ML. Rat model of depending prostaglandin renal state: effect of ketoprofen. *Ren Fail*. 2006;28(1):77-84.
- Diego LA, Marques CD, Vianna PT, Viero RM, Braz JR, Castiglia YM. Glibenclamide effects on renal function and histology after acute hemorrhage in rats under sevoflurane anesthesia. *Ren Fail*. 2007;29(8):1039-45.
- Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol*. 1999;162(1):196-203.

- El-Awady RA, Saleh EM, Ezz M, Elsayed AM. Interaction of celecoxib with different anti-cancer drugs is antagonistic in breast but not in other cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;255(3):271-86.
- Elrod HA, Yue P, Khuri FR, Sun SY. Celecoxib antagonizes perifosine's anticancer activity involving a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(9):2575-85.
- Erni D, Banic A, Wheatley AM, Siquerdsson GH. Haemorrhage during anaesthesia and surgery: continuous measurement of microcirculatory blood flow in the kidney, liver, skin and skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol*. 1995;12 (4):423-9.
- Feitoza CQ, Câmara NO, Pinheiro HS, Gonçalves GM, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, Santos OF. Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(1):79-84.
- Fredheim S, Borchgrevink PC, Kvarstein G. Post-operative pain management in hospitals. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2011;131(18):1772-6.
- Gambaro G, Perazella MA. Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors. *J Intern Med*. 2003;253(6):643-52.
- Giovanni G, Giovanni P. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 selective inhibitors have different renal effects? *J Nephrol*. 2002;15(5):480-8.
- Gluhovschi GH, Bozdog GH, Petrica L, Schiller A, Trandafirescu V, Velciov S, Gluhovschi C, Bob F. Multi-organ protection and the kidney. From nephroprotection, cardioprotection, neuroprotection to multi-organ protection. *Nefrologia*. 2004;24(6):519-30,532,534-5.
- Guedes FS Jr, Cruz DS, Rodrigues MM, Silva LM, Amorim RL, Vianna PT, Castiglia YM. Renal histology and immunohistochemistry after acute hemorrhage in rats under sevoflurane and ketoprofen effect. *Acta Cir Bras*. 2012 Jan;27(1):37-42
- Harris RC. COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 Suppl 1:S37-42.

Harris RC Jr. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol.* 2002;89(6A):10D-17D.

Höcherl K, Schmidt C, Bucher M. COX-2 inhibition attenuates endotoxin-induced downregulation of organic anion transporters in the rat renal cortex. *Kidney Int.* 2009;75(4):373-80.

Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S, Blanco J, Carrasco S, Sanchez-Niño MD, Benito-Martín A, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int.* 2012;81(11):1098-107.

John R, Herzenberg AM. Renal toxicity of therapeutic drugs. *J Clin Pathol.* 2009;62(6):505-15.

Jones P, Lamdin R. Oral cyclo-oxygenase 2 inhibitors versus other oral analgesics for acute soft tissue injury: systematic review and meta-analysis. *Clin Drug Investig.* 2010;30(7):419-37.

Kay MD, Brook N, Kaushik M, Harper SJ, Baqul A, Nicholson ML. Comparison of right and left laparoscopic live donor nephrectomy. *BJU Int.* 2006;98(4):843-4.

Komers R, Anderson S, Epstein M. Renal and cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(6):1145-57.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnenen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-20.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton, SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.

Lai MZ, Chen RH. Regulation of inflammation by DAPK. *Apoptosis.* 2014;19(2):357-63.

- Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology*. 2004;101(6):1313-24.
- Lee HT, Kim M, Jan M, Emala CW. Anti-inflammatory and antinecrotic effects of the volatile anesthetic sevoflurane in kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291(1):F67-78.
- Lieberthal W, Koh J, Levine S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol*. 1998;18(5):505-18.
- Lloyd R, Derry S, Moore RA, McQuay HJ. Intravenous or intramuscular parecoxib for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(2):CD004771.
- Livingston A. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2000;30(4):773-81.
- McConkey D J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*. 1998;99(3):157-68.
- Maund E, McDaid C, Rice S, Wright K, Jenkins B, Woolacott N. Paracetamol and selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs for the reduction in morphine-related side-effects after major surgery: a systematic review. *Br J Anaesth*. 2011;106(3):292-7.
- Merry AF, Jeffrey B, Souannwo O, Wilson IH, Eichhorn JH. International standards for a safe practice of anesthesia. *Can J Anaesth*. 2010;57(11):1027-34.
- Norregaard R, Jensen BL, Li C, Wang W, Knepper MA, Nielsen S, Frokiaer J. COX-2 inhibition prevents downregulation of key renal water and sodium transport proteins in response to bilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(2):F322-33.
- Nussmeier NA, Whelton AA, Brown M T, Joshi GP, Langford RM, Singla NK, Boye ME, Verburg KM. Safety and efficacy of the cyclooxygenase-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after noncardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006;104(3):518-26.

- O'Donnell DH, Moloney MA, Bouchier-Hayes DJ, Lee MJ. Contrast-induced nephrotoxicity: possible synergistic effect of stress hyperglycemia. *AJR Am J Roentgenol.* 2010;195(1):W45-9.
- Ortiz A, Justo P, Sanz A, Lorz C, Egido J. Targeting apoptosis is acute tubular injury. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1589-94.
- Ortiz A, Sanz AB, Muñoz García B, Moreno JA, Sanchez-Niño MD, Martín-Ventura JL, Egido J, Blanco-Colio LM. Considering TWEAK as a target for therapy in renal and vascular injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(3):251-8.
- Patel NS, Cuzzocrea S, Collino M, Chatterjee PK, Mazzon E, Britti D, Yagoob MM, Thiernemann C. The role of cyclooxygenase-2 in the rodent kidney following ischaemia/reperfusion injury in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2007;562(1-2):148-54.
- Pozarowski P, Grabarek J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry of apoptosis. *Curr Protoc Cell Biol.* 2004;Chapter 18:Unit 18.8.
- Rizzo MT. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clin Chim Acta.* 2011;412(9-10):671-87.
- Rosenberger C, Rosen S, Heyman SN. Renal parenchymal oxygenation and hypoxia adaptation in acute kidney injury. *Clin Exp Physiol.* 2006;33(10):980-8.
- Rudner J, Elsaesser SJ, Müller AC, Belka C, Jendrosseck V. Differential effects of anti-apoptotic Bcl-2 family members Mcl-1, Bcl-2, and Bcl-xL on celecoxib-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(1):10-20.
- Salehipour M, Bahador A, Jalaieian H, Salahi H, Nikeghbalian S, Khajehee F, Malek-Hosseini SA. Comparison of right and left grafts in renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2008;19(2):222-6.
- Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ortiz A. TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int.* 2011;80(7):708-18.
- Seaton BA, Dedman JR. Annexins. *Biometals.* 1998;11(4):399-404.

- Sivarajah A, McDonald MC, Thiernemann C. The cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia, are abolished by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(2):896-901.
- Singh G, Triadafilopoulos G. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *J Rheumatol Suppl*. 1999;56:18-24.
- Sinha M, Gautam L, Shukla P K, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Current perspectives in NSAID-induced gastropathy. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:258209.
- Surh YJ, Kundu JK. Signal transduction network leading to COX-2 induction: a road map in search of cancer chemopreventives. *Arch Pharm Res*. 2005;28(1):1–15.
- Swan SK, Rudy DW, Lasseter KC, Ryan CF, Buechel KL, Lambrecht LJ, Pinto MB, Dilzer SC, Obrda O, Sundblad KJ, Gumbs CP, Ebel DL, Quan H, Larson PJ, Schwartz JJ, Musliner TA, Gertz BJ, Brater DC, Yao SL. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in elderly persons receiving a low salt-diet. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2000;133(1):1-9.
- Szabó C. Mechanisms of cell necrosis. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S530-4.
- Ueda N, Walker PD, Hsu SM, Shah SV. Activation of a 15-kDa endonuclease in hypoxia/reoxygenation injury without morphologic features of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1995;92(16):7202-6.
- Ueda N, Kaushal GP, Shah SV. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am J Med*. 2000;108(5):403-15.
- Valle BL, D'Souza T, Becker KG, Wood WH 3rd, Zhang Y, Wersto RP, Morin PJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. *PloS One*. 2013;8(4):e61836.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231(25):232-5.

- Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med.* 1998;104(3A):2S-8S.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184(1):34-51.
- Volpato G. *Ciência: da Filosofia à Publicação.* 5ª Ed. São Paulo: Editora Cultura Acadêmica;2007.
- Wang D, Dobois RN. Prostaglandins and Cancer. *Gut.* 2006;55(1):115-22
- Whelton A, Maurath CJ, Verburg KM, Geis GS. Renal safety and tolerability of celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. *Am J Ther.* 2000;7(3):159-75.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1991;88(7):2692-6.
- Yu L, Chen M, Li Z, Wen J, Fu J, Guo D, Jiang Y, Wu S, Cho CH, Liu S. Celecoxib antagonizes the cytotoxicity of cisplatin in human esophageal squamous cell carcinoma cells by reducing intracellular cisplatin accumulation. *Mol Pharmacol.* 2011;79(3):608-17.
- Zadrazil J. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the kidney. *Vnitr Lek.* 2006;52(7-8):686-90.