

***José Pedro Calistro Neto***

**Interferência do parecoxibe sobre a função renal e a lesão de rins submetidos ao estresse isquêmico. Trabalho experimental em ratos com uso de NGAL como marcador de função renal**

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

**Orientador Prof. Dr. Guilherme Antonio Moreira Barros**

**Botucatu – SP**

**2014**

## *Dedicatória*

*Aos meus pais Toninho e Juçara,  
pelo amor, proteção, investimento, além de dedicarem suas vidas à família.*

*A minha esposa Cidinha,  
que amo desde o dia em que a conheci,*

*Aos meus irmãos Danila, Lucas e Moisés,  
que de forma direta e incondicional me apoiaram.*

## *Agradecimento aos Mestres*

*Ao Prof. Dr. Guilherme Antonio Moreira de Barros, pela oportunidade de ser seu residente e orientando, também pela pesquisa e transferência ininterrupta de seus conhecimentos na área de tratamento de dores e cuidados paliativos permitindo melhorar a qualidade de vida e dar alento a muitos pacientes.*

*A todos os Professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelos ensinamentos e dedicação não só a mim, mas a todos os alunos, residentes e pós-graduandos da Instituição. Sem os senhores e seus conhecimentos não seria possível à realização dessa e de outras pesquisas, bem como a formação e qualificação de outros colegas anestesilogistas para o exercício de tão honrosa especialidade.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Ao Dr. Leopoldo Muniz, pelos conselhos, orientação e análise estatística.*

*À Prof<sup>te</sup> Dr<sup>te</sup> Maria Aparecida Domingues pela avaliação histológica.*

*Ao Dr. Rômulo da Costa Torres e Acadêmica Giovanna Moraes Gonçalves, pela ajuda na realização experimental deste trabalho.*

*Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP, Joana Jacirene Costa Teixeira, pelo importante auxílio na diagramação dessa tese, Sônia Maria Martins da Silva e André Renato Passaroni pelo apoio e ajuda em todos esses anos.*

*À Neli Aparecida Pavan e Tatiane de Fátima Piniz, pela preciosa assistência durante toda a minha pós-graduação.*

*Aos técnicos do Laboratório Experimental Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, pela colaboração na realização do experimento.*

*Aos anestesiológicos da casa (Grupo CMA) do Hospital São Luiz em São Paulo-SP.*

*À FMB, UNESP, por ter me proporcionado ensino de qualidade e todas as condições necessárias para a minha formação.*

*A todos que direta ou indiretamente, ou mesmo sem saber, inspiraram ou contribuíram na conclusão desse projeto de pós-graduação.*

“E elevo meus olhos para o monte, de onde me vira o socorro? O meu socorro vem do Senhor que fez os céus e a Terra.”

SI 123.1

Calistro Neto JP. Interferência do parecoxibe sobre a função renal e a lesão de rins submetidos ao estresse isquêmico. Trabalho experimental em ratos com o uso de NGAL como marcador de função renal. Botucatu, 2014. 52p. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

**Justificativas e objetivos:** os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm mostrado sua eficácia na abordagem multimodal da dor, reduzindo o consumo de opioides na dor aguda pós-operatória. Embora os AINEs possam afetar a função renal, existem poucos dados da utilização de AINEs coxibes disponíveis nesse contexto. Os biomarcadores precoces de lesão renal aguda, como o NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), podem ser importantes aliados na determinação de lesão renal associada ao uso de AINEs coxibes no período perioperatório.

**Materiais e métodos:** após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental, 40 ratos Wistar foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos. Sob anestesia geral, e dependendo do grupo a qual os animais foram incluídos, eles foram submetidos a isquemia e reperfusão renal. Dois grupos receberam parecoxibe para avaliar a influência deste medicamento na função renal. Dosagem de NGAL e histologia renal bilateral foram realizadas para a avaliação da existência e grau da lesão renal.

**Resultados:** o grupo isquemia (que não recebeu injeção de parecoxibe) apresentou os maiores níveis de NGAL e maior frequência de lesão renal. O grupo que sofreu isquemia e recebeu parecoxibe apresentou níveis de NGAL e frequência de lesão renal similares aos outros grupos que não sofreram tal injúria.

**Conclusão:** neste modelo experimental, parecoxibe exibiu propriedades em promover proteção renal.

**Palavras-chave:** inibidores de ciclooxigenase, parecoxibe, modelo de isquemia e reperfusão renal, níveis de NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), lesão renal

Calistro Neto JP. Parecoxib interference on the function and tissue injury of kidney subjected to ischemic stress. Experimental study performed in rats using NGAL as a biomarker of kidney function. Botucatu, 2014. 52p. Dissertation (MS in Anesthesiology), Botucatu Medical School, UNESP-Univ. Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

**Background and aims:** nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been proved to be effective, in a multidimensional approach, at reducing the opioid consumption during the postoperative acute pain. Although the NSAIDs may affect the renal function, there are few published data related to the use of coxibs and the kidney function. The early biomarkers of acute renal injury (EBARI) may be important tool to determining the actual risk associated with the use of coxibs NSAIDs in the perioperative period.

**Methods:** after approval by Experimental Ethics Committee, 40 male Wistar rats were randomly assigned into four groups. Under general anesthesia, and depending on the assigned group, rats underwent renal ischemia and reperfusion. Parecoxib was injected in two of the groups to evaluate the coxib influence on the renal function. Parametric data, serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), an EBARI, and right and left renal histology were used to evaluate there renal function.

**Results:** the animals of ischemia group which did not receive parecoxib showed the highest NGAL serum level, as well as the most severe tubular injury. The animals on ischemia group which received parecoxib showed NGAL plasmatic levels and tubular injury similar to the groups not subjected to renal ischemia.

**Conclusion:** on this experimental model, parecoxib showed protective renal properties.

**Keywords:** COX-2 inhibitors, parecoxib, renal isquemia-reperfusion stress model, serum neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), renal injury model.

## Lista de Abreviaturas

<b>AINEs</b> -	anti-inflamatório
<b><math>\alpha</math>- MSH</b> -	hormônio estimulante $\alpha$ de melanócitos
<b>bpm</b> -	batimentos por minutos
<b>°C</b> -	graus Célsius
<b>CEC</b> -	circulação extracorpórea
<b>COX</b> -	ciclooxigenase
<b>ELISA</b> -	enzyme linked immuno sorbent assay
<b>FSR</b> -	fluxo sanguínea renal
<b>FC</b> -	frequência cardíaca
<b>GI</b> -	grupo Isquemia
<b>GIP</b> -	grupo isquemia parecoxibe
<b>GSI</b> -	grupo sem isquemia
<b>GPSI</b> -	grupo parecoxibe sem isquemia
<b>g</b> -	grama
<b>IRA</b> -	insuficiência renal aguda
<b>I/R</b> -	isquemia e reperfusão
<b>IL</b> -	interleucinas
<b>IV</b> -	intravenoso
<b>LRA</b> -	lesão renal aguda
<b>LES</b> -	lúpus eritematoso sistêmico
<b>l/min</b> -	litros por minuto
<b>ml/kg</b> -	mililitro por quilograma
<b>mg/kg</b> -	miligrama por quilograma
<b>mcg</b> -	microgramas
<b>M</b> -	momentos
<b>NGAL</b> -	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
<b>ng/ml</b> -	nanograma por mililitro
<b>PA</b> -	pressão arterial
<b>PAM</b> -	pressão arterial media
<b>PGs</b> -	prostaglandinas
<b>SNC</b> -	sistema nervoso central
<b>SNP</b> -	sistema nervoso periférico
<b>TXA-2</b> -	Tromboxano A- 2
<b>TFG</b> -	taxa de filtração glomerular
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> -	fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>T</b> -	temperatura



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Corte histológico representativo de picnose nuclear.....	28
<b>Figura 2</b>	Corte histológico representativo de cariorrexe.....	29
<b>Figura 3</b>	Corte histológico representativo de cariólise ou cromatólise.....	29
<b>Figura 4</b>	Peso por grupos.....	33
<b>Figura 5</b>	PAM por grupos e momentos.....	34
<b>Figura 6</b>	Frequência cardíaca por grupos e momentos.....	35
<b>Figura 7</b>	Temperatura por grupos e momentos.....	36
<b>Figura 8</b>	NGAL por grupos e momentos.....	37
<b>Figura 9</b>	Frequência absoluta quanto à ocorrência de lesão renal histológica esquerda nos Grupos Isquemia e Grupo Isquemia Parecoxibe.....	39

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos animais nos quatro grupos estudados.....	25
<b>Tabela 2</b>	Escore dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos.....	28
<b>Tabela 3</b>	Valores de média e desvio padrão referentes ao peso segundo grupos e momentos.....	33
<b>Tabela 4</b>	Valores referentes à PAM (mmHg) expressos em média e desvio padrão segundo grupos e momentos.....	34
<b>Tabela 5</b>	Valores referentes FC (em bpm) expressos em média e desvio padrão segundo momentos e grupos.....	35
<b>Tabela 6</b>	Valores referentes à T (°C) corpórea, expressos em média e desvio padrão segundo momentos e grupos.....	36
<b>Tabela 7</b>	Dosagem de NGAL, em picogramas por mililitro (pg/ml), relativos à média e desvio padrão segundo momentos e grupos.....	37
<b>Tabela 8</b>	Intensidade de lesão nos rins direito e esquerdo.....	39
<b>Tabela 9</b>	Escore de lesão renal em rins direito e esquerdo além de níveis de NGAL, em M4.....	52

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 Ciclooxigenase e seus produtos.....	12
1.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais.....	14
1.3 Parecoxibe.....	14
1.4 Fisiopatologia da lesão renal por isquemia e reperfusão.....	16
1.5 Biomarcadores precoces e tardios da função renal.....	17
1.6 NGAL.....	18
1.7 Justificativa.....	21
<b>2 OBJETIVO</b> .....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	23
3.1 Técnica anestésica.....	23
3.2 Grupos experimentais.....	23
3.3 Manobras de isquemia e reperfusão renal.....	25
3.4 Cálculo da dose de parecoxibe.....	25
3.5 Momentos estudados.....	26
3.6 Atributos estudados.....	26
3.7 Amostras sanguíneas.....	27
3.8 Avaliação histológica.....	27
3.9 Sequência experimental.....	30
3.10 Análise estatística.....	32
<b>4 RESULTADOS</b> .....	33
4.1 Peso.....	33
4.2 Pressão arterial média.....	34
4.3 Frequência cardíaca.....	35
4.4 Temperatura.....	36
4.5 <i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> .....	37
4.6 Histologia renal.....	38
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	46
<b>APÊNDICE</b> .....	52

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ciclooxygenase e seus produtos

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem uma das classes mais comuns de medicamentos utilizados mundialmente. Estima-se que mais de 30 milhões de pessoas fazem uso desses medicamentos diariamente (Singh et al., 1999). Eles são os fármacos mais habitualmente empregados em situações de dor aguda. Conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos, estes fármacos estão entre os mais prescritos pelos clínicos, possuindo amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, anti-inflamação, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares, e são importante instrumento no tratamento da dor pós-operatória (Kummer e Coelho, 2002).

Os AINEs inibem de forma reversível as ciclooxigenases (COX) do tipo 1 e 2, enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas (PGs) e tromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) através da lise do ácido aracdônico. Este último é fruto da lise dos fosfolipídios de membrana que são liberados quando ocorre lesão celular, pela ação da fosfolipase. Além de seu papel na inflamação e dor, as PGs são importantes mediadores do tônus vascular renal, da reabsorção de sal e de água e da liberação de renina (Harris, 2006).

A COX-1 é enzima constitutiva em diversos órgãos e sistemas (renal, cardiovascular, gastrointestinal e nervoso) e nas plaquetas relacionada à manutenção da fisiologia nos sítios onde é expressa. Já a COX-2 tem a sua síntese induzida em situações de lesão ou inflamação de tecidos, mas também é constitutiva em alguns órgãos e sistemas, exercendo papel importante na manutenção da normalidade no caso de agressão sofrida por estes (Dirig et al., 1998).

A COX-2 é expressa no tecido renal de várias espécies de mamíferos e possui papel importante na dinâmica renal. Na mácula densa é encontrada de forma constitutiva e a sua expressão aumenta nos casos de lesão renal. Outros segmentos do tecido renal também são sítios de produção de COX-2, como a porção ascendente

espessa da alça de Henle, as células intersticiais medulares, o interior da medula e da papila (Harris, 2006).

No sistema nervoso central (SNC) as COX1 e 2 estão constitutivamente presentes sendo que a COX-2 é, geralmente, expressa em pequenas quantidades e o seu aumento, tanto no sistema nervoso central (SNC) como no sistema nervoso periférico (SNP), está associado à ocorrência de lesão tecidual e ou à inflamação (Cohen e Perl, 1990; Dirig et al., 1998). Nos rins a COX-1 é expressa constitutivamente e tem sua maior expressão nas células mesangiais, células endoteliais arteriolas, células epiteliais parietais da cápsula de Bowman e ductos coletores da cortical e medular (Smith e Bell, 1978; Komhoff et al., 1997).

Entretanto, as PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> são os prostanóides COX-2 que possuem funções renais melhores definidas. A PGE<sub>2</sub> é mediadora da reabsorção de sódio no túbulo renal distal e atua como fator contrarregulador, em condições de aumento da reabsorção de sódio, limitando a reabsorção de sal e água (Brater et al., 2001). Elas também aumentam a secreção de potássio ao estimularem a secreção de renina e a ativação do sistema renina angiotensina aldosterona. As PGI<sub>2</sub> atuam no epitélio endotelial com ação vasodilatadora. Estas PGs vasodilatadoras aumentam o fluxo sanguíneo renal (FSR) e a taxa de filtração glomerular (TFG) em condições associadas com a diminuição da volemia em circulação, resultando em maior fluxo tubular e conseqüente maior secreção de potássio (Whelton, 2000).

Em indivíduos saudáveis, hidratados, as PGs renais não desempenham papel importante na homeostase de sódio e água (Whelton, 2000). Entretanto, em condições de perfusão renal diminuída, como na desidratação, na perda de sanguínea, na insuficiência cardíaca congestiva, na cirrose, no uso de diuréticos, ou na ingestão diminuída de sódio, as PGs renais desempenham mecanismo compensatório importante e, nestas condições, os AINEs podem diminuir a TFG e até induzir quadros de insuficiência renal aguda (IRA) (Breyer et al., 2001; Brater, 2002; Harris, 2006; Koppert et al., 2006).

## 1.2 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os AINEs classificados como não seletivos inibem indistintamente tanto a COX-1 como a COX-2 e a inibição da primeira é a responsável pela ocorrência dos eventos adversos gastrintestinais, como a ulceração e o sangramento; dos renais, como a diminuição da perfusão renal e do ritmo de filtração glomerular, aparecimento de edema, da hipertensão e da nefrite intersticial; e os relacionados à hemostasia, por interferência na agregação plaquetária (Nussmeier et al., 2006; Zhang et al., 2006). Dessa forma, os AINEs que inibem seletivamente a COX-2 foram desenvolvidos para reduzir os efeitos indesejados gástricos, plaquetários e renais, mas preservando a eficácia semelhante à dos AINEs ditos convencionais (Lloyd et al., 2009).

A lesão renal aguda representa uma situação potencialmente devastadora e importante na clínica. Sua prevalência varia entre 5% entre os pacientes admitidos nos hospitais e 30 a 50% dos admitidos nas unidades de terapia intensiva e está associada a alta mortalidade (Mishra et al., 2005). Os AINEs são responsáveis por 7% dos casos de pacientes com IRA e por cerca de 40% dos casos de IRA secundários ao uso de fármacos (Moore et al., 2010). A instalação da IRA associada à ingestão de AINEs geralmente ocorre dentro de alguns dias do início da terapia e parece ser mais rápida com agentes que têm uma meia-vida curta (Harris, 2006).

Como dito anteriormente, os não seletivos diminuem o ritmo de filtração glomerular e, reciprocamente, em condições de alta restrição de sal, ou expansão volêmica, eles podem induzir à retenção de sal e podem elevar a pressão sanguínea, ou piorar a hipertensão pré-existente. É estimado que mais de 2.5 milhões de americanos apresentem anualmente efeitos adversos renais, e suas consequências clínicas, secundários ao uso destas medicações. Portanto seus efeitos renais são bem conhecidos (Harris, 2006).

## 1.3 Parecoxibe

O parecoxibe é o primeiro e único AINE inibidor seletivo da COX-2 disponível para uso parenteral (Cheer e Goa, 2001), o que o torna ideal para o tratamento da dor

aguda pós-operatória, quando é preferível o uso dos analgésicos por via parenteral. O parecoxibe é uma pró-droga que possui como metabólito ativo o valdecoxibe. A sua prescrição em pacientes com hipersensibilidade às sulfas ou a outros AINEs está associada à ocorrência de efeitos adversos graves, como anafilaxia, angioedema e necrólise epidérmica tóxica, motivo pelo qual é contraindicado nesses casos (Lloyd et al., 2009).

Essa classe de medicamentos, genericamente chamada de *coxibes*, é uma importante aliada no tratamento da dor aguda pós-operatória. Entretanto, alguns estudos apontam que o uso do parecoxibe pode resultar em retenção de sódio, edema, elevações na pressão arterial, desequilíbrio eletrolítico, inibição da produção e secreção de renina e diminuição do TFG (Harris, 2002; Cheng e Harris, 2005;). Entretanto em metanálise conduzida por Zang et al. (2006), o rofecoxibe foi o único inibidor seletivo da COX-2 que pode ser associado ao risco de disfunção renal, de hipertensão e de edema.

Um grande estudo duplo cego, aleatório, placebo controlado, constatou aumento da incidência de eventos trombóticos cardiovasculares nos grupos de pacientes que utilizaram parecoxibe ou valdecoxibe durante dez dias após cirurgias de revascularização do miocárdio. Portanto não é recomendado o uso de inibidores seletivos da COX-2 após este tipo de procedimento (Nussmeier et al., 2005).

Pacientes submetidos a cirurgias não cardíacas não apresentaram risco aumentado de eventos cardiovasculares, gastrintestinais, infecciosos, disfunções renais ou alteração na cicatrização após o uso de parecoxibe, comparado com o placebo (Nussmeier et al., 2006; Schug et al., 2009). Além disso, pacientes tratados com parecoxibe apresentam melhor controle analgésico e melhor recuperação – com menor consumo de opioides e menor ocorrência de efeitos adversos associados aos opioides – quando comparados com pacientes que receberam placebo, comprovando sua eficácia e segurança na analgesia pós-operatória de cirurgias não cardíacas (Malan et al., 2003; Niruthisard et al., 2007).

A administração de parecoxibe prévia à cirurgia, ou no intraoperatório, melhora o seu desempenho analgésico quando comparado à sua administração no

período pós-operatório (Desjardins et al., 2001; Riest et al., 2008). O parecoxibe é considerado analgésico eficaz para o tratamento de dor pós-operatória, com baixa incidência de efeitos adversos, quando utilizado em dose única ou em curto prazo (Niruthisard et al., 2007; Lloyd et al., 2009).

Em alguns experimentos desenvolvidos para avaliar os efeitos dos AINEs sobre a função renal nos modelos de sepse grave e isquemia e reperfusão renal, verificou-se que o pré-tratamento com parecoxibe melhora a função renal (Hocherl et al., 2009). Em estudo que se utilizou de modelo de isquemia e reperfusão (I/R) o parecoxibe aumenta a disfunção e a lesão renal em ratos submetidos à agressão de I/R, efeitos atribuídos à diminuição da expressão da COX-2 (Patel et al., 2007).

Portanto a utilização desse medicamento e a sua interferência no funcionamento renal, principalmente em situações de *stress* renal, desperta interesse da comunidade científica. Os dados disponíveis na literatura não permitem afirmar de forma conclusiva se o emprego do parecoxibe nessas condições pode agravar ou, ao contrário, conferir proteção renal.

#### **1.4 Fisiopatologia da lesão renal por isquemia e reperfusão**

Em um modelo de I/R renal, vários mecanismos contribuem para a lesão renal aguda (LRA): alterações da perfusão renal, perda da autorregulação, aumento da vasoconstrição renal, perda do citoesqueleto e da polaridade celular com disfunção e morte celular por apoptose e necrose. A descamação de células viáveis e mortas contribui para a obstrução intratubular renal. Alterações metabólicas resultam em anormalidades no balanço tubuloglomerular e na produção de mediadores pró-inflamatórios e edema vascular (Vaidya et al., 2008).

A reperfusão tecidual que ocorre com a restauração do fluxo sanguíneo para o órgão isquêmico, embora necessária para evitar lesão celular irreversível, ocasiona maiores lesões celulares do que as causadas pela própria isquemia. Este dano celular que ocorre após a reperfusão de um tecido previamente isquêmico, é denominado lesão de reperfusão. A lesão de I/R causa resposta inflamatória local e sistêmica, podendo resultar em disfunção múltipla de órgãos e sistemas.



Atualmente, acredita-se que a inflamação desempenha papel primordial na fisiopatologia das LRA isquêmicas. A isquemia renal promove lesão de células endoteliais e tubulares, liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, e infiltração leucocitária para o tecido renal (Bonventre e Zuk, 2004). As citocinas pró-inflamatórias interleucinas 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-18 (Miura et al., 2001; Cugini et al., 2005) e IL-6 atuam na lesão renal aguda isquêmica, enquanto a IL-10 e o hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócito ( $\alpha$ -MSH) são citocinas endógenas anti-inflamatórias, ou moduladoras, que inibem as vias de inflamação e citotoxicidade, desempenhando papel protetor nas lesões renais isquêmicas.

### **1.5 Biomarcadores precoces e tardios da função renal**

As citocinas previamente citadas, envolvidas diretamente na lesão isquêmica renal, podem ser mensuradas, assim como outras moléculas estão disponíveis como biomarcadores na detecção de LRA e muitas outras estão sendo estudadas. Entre eles pode-se destacar a molécula de lesão renal-1 (KIM-1), IL-18 e enzimas tubulares (Han et al., 2002; Westhuyzen et al., 2003; Parikh et al., 2004; Coca et al., 2008), *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) dentre outros (Devarajan, 2008).

Na prática clínica a avaliação da função renal é frequentemente realizada através da mensuração dos níveis séricos e urinários de creatinina. Infelizmente, embora esse seja o marcador de função renal mais utilizado, a creatinina sérica é um indicador tardio e pouco confiável de LRA, pois é influenciada por fatores não relacionados à função renal como sexo do indivíduo, idade, massa e metabolismo muscular, medicamentos em uso, estado de hidratação, nutrição e da secreção tubular da própria creatinina. Grandes números de condições renais deletérias agudas e crônicas podem existir sem que ocorra aumento significativo da creatinina sérica. Esse comportamento se deve à existência de reserva funcional renal que impede aumento de creatinina sérica até que mais de 50% da função renal seja perdida. Portanto, a elevação da concentração sérica de creatinina é tardia em relação à queda da TFG e ao dano tecidual renal (Devarajan, 2010).

## 1.6 NGAL

A NGAL surgiu recentemente como biomarcador sensível, específico e precoce para a detecção LRA. Observa-se experimentalmente rápida expressão de NGAL em modelo de I/R renal (Mishra et al., 2003). Ele tem sido clinicamente testado em cirurgias cardíacas em crianças sob circulação extracorpórea (CEC) (Mishra et al., 2005), também na avaliação da função renal pós uso de contraste (Finn 2006; Ling et al., 2008) e em medicina intensiva em condições clínicas associadas à atividade inflamatória sistêmica (Bagshaw et al., 2008; Mårtensson et al., 2010; Shapiro et al., 2010), como sepse, choque séptico e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS). Em todas essas situações NGAL mostrou-se biomarcador precoce confiável de LRA. Em condições de lesão epitelial ocorre uma elevação de seus valores no plasma em torno de dez vezes e de cem vezes na urina, correlacionado com valores elevados de creatinina (Nguyen et al., 2008; Di Grande et al., 2009).

NGAL é uma proteína de 25 KD (Kjeldsen et al., 1993) expressa em baixas concentrações em diversos tecidos humanos, incluindo rins, traqueia, pulmões, estômago e cólon. Sua expressão se inicia após evento lesivo, aparecendo em precursores granulocíticos e no epitélio dos órgãos citados. Também conhecidas por lipocalinas se ligam a receptores celulares específicos, e também formam complexos com outras moléculas em solução, gerando compostos macromoleculares (Flower, 1996; Flower, 2000).

Um dos ligantes de NGAL identificado foi uma molécula de transporte de ferro de micro-organismos chamada sideróforo (Goetz et al., 2002; Mori et al., 2005). A ligação da NGAL com o sideróforo restringe o ferro necessário ao desenvolvimento e multiplicação das bactérias o que configura um mecanismo de imunidade inata. A deficiência de NGAL causa maior suscetibilidade às infecções bacterianas, a exemplo da infecção por *Escherichia coli*. (Berger et al., 2006).

NGAL estimula a produção de fatores de crescimento e diferenciação celular nos diversos epitélios lesados (Yang et al., 2003). No epitélio renal em desenvolvimento, ativa genes que transformam as células epiteliais primitivas em

estruturas glomerulares, túbulos proximais, distais e alças de Henle. No epitélio maduro, pode promover a organização de estruturas funcionais. As culturas de células de ductos coletores, sob efeito da NGAL, produzem estruturas tubulares semelhantes aos túbulos renais adultos (Gwira et al., 2005).

Portanto a NGAL está relacionada com a regeneração e diferenciação celular interferindo com a apoptose celular e restauração tecidual através do transporte de ferro e o despertar de genes com as funções acima citadas (Devireddy et al., 2005). Em um modelo de I/R em ratos demonstrou-se que uma única dose de NGAL administrada durante o início da isquemia renal protegeu o rim, preservou a integridade tubular e atenuou a azotemia (Mori et al., 2005).

Outra característica importante da NGAL é sua participação nos processos inflamatórios e infecciosos (Xu et al., 1995). Isto ocorre porque NGAL compartilha com as interleucinas pró-inflamatórias o mesmo fator nuclear de produção a partir de estímulos periféricos, o fator nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), responsável pela promoção de síntese de IL inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 e NGAL (Tak e Firestein, 2001). Na inflamação crônica, a produção de NGAL está também aumentada, o que pode ser explicado pela produção elevada no tecido inflamado, ou ainda pela produção em sítios distantes, como o fígado, através da mediação das Interleucinas circulantes IL-1 e IL-6 (Jayaraman et al., 2005).

Em estudo em que 71 crianças submetidas à correção de cardiopatia congênita, NGAL mostrou ter alto valor preditivo para LRA, tanto em dosagem urinária, quanto em plasmática. Nesse estudo, duas horas após o término da CEC, o NGAL foi considerado o mais poderoso preditor independente de LRA. Já o diagnóstico baseado no marcador funcional creatinina ocorreu após 24-48 horas, portanto bem mais tardiamente (Mishra et al., 2005). Outros estudos nessa mesma população mostraram resultados semelhantes (Wagener et al., 2006; Haase et al., 2010).

Em 661 pacientes com suspeita de sepse, NGAL foi um bom marcador preditivo para diagnóstico e prognóstico de LRA. Concentrações plasmáticas > 150 ng/mL mostraram 96% de sensibilidade e 51% de especificidade para detecção de LRA dentro de 72 horas de acompanhamento (Shapiro et al., 2010). Outro estudo

selecionou pacientes com resposta inflamatória por diversas causas, dentre elas síndrome de resposta inflamatória sistêmica, sepse e choque séptico com e sem LRA. NGAL sérico e urinário mostraram-se bons preditores de LRA nesse contexto (Mårtensson et al., 2010).

A nefropatia induzida por contraste responde por boa parte dos casos de LRA na atualidade, sendo a toxicidade tubular causada por hipóxia tecidual. A NGAL, em alguns estudos, mostrou-se capaz de prever esta morbidade com sensibilidade de 73%, especificidade de 100% dentro de duas a quatro horas após a exposição ao contraste (Finn et al., 2006; Ling et al., 2008). Metanálise recente envolvendo 2.538 pacientes mostrou que a sensibilidade e especificidade da NGAL para LRA variou entre 75% e 95% em pacientes críticos ou após exposição ao contraste. No mesmo estudo, NGAL mostrou excelente valor preditivo para LRA (80%) e para início da terapia de substituição renal (78%). O ponto de corte da NGAL variou conforme a etiologia da insuficiência renal, mas, de maneira geral, ficou acima de 150 ng/mL (Haase et al., 2009).

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) afeta os rins de crianças de forma mais rápida e frequente do que nos de adultos. Em tais pacientes, os valores de NGAL foram duas vezes maiores do que os encontrados em portadores de artrite idiopática juvenil. Níveis de NGAL correlacionam-se bem com doença renal, mas não com atividade extrarrenal do LES. Em outro estudo, valores de NGAL foram encontrados elevados mais de três meses antes da piora da nefrite lúpica (Brunner et al., 2006; Hinze et al., 2009).

Em pacientes transplantados renais, o risco de LRA causada por retardo na funcionalidade do enxerto é alto. Estima-se que ocorra em 4% a 10% em caso de doadores vivos e 5% a 50% quando o órgão advém de cadáveres. Nestes pacientes, as dosagens urinárias de NGAL encontradas também foram altas. De maneira inversa, a NGAL urinária foi capaz de prever esse retardo da função do enxerto de maneira significativa, quando aferida imediatamente após o transplante. Quando comparada à creatinina para este fim, a NGAL mostrou-se superior (Parikh et al., 2004; Hall et al., 2010).

A dosagem da NGAL pelo método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), identifica seu aumento antes mesmo do desenvolvimento da LRA, sendo então a NGAL plasmática e urinária um biomarcador sensível, específico e altamente preditivo de LRA. Os valores normais da concentração urinária em adultos e crianças são semelhantes (1,0-20,0 ng/mL). Os valores normais da concentração plasmática em adultos e crianças diferem um pouco (70-105 ng/mL vs. 30-80 ng/mL). Portanto, sua concentração aumenta dramaticamente em resposta à injúria tubular com níveis séricos aumentados em até duas horas após instalada a lesão e precedendo o aumento da creatinina em 24 horas ou mais em todas as situações clínicas e experimentais comentadas acima (Moore et al., 2010).

## 1.7 Justificativa

Os analgésicos que apresentam ações sinérgicas aos opioides são eficazes em oferecer melhor qualidade do tratamento da dor pós-operatória.

A ação poupadora de opióides atribuída aos fármacos inibidores da COX-2 é amplamente reconhecida na literatura. Há, entretanto, relatos contraditórios dos efeitos desses fármacos quando estudados em modelos experimentais de lesão renal, sendo ora reconhecidos como fator de proteção renal, ora como fator deletério sobre a função renal.

Além disso, o emprego dos inibidores da COX-2 com o propósito de melhorar a analgesia pós-operatória pode estar associado à ocorrência de efeitos indesejáveis e, dentre estes, as potenciais alterações da função renal. NGAL, biomarcador precoce de insuficiência renal, pode ter importância na determinação precoce de lesões renais associadas ao emprego de AINEs, do tipo *coxibes*, no perioperatório.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência do parecoxibe na função renal em ratos submetidos a I/R renal, através da dosagem do NGAL plasmático.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, o estudo foi conduzido de forma prospectiva e os grupos randomizados de forma encoberta. Foram incluídos 40 ratos Wistar, machos, com pesos superiores a 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu, divididos em quatro grupos experimentais. O número de animais utilizados foi escolhido com base em referência bibliográfica (Park et al., 2008) empregada em pesquisas previamente realizadas no Laboratório Experimental de Anestesiologia em que metodologia semelhante foi empregada.

#### 3.1 Técnica anestésica

Todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e pesagem antes da indução anestésica. Foram induzidos e mantidos sob anestesia inalatória, receberam anestesia infiltrativa previamente a realização das cervicotomias e laparotomia mediana além de nefrectomia à direita. A monitorização contínua incluiu pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), temperatura retal (T) bem como foi realizada infusão contínua com o objetivo de prover reposição volêmica de 5 mL/h de Ringer lactato, via bomba de infusão contínua. Cada 1 mL de amostra sanguínea coletado para dosagens bioquímicas foi prontamente repostado com 2 mL de Ringer lactato em *bolus*. Dispositivos de aquecimento e gaiolas climatizadas também foram utilizados.

#### 3.2 Grupos experimentais

Os animais foram randomizados em quatro grupos de 10 animais, segundo descrição abaixo e resumidos na tabela 1.

**Grupo Isquemia (GI):** animais submetidos à indução anestésica com isoflurano, concentração inspirada de 4%, e manutenção anestésica contínua em concentração de 1,5% a 2%. Após estabelecimento da via aérea, obtenção de acesso

venoso, início de reposição volêmica, monitorização da pressão arterial invasiva, realizou-se laparotomia mediana seguida de nefrectomia à direita. A artéria renal esquerda foi clampeada por um período de 30min. Não foi administrado parecoxibe, apenas solução salina 2 mL/kg intravenoso (IV) na obtenção do acesso venoso. As coletas sanguíneas foram conduzidas conforme a sequência experimental.

**Grupo Isquemia Parecoxibe (GIP):** animais submetidos à indução anestésica com isoflurano, concentração inspirada de 4%, e manutenção anestésica contínua em concentração de 1,5% a 2%. Após estabelecimento da via aérea, obtenção de acesso venoso, início da reposição volêmica e monitorização da pressão arterial invasiva, realizou-se laparotomia mediana seguida de nefrectomia à direita. A artéria renal esquerda foi clampeada por 30min. Foi administrado 20 mg/kg de parecoxibe em 2 mL/kg de solução salina IV previamente à cirurgia, após instalação de acesso venoso. As coletas sanguíneas foram conduzidas conforme a sequência experimental.

**Grupo sem Isquemia (GSI):** animais submetidos à indução anestésica com isoflurano, concentração inspirada de 4%, e manutenção anestésica contínua em concentração de 1,5% a 2%. Após estabelecimento da via aérea, obtenção de acesso venoso, início da reposição volêmica e monitorização da pressão arterial invasiva, realizou-se laparotomia mediana, seguida de nefrectomia à direita. Não foi realizada isquemia renal esquerda. Apenas solução salina 2 mL/kg foi administrada IV. Coletas sanguíneas conduzidas conforme descrito na sequência experimental.

**Grupo Parecoxibe sem Isquemia (GPSI):** animais submetidos à indução anestésica com isoflurano, concentração inspirada de 4%, e manutenção anestésica contínua em concentração de 1,5% a 2%. Após estabelecimento da via aérea, obtenção de acesso venoso e arterial. Início da reposição volêmica e monitorização da pressão arterial invasiva. Realizou-se laparotomia mediana, seguida de nefrectomia à direita. A artéria renal esquerda não foi clampeada. Administrado 20mg/kg de parecoxibe em 2 mL/kg de solução salina IV previamente à realização da cirurgia, após instalação de acesso venoso. Coletas sanguíneas conduzidas conforme descrito na sequência experimental.



**Tabela 1.** Divisão dos animais em quatro grupos: grupo isquemia (GI), grupo isquemia parecoxibe (GIP), grupo sem isquemia (GSI), grupo parecoxibe sem isquemia (GPSI)

Grupos	Anestesia inalatória	Nefrectomia direita	Isquemia renal esquerda	Uso de parecoxibe
GI	+	+	+	-
GIP	+	+	+	+
GSI	+	+	-	-
GPSI	+	+	-	+

### 3.3 Manobras de isquemia e reperfusão

As manobras de isquemia e reperfusão foram realizadas nos grupos GI e GIP e tiveram início aproximadamente 15 minutos após a nefrectomia direita. Consistem na identificação e clampeamento da artéria renal esquerda, por meio de clipe metálico atraumático, por período de 30min. Após esse intervalo o desclampeamento e início da reperfusão. Os animais dos GSI e GPSI não sofreram isquemia, porém passaram pelo procedimento cirúrgico e tiveram seus tempos de coletas respeitados.

Animais do GI sofreram apenas isquemia renal e não receberam parecoxibe. Os animais do GIP além de isquemia receberam parecoxibe. Os animais do GSI e GPSI não foram submetidos à isquemia e à reperfusão, sendo que os animais do GSI também não receberam parecoxibe. Já os animais do GPSI receberam a medicação.

### 3.4 Cálculo da dose de parecoxibe

Neste trabalho, as doses de parecoxibe utilizadas nos ratos foram obtidas a partir da fórmula preconizada pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Esta fórmula converte a dose de fármacos em ratos (DR) em dose equivalente em humanos, tanto em mg/kg quanto mcg/kg. Portanto, o objetivo do uso desta fórmula consiste em aproximar a dose utilizada no animal da dose clinicamente utilizada em humanos (DEH).

$$DEH = DR \times 0,16$$

### 3.5 Momentos estudados

Foram utilizados para coleta de amostras sanguíneas e anotação de dados paramétricos no estudo os seguintes momentos:

**M1:** imediatamente após obtenção acesso arterial;

**M2:** cinco minutos após início do clampeamento e isquemia renal esquerda;

**M3:** vinte minutos após desclampeamento e início da reperfusão renal;

**M4:** vinte e quatro horas após início do procedimento.

No último momento, sob anestesia inalatória, foi realizada nefrectomia esquerda para posterior análise histológica e obtido amostra sanguínea através de punção cardíaca com posterior sacrifício do animal por injeção de superdosagem de pentobarbital. Todos os animais tiveram seus momentos de coletas sanguíneas e registros de dados paramétricos respeitados e contínuos em cada grupo.

### 3.6 Atributos estudados

- Peso (g)
- Pressão arterial média milímetros de mercúrio (mmHg)
- Frequência Cardíaca em batimentos por minutos (bpm)
- Temperatura corpórea em grau Celsius (°C)
- Dosagem plasmática de NGAL
- Histologia renal

#### 3.6.1 Peso

A pesagem dos animais foi em balança de precisão, digital, modelo SSR 3000, marca Bel Engeniring.

#### 3.6.2 Pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura

A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram obtidas por meio da disseção e cateterização de artéria carótida esquerda com cânula calibre

24G. A temperatura (T) foi monitorizada através da inserção de probe retal e a adequada manutenção da temperatura ocorreu pela utilização de bolsas térmicas (Bolsa térmica Gel-Body Care Mercury) objetivando mantê-la em torno de 37°C. O monitor Datex Engestron, modelo A/3 série 763117 – Finlândia, foi utilizado na monitorização contínua da PAM, FC e T, bem como suas tomadas nos momentos analisados.

### **3.7 Amostras Sanguíneas**

As amostras sanguíneas foram coletadas nos quatro momentos para realização de dosagem sérica dos níveis de NGAL, foram centrifugadas e o sobrenadante armazenado em freezer a -80°C. O método utilizado para tal foi ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*), teste imunoenzimático o qual detecta anticorpo específico plasmático por interação antígeno anticorpo NGAL pelo “kit Rat NGAL ELISA (kit 46)”.

### **3.8 Avaliação histológica**

Os rins direito e esquerdo dos animais, retirados nos diferentes momentos, foram colocados separadamente em dois frascos identificados contendo solução Duboscq-Brasil, durante 24 horas, sendo, a seguir, armazenados em álcool a 70%. A solução de Duboscq-Brasil é uma solução utilizada para preservar e fixar as estruturas renais e aumentar a fidedignidade da análise histológica. Ela é composta por álcool 80%, 150 mL; ácido pícrico, 2,4 g; formalina 40%, 60 mL; ácido acético glacial 12,5 mL. O corante utilizado para a análise histológica foi a hematoxilina-eosina e os cortes foram analisados sob diversos aumentos na microscopia óptica. Após o preparo das lâminas renais, com fixação em parafina, foram avaliadas quanto à porcentagem de necrose tubular e classificadas com o uso de um escore descrito por Park et al. (2008) (Tabela 2).

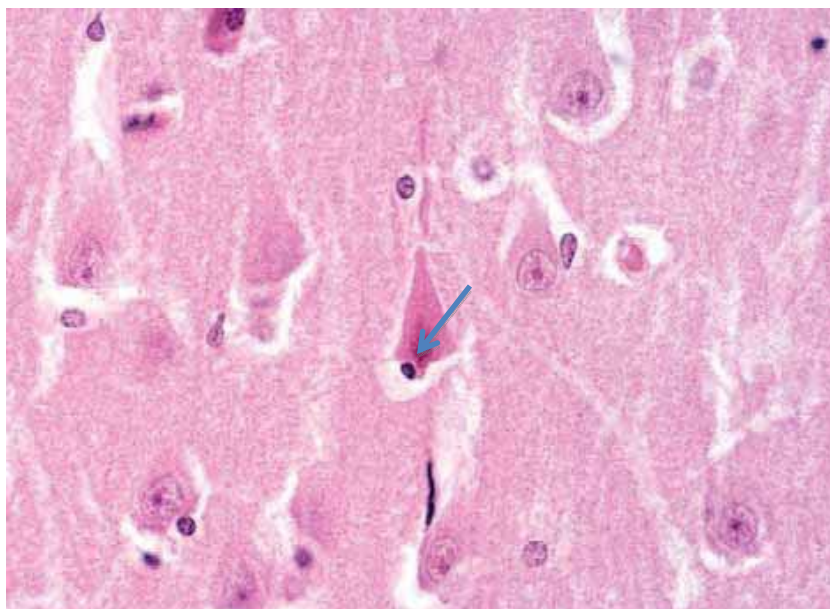
**Tabela 2.** Escore dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos

Grau de lesão	Tipo de lesão	% da lesão
0	Sem lesão	0
1	Leve	< 10% de necrose
2	Moderado	10 a 25%
3	Moderado a grave	25 a 50%
4	Grave	50 a 75%
5	Muito grave	Mais que 75%

Adaptada de Park et al., 2008

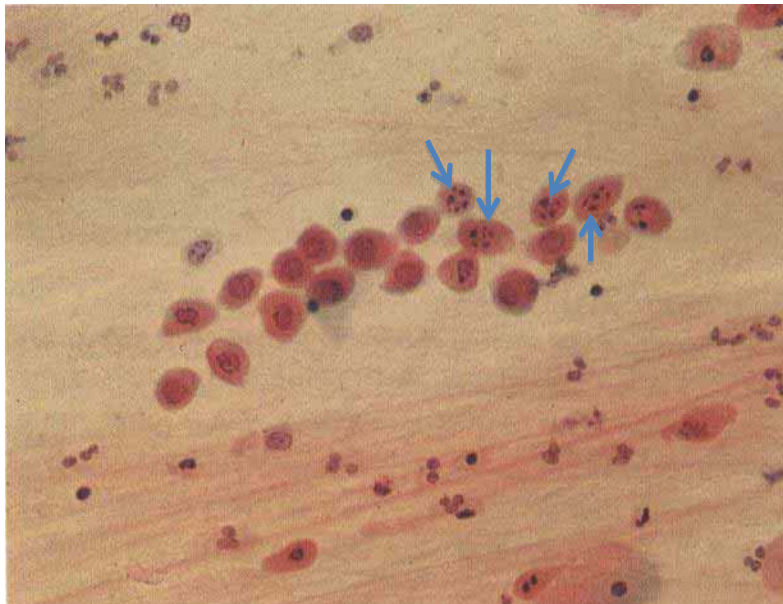
Os critérios microscópicos utilizados para caracterizar a necrose das células tubulares foram os seguintes: picnose nuclear (Figura 1), cariorrexe (Figura 2) e cariólise ou cromatólise (Figura 3). A presença e o percentual de qualquer uma dessas anormalidades histológicas denunciam lesão epitelial renal e sua gravidade.

Picnose nuclear é a alteração degenerativa do núcleo da célula que apresenta um volume reduzido (diminui até menos de 6 micros de diâmetro) e torna-se hiperacorada, tendo sua cromatina condensada. É um processo que indica a necrose do tecido e, eventualmente, pode ocorrer fragmentação do núcleo picnótico.



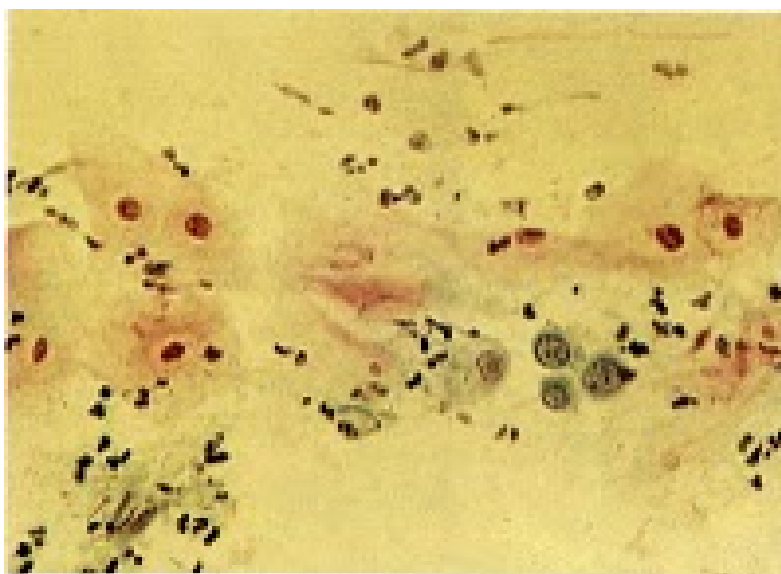
**Figura1.** Corte histológico representativo de picnose nuclear.

Cariorrexe é a fragmentação do núcleo picnótico. A cromatina adquire uma distribuição irregular, podendo se acumular em grânulos na membrana nuclear. Ocorre perda dos limites nucleares.



**Figura 2.** Corte histológico representativo de cariorrexe.

Cariólise ou cromatólise é a destruição, por dissolução, do núcleo da célula. Ocorre a dissolução da cromatina e a perda da coloração do núcleo, o qual desaparece completamente.



**Figura 3.** Corte histológico representativo de cariólise ou cromatólise

O patologista que realizou a avaliação histológica não teve conhecimento a qual grupo pertencia o rim estudado, tão pouco sua lateralidade.

### **3.9 Sequência experimental**

1. Jejum alimentar dos ratos por período de 12 horas.
2. Pesagem dos animais em balança de precisão digital.
3. Indução de anestesia inalatória com isoflurano com concentração alveolar mínima (CAM) de 4% utilizando vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda e fluxo de oxigênio 4 L/min durante 5min em uma campânula apropriada para o modelo experimental.
4. Em superfície inclinada a 40° foi realizada entubação orotraqueal com sonda 2. Transferidos para mesa cirúrgica.
5. Início da ventilação artificial com fração inspirada de oxigênio de 100% e CAM de isoflurano de 1% a 3%. Os animais foram conectados ao ventilador artificial 683 Rodent Ventilator, Harvard Apparatus, Innc (USA), com frequência ventilatória de 60 a 70 incursões por minuto e volume corrente de aproximadamente 10 mL/kg.
6. Inserção de termômetro retal Datex Engestron para monitorar temperatura retal.
7. Aplicação de bolsas térmicas (Bolsa térmica Gel-Body Care Mercury) para manter a temperatura retal em torno de 37°C.
8. Anestesia infiltrativa com bupivacaína a 0,25% 0,3 mL na região cervical bilateral para obtenção de acessos vasculares cervicais.
9. Dissecção e cateterização veia jugular externa direita para infusão de ringer lactato na velocidade de 5 mL/h através de bomba de infusão Anne Abbot (USA) para reposição hídrica. Injeção de solução salina 2 mL/kg com ou sem parecoxibe 20 mg/kg dependendo o grupo.

10. Dissecção e cateterização de artéria carótida esquerda para mensuração da PAM (Datex Engestron, modelo A/3 série 763117 - Finlândia) e para coleta de amostras sanguíneas.
11. Coleta de 1 mL de sangue (M1) após monitorização completa para dosagem de NGAL, com reposição de ringer lactato previamente aquecido 2 ml em *bolus*.
12. Anestesia infiltrativa 0,7 mL de bupivacaína 0,25% da região abdominal previamente a incisão cirúrgica.
13. Realizada a laparotomia mediana e nefrectomia direita.
14. Decorridos 15min da nefrectomia direita início do clampeamento da artéria renal esquerda por período de 30min e, então, desclampeamento da mesma.
15. A segunda coleta (M2) aconteceu 5min do início da isquemia e a terceira coleta (M3) 20min do início da reperfusão. Em ambos os momentos obtidos 1 mL de sangue para dosagem de NGAL e reposição com ringer lactato 2 mL em *bolus* após coleta.
16. Fechamento da parede abdominal com sutura em 2 planos.
17. Analgesia pós-operatória através da infiltração da parede abdominal por bupivacaína 0,25% 0,7 mL.
18. Interrupção da infusão de solução de Ringer lactato.
19. Ligadura da veia jugular externa direita e artéria carótida, ráfia de cervicotomia e analgesia através da infiltração da região cervical com bupivacaína 0,25% 0,3 mL.
20. Recuperação dos animais.
21. Manutenção dos animais em gaiolas *containers* climatizada e alimentação por 24 horas.
22. Após 24 horas, sob anestesia inalatória, reabertura da parede abdominal para nefrectomia esquerda e obtenção da quarta amostra (M4) para dosagem de NGAL por punção intracardíaca.

23. Sacrifício do animal com injeção de sobredose de pentobarbital sódico pela mesma via.
24. As amostras sanguíneas coletadas foram centrifugadas para obtenção de sobrenadante plasmático e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e amostras renais para análise histológica.

### 3.10 Análise estatística

Os dados apresentaram distribuição normal e foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Na comparação entre os grupos, utilizou-se a análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey, se valor de  $p < 0,05$ . Na comparação entre momentos de um mesmo grupo, foi utilizado o teste de Friedman.

A histologia renal foi pontuada e os escores de lesões renais atribuídos aos rins direito e esquerdo foram expressos em mediana (percentis 25-75%) e submetidos à análise de variância de Kruskal Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, se valor de  $p < 0,05$ . O teste de Mann Whitney foi aplicado para comparação intragrupo quanto aos escores da histologia renal. Na análise da comparação entre as frequências de lesão renal histológica entre os grupos Isquemia e Parecoxibe, utilizou-se o Teste Exato de Fisher.

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa de computador *Stata/SE 9.0 for Windows* (Stata Corporation, College Station, Texas, USA). Considerou-se valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.



## 4 RESULTADOS

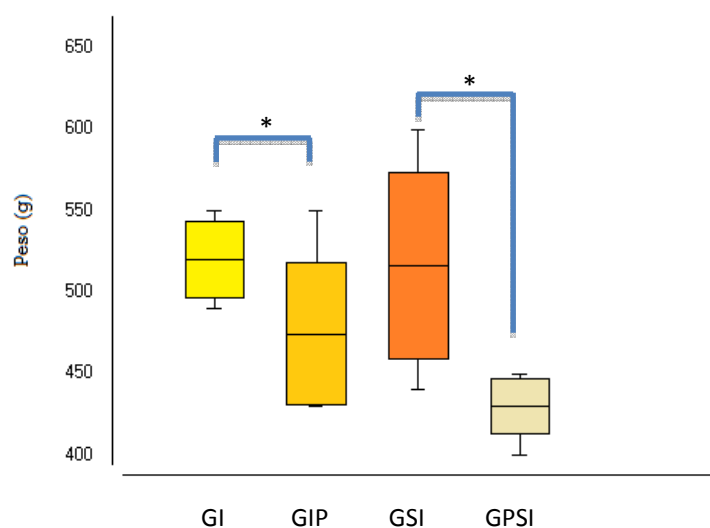
### 4.1 Peso

Os animais pertencentes ao GI e GSI apresentaram média de peso (g) superior à média dos animais do GIP e principalmente dos animais do GPSI ( $p < 0,002$ ) (Tabela 3, Figura 4).

**Tabela 3.** Valores de média e desvio padrão (DP) do peso, segundo os grupos experimentais

Grupos	Peso (g)	
	Média	Desvio padrão
GI	520,00 *	23,09
GIP	474,44	43,62
GSI	516,25 *	58,80
GPSI	430,00	16,58

Comparação do peso entre grupos. \*  $p = 0,002$ : GI>GPSI; GSI>GPSI.



**Figura 4.** Peso por grupos experimentais. As linhas da caixa representam a média (linha central) e o desvio padrão (linha superior e inferior).

## 4.2 Pressão arterial média (PAM)

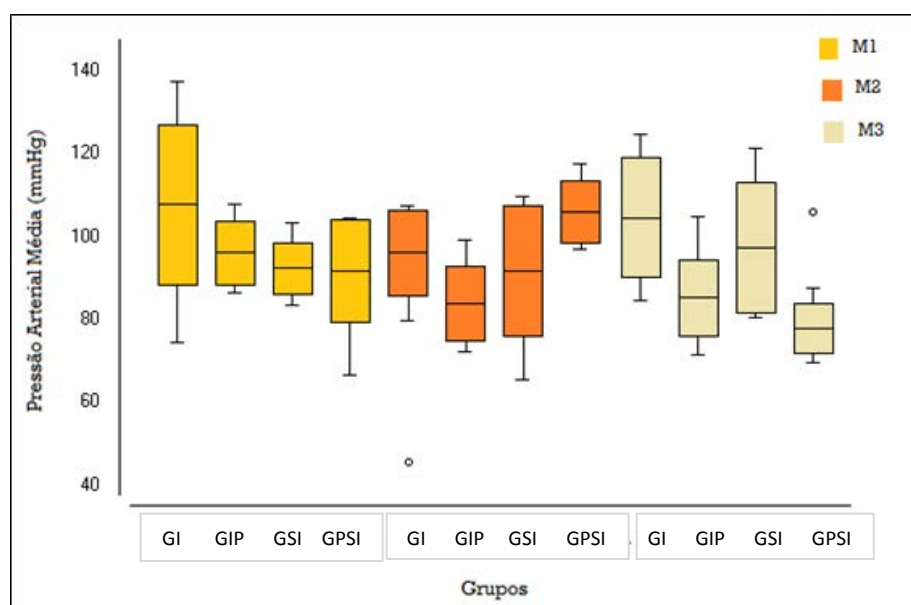
A PAM variou entre os grupos com diferenças estatísticas significativas. Em M1 os valores são maiores no GI em relação ao GPSI ( $p=0,03$ ). Em M2 o GIP apresenta valores menores em relação ao GPSI ( $p=0,01$ ). Em M3 os níveis de PAM maiores estão no GI ( $p=0,001$ ).

Comparando os momentos, não encontramos diferenças estatísticas nos GI e GSI, porém o GIP apresenta valores maiores em M1 que em M2 e M3 ( $p=0,007$ ) e o GPSI tem valores maiores de PAM em M2 ( $p=0,0002$ ) (Tabela 4, Figura 5).

**Tabela 4.** Valores da média e desvio padrão da pressão arterial média (mmHg) segundo grupos e momentos

Grupos	PAM (mmHg)		
	M1	M2	M3
GI	107.71±19,23	90.56±19,39	103.09±14,38
GIP	96.18±7,71	83.95±9,09	83.74±9,30
GSI	92.33±6,03	91.74±15,86	95.87±15,61
GPSI	91.65±12,43	105.95±7,44	79.50±10,86

Comparação entre grupos: M1  $p= 0,03$ : GI>GPSI; M2  $p= 0,01$ : GIP<GPSI; M3  $p=0,001$ : GI>GIP GI> GSI, GSI> GPSI.  
Comparação entre momentos: GI  $p= 0,12$ ; GIP  $p= 0,007$ : M1>M2; M1>M3; GSI  $p=0,78$ ; GPSI  $p=0,0002$ : M1<M2, M2>M3



**Figura 5.** PAM ao longo do experimento segundo grupos e momentos. As linhas da caixa representam a média (linha central) e o desvio padrão (linha superior e inferior).

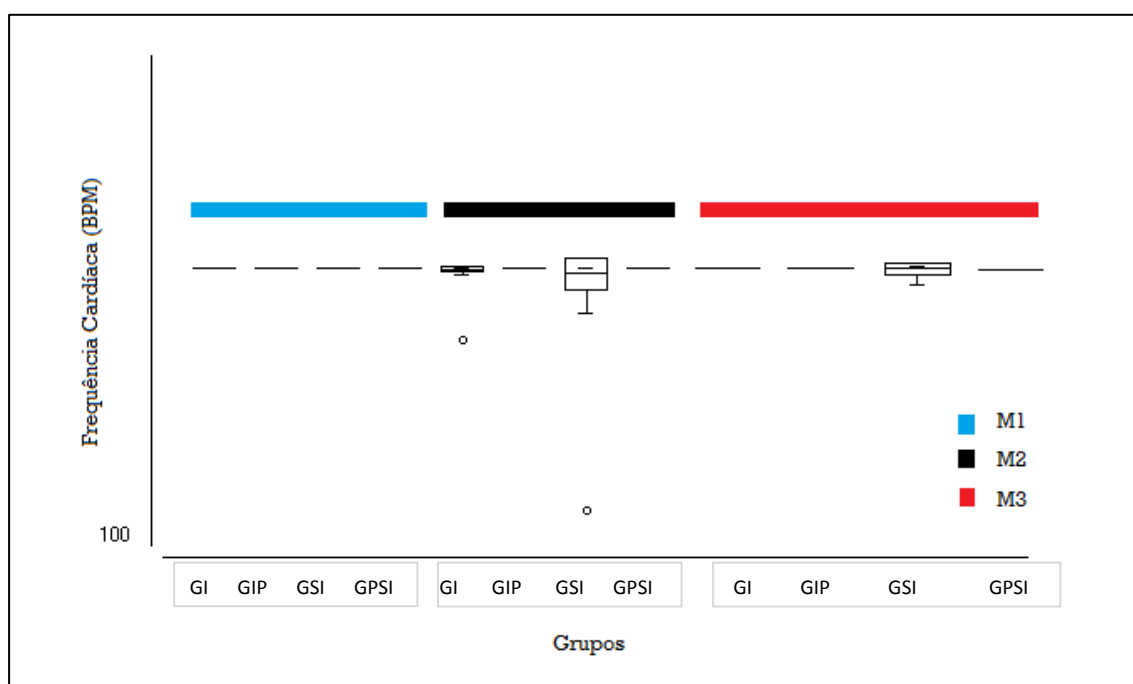
### 4.3 Frequência cardíaca (FC)

Na comparação entre grupos a FC (bpm) (Tabela 5, Figura 6) não mostrou diferença estatística.

**Tabela 5.** Valores referentes frequência cardíaca (bpm) expressos em média e desvio padrão segundo grupos e momentos

Grupos	Frequência cardíaca (bpm)		
	M1	M2	M3
GI	250±0,00	245,11±13,23	250±0,00
GIP	250±0,00	250±0,00	250±0,00
GSI	250±0,00	232,11±45,05	234,88±41,71
GPSI	250±0,00	250±0,00	250±0,00

Comparação entre momentos: GI p=0,31; GIP p=1,00; GSI p=0,53; GPSI p=1,00. Comparação entre grupos: M1 p=1,00; M2 p=0,33; M3 p=0,32



**Figura 6.** Frequência cardíaca por grupos e momentos. As linhas da caixa representam a média (linha central) e o desvio padrão (linha superior e inferior).

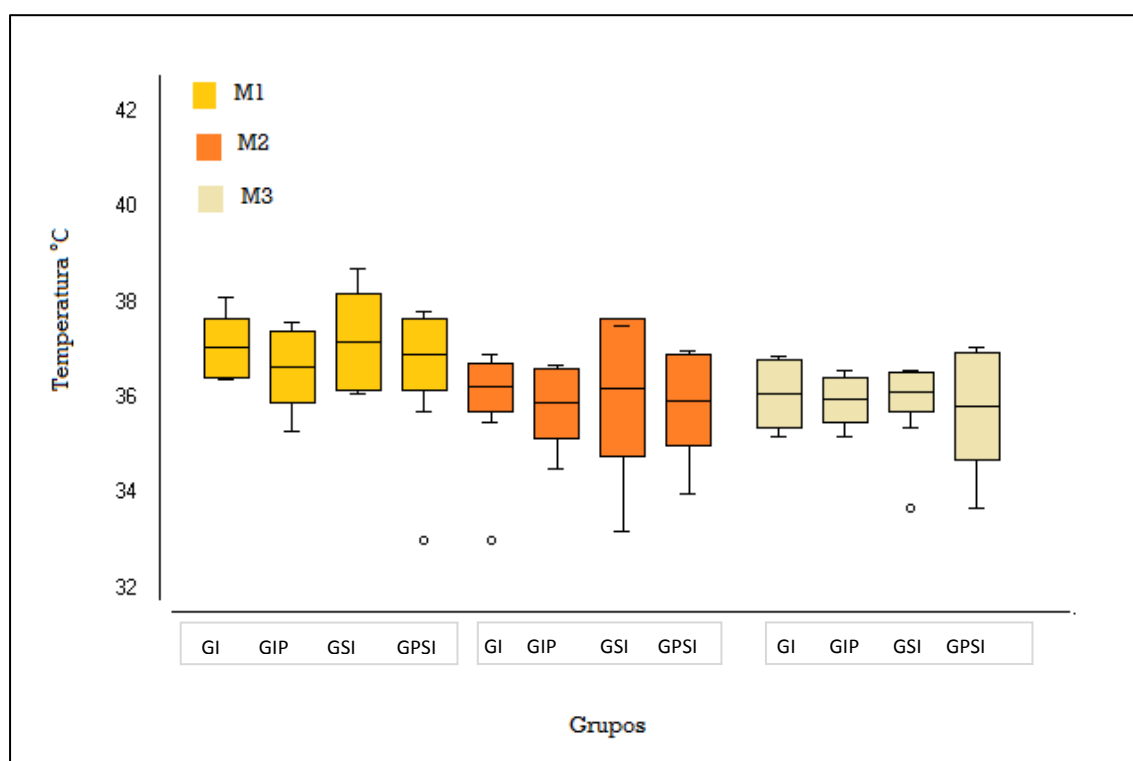
#### 4.4 Temperatura (T)

Na comparação entre grupos a T (°C) (Tabela 6, Figura 7) não mostrou diferença estatística.

**Tabela 6.** Valores da média e desvio padrão da temperatura (°C) segundo grupos e momentos

Grupo	Temperatura (T°C)		
	M1	M2	M3
GI	37,04±0,61	35,86±1,17	36,91±0,71
GIP	36,64±0,75	35,88±0,73	36,79±0,46
GSI	37,17±1,00	36,21±1,44	36,68±0,90
GPSI	36,47±1,48	35,96±0,94	36,65±1,11

Comparação entre momentos: GI p=0,01: M1>M2 M2<M3; GIP p=0,01: M2<M3; GSI p=0,22; GPSI: p=0,54. Comparação entre grupos: M1 p=0,55; M2 p=0,90; M3 p=0,91.



**Figura 7.** Valores da temperatura por grupos e momentos. As linhas da caixa representam a média (linha central) e o desvio padrão (linha superior e inferior).

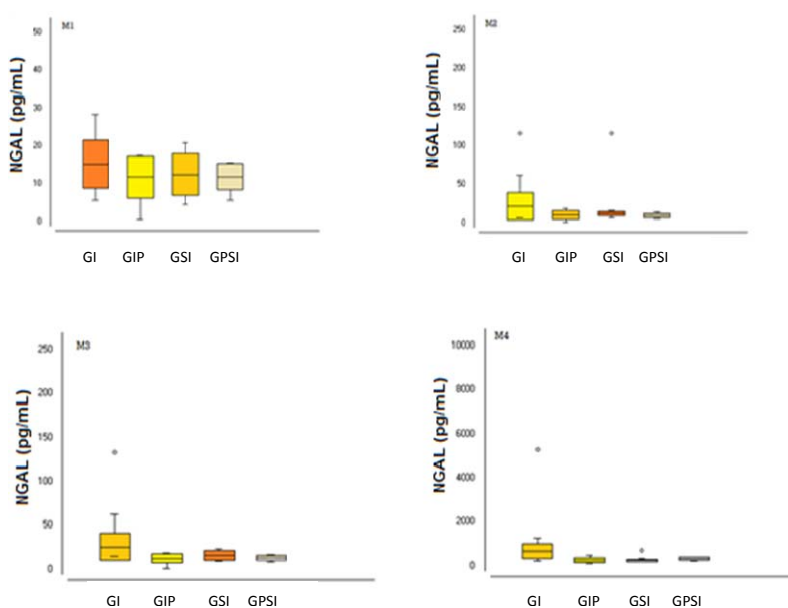
#### 4.5 NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*)

A dosagem sérica do NGAL resultou em variações estatísticas significativas na comparação entre grupos e momentos (Tabela 7, Figura 8). Entre momentos todos os grupos apresentaram os maiores valores de NGAL em M4: GI ( $p=0,006$ ); GIP ( $p<0,001$ ); GSI ( $p<0,001$ ) e GPSI ( $p<0,001$ ) assim como seus menores níveis em M1. Nos M1 e M2 em todos os grupos não se evidenciou diferenças estatísticas. Porém, em M3 e M4 do GI apresentaram valores em elevação progressiva, com diferença significativa dos demais grupos ( $p=0,03$  e  $p=0,002$ ). Portanto, o GI apresentou valores mais elevados desse marcador a partir do M3 e picos no M4.

**Tabela 7.** Dosagem de NGAL, em picogramas por mililitro (pg/ml), relativos à média e desvio padrão segundo momentos e grupos

Grupos	NGAL			
	M1	M2	M3	M4
GI	15,23±6,40	32,43±35,52	37,54±38,64	1186,63±1574,77
GIP	11.72±5,45	10.68±5,70	12.63±5,48	254.56±103.69
GSI	12.44±5,51	23.51±34,86	15.99±5,21	311.05±163,20
GPSI	11.80±3,42	10.02±2,91	12.84±2,55	295.63±78,37

Comparação entre momentos: GI  $p=0,006$ : M1<M4, M2<M4; M3<M4; GIP:  $p<0,001$ : M1<M4; M2<M4; M3<M4; GSI:  $p<0,001$ : M1<M4; M2<M4; M3<M4; GPSI:  $p<0,001$ : M1<M4; M2<M4; M3<M4. Comparação entre grupos: M1  $p=0,56$ ; M2  $p=0,17$ ; M3  $p=0,03$ : GI>GIP, GSI e GPSI; M4  $p=0,002$ : GI>GIP, GSI e GPSI.



**Figura 8.** NGAL por grupos e momentos. As linhas da caixa representam a média (linha central) e o desvio padrão (linha superior e inferior).

## 4.6 Histologia renal

Ao se realizar a análise histológica, os rins direitos de todos os grupos apresentaram escore de valor zero para necrose tubular aguda. Os rins esquerdos dos animais dos grupos GSI e GPSI, não submetidos à isquemia e à reperfusão renal, mas submetidos à injeção sistêmica de anti-inflamatório conforme o grupo, também apresentou escore zero para necrose tubular aguda. Os rins esquerdos dos animais pertencentes ao GI e GIP, submetidos a I/R e, conforme o grupo, à administração do coxibe, apresentaram escores variados de necrose tubular aguda (Tabela 8, Figura 9). As lesões foram mais frequentemente observadas nos ratos do GI, em sete animais havia algum grau de lesão com escores entre um e quatro, o que reflete lesão de leve a grave intensidade (Tabela 2). Menos frequente nos animais do GIP, a lesão renal foi observada em apenas um animal com escore dois, ou seja, lesão de leve gravidade (Anexo 1). Assim a frequência de lesões tubulares é menor no GIP.

Tabela 8. Intensidade de lesão nos rins direito e esquerdo

Grupos	Rim	
	Direito	Esquerdo
GI	0(0,00)	1(0,25-2) [4]
GIP	0(0,00)	0(0,00) [2]
GSI	0(0,00)	0(0,00) [0]
GPSI	0(0,00)	0(0,00) [0]

Valores expressos em mediana (percentis 25-75%) [amplitude total]. Análise de variância de Kruskal Wallis – pós-teste de Dunn: Rim esquerdo -  $p=0,01$ : GI>GIP; GI>GPSI. Rim direito: Grupos iguais. Teste de Mann-Whitney - Comparação intragrupo: GI –  $p=0,004$ ; GIP –  $p=0,70$ ; GSI –  $p=1,00$ ; GPSI –  $p=1,00$ .

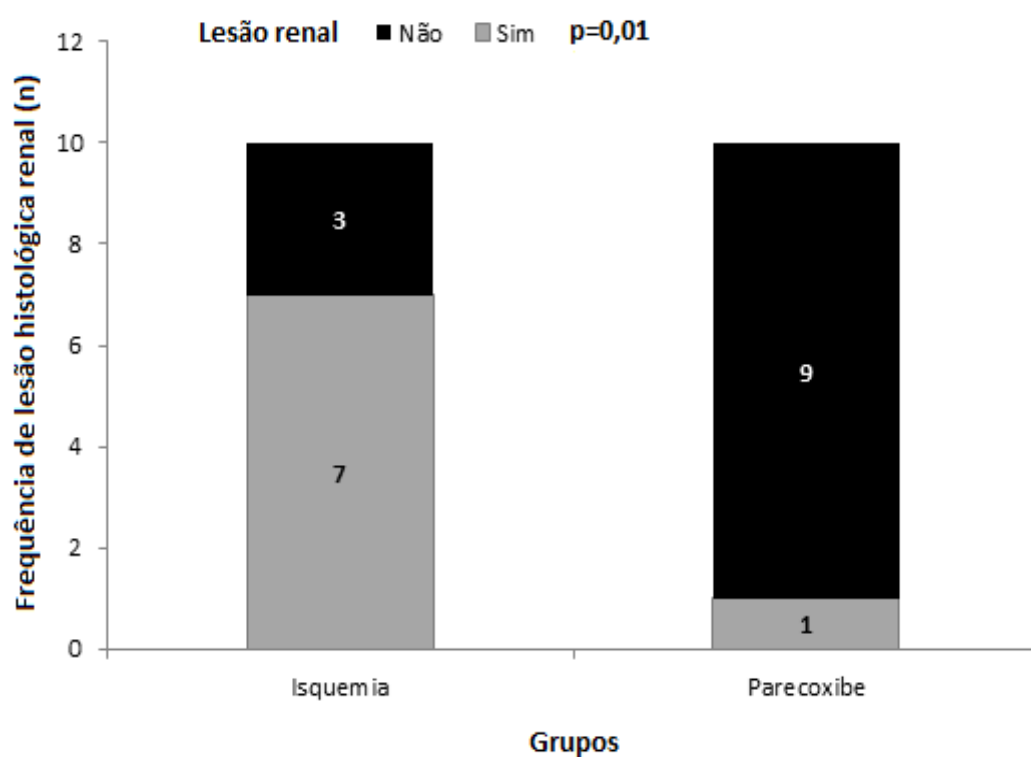


Figura 9. Frequência absoluta quanto à ocorrência de lesão renal histológica esquerda nos Grupos Isquemia e Grupo Isquemia Parecoxibe. Teste exato de Fisher. A frequência de lesão renal histológica foi menor no Grupo Isquemia parecoxibe ( $p=0,01$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Nesse estudo usamos o modelo de isquemia e reperfusão (I/R) utilizado em experimentos para o estudo da função e lesão renais deste Departamento de Anestesiologia. Este modelo consta da realização da nefrectomia direita em todos os animais, randomização dos animais em quatro grupos – I/R em dois grupos (GI e GIP) –, e dois grupos sem as manobras de I/R – (GSI e GPSI).

Desse modo, o parecoxibe foi testado em dois grupos na vigência e na ausência de I/R (GIP e GPSI), sendo que a dosagem de NGAL foi realizada em todos os grupos em quatro diferentes momentos. A monitorização incluiu a PA, FC, T e peso dos animais. No último momento previsto na pesquisa foi realizada a nefrectomia esquerda para análise histológica, coleta sanguínea e sacrifício do animal. Todos os animais foram mantidos sob anestesia inalatória e infiltrativa durante os momentos estudados, receberam reposição volêmica durante o experimento e, ao final, analgesia pós-operatória através da infiltração de anestésico local nas incisões. Nos pós-operatórios os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente climatizado e alimentação e hidratação oral *ad libitum*.

A nefrectomia prévia a I/R pode diminuir a lesão ao rim remanescente e facilitar sua recuperação. Isso ocorre por que após a nefrectomia se desencadeia mecanismo de pré-condicionamento renal com a possibilidade de atenuação das lesões subsequentes a I/R renal em rim remanescente. A atividade da renina plasmática e o conteúdo da renina no rim pós-isquêmico aumentam significativamente em ratos não nefrectomizados. Os fatores responsáveis pela vasoconstrição renal (tromboxano A2, endotelina, etc.) apresentam-se em maior concentração nos ratos não nefrectomizados (Lüscher et al., 1991; Islam et al., 1997).

O efeito do pré-condicionamento renal após nefrectomia já foi estudado, observando a instalação de insuficiência renal aguda oligúrica em ratos submetidos ao modelo de I/R renal sem nefrectomia contralateral prévia. Os animais submetidos a I/R renal nefrectomizados previamente desenvolveram insuficiência renal aguda poliúrica,



forma de insuficiência renal com melhor prognóstico. Também a análise histológica mostrou lesões tubulares de menores proporções e maior depuração de inulina nas provas laboratoriais deste grupo (Fernandez-Repollet et al., 1982).

Estudos realizados com animais em normotermia, hipertermia e hipotermia, todos submetidos à I/R renal, evidenciaram que os animais mantidos em temperatura corpórea entre 37 e 38°C apresentaram lesões que resolveram em períodos compreendidos entre 24 a 48 horas após a ocorrência da isquemia. Os animais mantidos em Temperatura corpórea superior a 38°C apresentaram lesão intensa. Animais mantidos em temperatura corpórea entre 32 e 35°C apresentaram lesão branda e a recuperação foi rápida. A hipotermia, assim, determina efeito protetor renal, diminuição do metabolismo celular renal, manutenção de reserva energética, produção de substâncias protetoras e menor consumo de oxigênio (Delbridge et al. 2007; Zager et al., 1986).

Em nosso estudo a temperatura foi registrada de forma contínua via termômetro retal e, através de dispositivos de aquecimento, foi mantida em valor constante e considerada como normotermia durante todo o experimento.

Os grupos que sofreram I/R apresentaram valores menores de temperatura durante a isquemia e semelhantes aos dos demais grupos durante a reperusão. Porém esses valores não foram inferiores a 35,5°C, assim como as maiores temperaturas registradas não ultrapassaram o valor de 37,5°C, faixa de normotermia.

Pelo exposto pode se afirmar que a nefrectomia direita e a manutenção e registro das temperaturas durante o experimento deixaram os animais em condições de igualdade de condicionamento renal e susceptibilidade à lesão renal e consolidam o modelo escolhido para avaliar a influência do parecoxibe sob a função renal em situações simuladas experimentalmente, porém recorrentes na prática clínica.

Em relação ao peso observamos que os animais do GI e GSI apresentaram medidas na média superior ao dos animais dos GIP e GPSI. Acreditamos que essa diferença não tenha interferido nos resultados uma vez que utilizamos animais da mesma linhagem (Wistar), do mesmo sexo (machos), com maturidade semelhante, fornecidos pelo biotério da instituição e com peso superior a 250 g. Além disso, foi

utilizada fórmula para o cálculo da dose de parecoxibe segundo preconiza a *Food and Drug Administration, 2012* que, aliada à nefrectomia contralateral prévia e aos cuidados com a temperatura e reposição volêmica, minimiza possíveis influências desses fatores nos resultados obtidos.

A FC também se manteve em 250 bpm e, provavelmente pela incapacidade do dispositivo em detectar FC superiores a estes valores, mante-se praticamente constante em todos os animais, em todos os grupos e todos os momentos. Portanto, sem considerações estatísticas significativas.

A influência dos AINEs sobre a pressão arterial (PA) já foi alvo de diversos estudos experimentais e clínicos (Johnson et al., 1997; Wang et al., 1999). Sabe-se que os derivados prostanóides COX-2, como a PGE-2, ao agir sobre túbulos e ductos renais, e a PGI-2, ao agir sob o endotélio de vasos renais, modulam a reabsorção de sódio e água, estimulam a produção e a liberação de renina, vasoconstrição e vasodilatação renal (Brater et al., 2001; Noroian et al., 2002; Harris, 2006). Os produtos COX-1, como o TXA-2, também exercem função vasoconstritora e aumentam a reabsorção do sódio e água.

Por isso, há risco de ocorrência de lesões renais associadas ao uso de AINEs nas condições clínicas de desidratação, durante hemorragias, na insuficiência cardíaca congestiva, na cirrose, durante o uso de diuréticos e na ingestão diminuída de sódio. Nessas situações clínicas os mesmos devem ser evitados. (Harris, 2006).

Em nosso estudo o comportamento da PA foi semelhante entre os grupos que receberam parecoxibe (GIP e GPSI), em que se observou efeito atenuador da PA quando confrontados com os grupos que não receberam esse fármaco (GI e GSI). Animais medicados tiveram os níveis pressóricos menores em M3, independente de terem ou não sido expostos às manobras de I/R.

Essa atenuação pressórica também foi observada em outro estudo sobre a interferência do parecoxibe na função renal. Esse efeito hipotensor nos animais medicados, juntamente com a piora do *clearance* de creatinina e histologia, estiveram associados à pior interferência do parecoxibe na função renal. Essa hipotensão foi atribuída pelos autores a não ativação do sistema renina, angiotensina, aldosterona

secundária à inibição COX-2 do medicamento. Concluem, ainda, que essa enzima é de grande importância para a dinâmica renal, principalmente em situações de risco ou dano renal eminente (Patel et al., 2007).

Em outro estudo avaliando o uso parecoxibe, em administração por injeção intrarrenal em suínos submetidos ao clampeamento supraórtico, observou-se menor comprometimento da função renal medida através depuração de creatinina e melhor equilíbrio do lactato renal. Também não houve influência sobre o sistema cardiocirculatório nos animais medicados, o que levou à conclusão que o medicamento é seguro quando usado em dose única (Hauser et al., 2005).

Apesar das nossas observações de diminuição das medidas da PA nos grupos que receberam o parecoxibe, essas representam níveis pressóricos suficientes para adequadamente manterem os FSR e RFG.

No que diz respeito ao biomarcador precoce de função renal, NGAL, todos os grupos tiveram os menores níveis séricos em M1 e picos no último momento (M4). Os maiores níveis de NGAL, quando comparado entre grupos, ocorreu nos animais do GI, que não foram medicados previamente, especialmente no M4. Em contrapartida o GIP apresentou níveis de NGAL em M4 semelhantes aos dos animais dos GSI e GPSI, animais que não foram expostos às manobras de I/R.

Os níveis de NGAL no GI foram maiores a partir do M3, confirmando a precocidade deste biomarcador em medidas séricas já 50 min depois de instalada a lesão (30 min de isquemia e 20 min de reperfusão renal). O uso de parecoxibe prévio à manobra de I/R no GIP foi o único diferencial para que os níveis de NGAL desse grupo fossem menores. O uso de parecoxibe no GPSI não resultou, por si só, em elevação de NGAL.

Estudo semelhante pesquisando o efeito da indometacina (AINE não seletivo) e rofecoxibe (AINE seletivo) mostrou que ambos os AINEs se associaram à melhor função e histologia renal, com destaque para o rofecoxibe. Parte da lesão renal secundária à isquemia e reperfusão é consequência da resposta inflamatória com participação da COX-2 e de prostaglandinas, além da produção e secreção de quimiocinas, citocinas (IL-1, IL-6, IL-19, TNF- $\alpha$ ), ativação de genes, espécies reativas

de oxigênio e infiltração celular. Com o uso de AINEs parte dessa resposta é inibida, resultando em proteção renal (Feitoza et al., 2005).

Os rins direitos de todos os animais, assim como os rins esquerdos não submetidos à isquemia (GSI e GPSI), não apresentaram evidências histológicas de lesão renal. As lesões histológicas aconteceram apenas nos grupos que sofreram manobras de I/R (GI e GIP) e elas foram mais frequentemente observadas nos animais do GI. Nesse grupo, observou-se que sete animais possuíam algum grau de lesão com *escores* entre um e quatro (25% a 75%), o que reflete lesão de leve a grave intensidade (Tabela 2).

Menos frequentes no GIP, a lesão renal foi observada em apenas um animal com escore dois, ou seja, lesão de leve gravidade (10% a 25%). Esse animal também apresentou o maior nível sérico de NGAL do grupo no último momento, mesmo assim esses níveis foram inferiores aos observados nos animais do GI, no mesmo momento.

Em relação à intensidade de lesão por meio da mediana dos escores de lesão renal, isquemia e parecoxibe não são diferentes ambos apresentam maiores medianas dos escores de lesão que os GSI e GPSI. Assim, não se pode afirmar que o parecoxibe determinou maior ou menor intensidade de lesão.

Portanto o modelo de I/R utilizado foi capaz de determinar lesão renal constatada através da análise histológica em ambos os grupos que foram expostos à manobra de I/R (GI e GIP). O uso de parecoxibe prévio a essa manobra foi o único fator determinante para que a frequência de lesão fosse menor no GIP quando comparada ao GI.

## 6 CONCLUSÃO

Concluimos que, nesse modelo experimental, tal como evidenciado em outros estudos, o parecoxibe determinou proteção frente à isquemia renal e não determinaram, por si só, lesões renais.

## 7 REFERÊNCIAS

- Bagshaw SM, George C, Bellomo R. ANZICS Database Management Committee. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(5):1569-74.
- Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, et al. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(6):1834-9.
- Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004;66(2):480-5.
- Brater DC, Harris C, Redfern JS, Gertz BJ. Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol*. 2001;21:1-15
- Brater DC. Renal effects of cyclooxygenase-2-selective inhibitors. *J Pain Symptom Manage*. 2002;23(4 Suppl): S15-20; discussion S21-3.
- Breyer MD, Hao C, Qi Z. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and the kidney. *Curr Opin Crit Care*. 2001;7(6):393-400.
- Brunner HI, Mueller M, Rutherford C, Passo MH, Witte D, Grom A, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2577-84.
- Cheer SM, Goa KL. Parecoxib (parecoxib sodium). *Drugs*. 2001;61(8):1133-41. discussion 1142-3.
- 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.
- Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int*. 2008;73:1008-16
- Cohen RH, Perl ER. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. *J Neurophysiol*. 1990;64:457-64.
- Cugini D, Azzollini N, Gagliardini E, Cassis P, Bertini R, Colotta F, et al. Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int*. 2005;67:1753-61.
- Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2007;39(10):2983-5.
- Desjardins PJ, Grossman EH, Kuss ME, Talwalker S, Dhadda S, Baum D, et al. The injectable cyclooxygenase-2-specific inhibitor parecoxib sodium has analgesic efficacy when administered preoperatively. *Anesth Analg*. 2001;93(3):721-7.

- Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2008;241:89-94.
- Devarajan P. Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology.* 2010;15(4):419-28.
- Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake. *Cell.* 2005;123(7):1293-305.
- Di Grande A, Giuffrida C, Carpinteri G, Narbone G, Pirrone G, Di Mauro A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury in the emergency department. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2009;13(3):197-200.
- Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:1031-8.
- Feitoza CQ**, Câmara NO, Pinheiro HS, Gonçalves GM, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, et al. Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(1):79-84.
- Fernandez-Repollet E, Finn WF. Effect of contralateral nephrectomy on the initial phase postischemic acute renal failure in the rat. In: Eliahou HE, editor. *Acute renal failure.* London: J. Libbey; 1982. p. 262-82.
- Finn WF. The clinical and renal consequences of contrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(6):i2-10.
- Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* 1996;318(1):1-14.
- Flower DR, North ACT, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482(1-2):9-24.
- Food and Drug Administration. *Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trial for therapeutics in adult health volunteers.* Silver Spring: FDA; 2005.
- Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular Cell.* 2002;10(5):1033-43.
- Gwira JA, Wei F, Ishibe S, Ueland JM, Barasch J, Cantley LG. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7875-82.
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002; 62:237-44.
- Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;54(6):1012-24.

- Haase M, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Mertens PR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol*. 2010;18(1):11-8.
- Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG, Wang Z, Doshi M, Devarajan P, et al. IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(1):189-97.
- Harris Jr RC. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol*. 2002. 89(6A):10D-17D.
- Harris RC. COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 Suppl 1:S37-42.
- Hauser B, Froba G, Bracht H, Strater J, Chkhouta AB, Vassilev D, et al. Effects of intrarenal administration of the cox-2 inhibitor parecoxib during porcine suprarenal aortic cross-clamping. *Shock*. 2005;24(5):476-81.
- Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M, Passo MH, Olson J, Singer NG, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2772-81.
- Hocheil 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.
- Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol*. 1997 Jun;79(6):842-7.
- Jayaraman A, Roberts KA, Yoon J, Yarmush DM, Duan X, Lee K, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a discriminatory marker of the hepatocyte-secreted protein response to IL-1 $\beta$ : a proteomic analysis. *Biotechnol Bioengineering*. 2005;91(4):502-15.
- Johnson AG. NSAIDs and increased blood pressure. What is the clinical significance? *Drug Saf*. 1997;17(5):277-89.
- 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.
- Ling W, Zhaohui N, Ben H, Leyi G, Jianping L, Huili D, et al. Urinary IL-18 and NGAL as early predictive biomarkers in contrast-induced nephropathy after coronary angiography. *Nephron Clin Pract*. 2008;108(3):c176-81.
- Lüscher TF, Bock HA, Yang ZH, Diederich D. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: perspectives in nephrology. *Kidney Int*. 1991;39(4):575-90.
- Malan TP Jr, Marsh G, Hakki SI, Grossman E, Traylor L, Hubbard RC. Parecoxib sodium, a parenteral cyclooxygenase 2 selective inhibitor, improves morphine analgesia and is opioid-sparing following total hip arthroplasty. *Anesthesiology*. 2003;98(4):950-6.
- Mårtensson J, Bell M, Oldner A, Xu S, Venge P, Martling CR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in adult septic patients with and without acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1333-40.



- Mishra J, Qing MA, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534-43.
- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365:1231-38.
- Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2001;159:2137-45.
- Moore E, Bellomo R, Nichol A. Biomarkers of acute kidney injury in anesthesia, intensive care and major surgery: from the bench to clinical research to clinical practice. *Minerva Anesthesiol*. 2010;76(6):425-40.
- Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005;115(3):610-21.
- Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2008;23:2152-7.
- Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Internal Med*. 2008;148(11):810-9.
- Niruthisard S, Werawataganon T, Bunburaphong P, Ussawanophakiat M, Wongsakornchaikul C, Toleb K. Improving the analgesic efficacy of intrathecal morphine with parecoxib after total abdominal hysterectomy. *Anesth Analg*. 2007;105(3):822-4.
- Noroian G, Clive D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors and the kidney: a case for caution. *Drug Saf*. 2002;25(3):165-72.
- Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoeft A, Parlow JL, et al. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1081-91.
- Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Joshi GP, Langford RM, Singla NK, Boye ME, Verburg KM, et al. Safety and efficacy of the cyclooxygenase-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after noncardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006;104(3):518-26.
- Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*. 2004;43:405-14.
- Park Y, Hirose R, Dang K, Xu F, Behrends M, Tan V, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery*. 2008;143(2):243-51.
- Patel NS, Cuzzocrea S, Collino M, Chatterjee PK, Mazzon E, Britti D, et al. The role of cyclooxygenase-2 in the rodent kidney following ischaemia/reperfusion injury in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2007;562(1-2):148-54.

- Riest G, Peters J, Weiss M, Dreyer S, Klassen PD, Stegen B, et al. Preventive effects of perioperative parecoxib on post-discectomy pain. *Br J Anaesth*. 2008;100(2):256-62.
- Schug SA, Joshi GP, Camu F, Pan S, Cheung R. Cardiovascular safety of the cyclooxygenase-2 selective inhibitors parecoxib and valdecoxib in the postoperative setting: an analysis of integrated data. *Anesth Analg*. 2009;108(1):299-307.
- Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, Birkhahn R, Otero R, Osborn TM, et al. The diagnostic accuracy of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the prediction of acute kidney injury in emergency department patients with suspected sepsis. *Ann Emerg Med*. 2010;56(1):52-9.
- Singh G, Triadafilopoulos G. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *J Rheumatol*. 1999;26 Suppl 56:18-24.
- Smith WL, Bell TG. Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol*. 1978;235:F451-7.
- Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001;107(1):7-11.
- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:463-93.
- Xu SY, Pauksen K, Venge P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest*. 1995;55(2):125-31.
- Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol*. 1986;251(1 Pt 2):F87-93.
- Zhang J, Ding EL, Song Y. Adverse effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on renal and arrhythmia events: meta-analysis of randomized trials. *JAMA*. 2006;296(13):1619-32.
- Kjeldsen L, Johnsen A, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993;268(14):10425-32.
- Kömhoff M<sup>1</sup>, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol*. 1997;272:F460-F468.
- Kummer CL, Coelho TCRB. Anti-inflamatórios não esteroidais inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. *Rev Bras Anestesiologia*. 2002;52(4):498-512.
- Koppert W, Frötsch K, Huzurudin N, Böswald W, Griessinger N, Weisbach V, et al. The effects of paracetamol and parecoxib on kidney function in elderly patients undergoing orthopedic surgery. *Anesth Analg*. 2006;103(5):1170-6.
- Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006;105(3):485-91.

Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1999;34(1):96-101.

Westhuyzen J. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:543-51.

Whelton A. Renal and related cardiovascular effects of conventional and COX-2-specific NSAIDs and non-NSAID analgesics. *Am J Ther*. 2000;7:63-74.

Yang J, Mori K, Li JY, Barasch J. Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol*. 2003;285(1):F9-18.

## Apêndice

Tabela 9. Escore de lesão renal em rins direito e esquerdo além de níveis de NGAL, em M4

Grupos	Animal	Escore rim direito	Escore rim esquerdo	NGAL em M4 (pg.ml <sup>-1</sup> )
GI	1	0	0	977,59
	2	0	0	638,96
	3	0	2	1277,91
	4	0	0	705,67
	5	0	3	400,00
	6	0	1	209,32
	7	0	2	559,53
	8	0	1	578,76
	9	0	4	5305
	10	0	1	426,94
GSI	11	0	0	242,92
	12	0	0	225,65
	13	0	0	310,21
	14	0	0	207,77
	15	0	0	516,98
	16	0	0	202,45
	17	0	0	334,26
	18	0	0	725,11
	19	0	0	229,74
	20	0	0	321,33
GIP	21	0	0	255,61
	22	0	0	303,56
	23	0	0	294,63
	24	0	0	64,34
	25	0	0	268,45
	26	0	0	213,65
	27	0	2	475,99
	28	0	0	185,89
	29	0	0	107,21
	30	0	0	186,06
GPSI	31	0	0	306,86
	32	0	0	220,58
	33	0	0	429,28
	34	0	0	422,89
	35	0	0	262,31
	36	0	0	275,36
	37	0	0	376,39
	38	0	0	425,19
	39	0	0	352,59
	40	0	0	70,32