

Paulo Sérgio Santana dos Santos

***NGAL como marcador precoce de lesão renal
em ratos submetidos à isquemia renal sob
anestesia venosa total***

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

Prof^a Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo
Orientadora

Botucatu – SP
2011

De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar.
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Anna e meu filho Felipe, pelo carinho,
companheirismo, tolerância e, sobretudo pelo amor.*

*À minha família, pilares da minha sustentação, pelo apoio e
confiança.*

À minha querida avó Joana, jamais te esquecerei.

À ORIENTADORA

*À Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo,
minha orientadora.*

*Agradeço pelos ensinamentos, pela maneira harmoniosa
com que conduziu toda a elaboração do nosso trabalho na
busca infindável da perfeição. E, mais importante...
... à boa e preciosa amizade constituída.*

AGRADECIMENTOS

*À FAPESP,
pelo apoio na forma de Auxílio à Pesquisa, Processo 2010/08900-2*

*Aos Professores do Departamento de Anestesiologia
da Faculdade de Medicina de Botucatu,
pelo acolhimento e pelos conhecimentos transmitidos
na Pós-graduação.*

*À professora Maria Aparecida Domingues,
pela colaboração na avaliação histológica.*

*À professora Lídia Raquel de Carvalho,
pela análise estatística.*

*À colega Vera Lúcia Fernandes Azevedo,
pela obstinação, esforço e dedicação na realização do nosso trabalho.*

*Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia,
Sonia, Neli, Marcelo e André,
pela presença constante em todos os momentos que se fizeram necessários.*

*À Sra. Joana Jacirene Costa Teixeira,
pela diagramação.*

*Aos Srs. Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, pela grande
contribuição na parte experimental.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação simplificada da relação dos biomarcadores de lesão com estágios de dano renal e celular.....	19
Figura 2	Imagem ilustrativa do clampeamento temporário da artéria renal esquerda resultando em isquemia renal.....	34
Figura 3	Valores da PAM segundo momentos e grupos.....	41
Figura 4	Valores da NGAL plasmática segundo momentos e grupos.....	43
Figura 5	Escore de lesão dos rins esquerdos em cada grupo.....	45
Figura 6	Corte histológico com tecido renal normal.....	46
Figura 7	Corte histológico com tipo de lesão moderada.....	46
Figura 8	Corte histológico com tipo de lesão moderada a grave.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Potenciais uso da NGAL como biomarcador.....	21
Tabela 2	Resumo dos grupos quanto a anestesia utilizada, reposição volêmica, nefrectomia, isquemia da artéria renal esquerda e número de animais por grupo.....	31
Tabela 3	Resumo dos atributos e momentos estudados.....	32
Tabela 4	Escore dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos.....	37
Tabela 5	Valores da média e desvio-padrão referentes ao peso e grupos.....	39
Tabela 6	Valores da média e desvio-padrão referentes à temperatura segundo momentos e grupos.....	40
Tabela 7	Valores da média e desvio-padrão referentes à PAM (mmHg) segundo momentos e grupos.....	41
Tabela 8	Medianas, 1º e 3º quartis, referentes a NGAL segundo momento e grupo.....	43
Tabela 9	Medianas, 1º e 3º quartis, referentes aos escores da intensidade da lesão segundo os grupos e rins direito e esquerdo.....	45
Tabela 10	Variáveis antropométricas peso (g), pressão arterial sistólica (PAS) (mm Hg), pressão arterial diastólica (PAD)(mmHg), pressão arterial média (PAM)(mmHg), temperatura (T) (°C), pressão expirada de CO ₂ (ETCO ₂) do Grupo 1 (G1).....	72
Tabela 11	Variáveis antropométricas(peso (g), pressão arterial sistólica(PAS)(mm Hg), pressão arterial diastólica(PAD)(mm Hg), pressão arterial média(PAM)(mm Hg), temperatura(T)(°C), pressão expirada de CO ₂ (ETCO ₂) do Grupo 2 (HES).....	73
Tabela 12	Variáveis antropométricas, peso (g), pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg), pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg), pressão arterial média (PAM) (mmHg), temperatura (T) (°C), pressão expirada de CO ₂ (ETCO ₂) Grupo 3	74
Tabela 13	Dosagem plasmática da lipocaina associada à gelatinase (NGAL) (ng.mL ⁻¹) do grupo 1 (G1).....	75
Tabela 14	Dosagem plasmática da lipocaina associada à gelatinase (NGAL) (ng.mL ⁻¹) do grupo 2 (G2).....	76

Tabela 15	Dosagem plasmática da lipocaina associada à gelatinase (NGAL) (ng.mL ⁻¹) do grupo 3 (Controle).....	77
Tabela 16	Histologia renal dos ratos do grupo 1 (G1).....	78
Tabela 17	Histologia renal dos ratos do grupo 2 (HES).....	79
Tabela 18	Histologia renal dos ratos do grupo 3 (Controle).....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LRA	lesão renal aguda
TSR	terapia de substituição renal
DRET	doença renal em estágio terminal
RIFLE	risco, lesão, falência, perda, estágio final
I/R	isquemia e reperfusão
DMOS	disfunção múltipla de órgãos e sistemas
NGAL	lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos
IL-18	interleucina 18
KIM-1	molécula de dano renal-1
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidase
α -GST	α -glutathione-S-transferases
CYS-C	cistatina C
β_2 M	β_2 -microglobulin
α_1 M	α_1 -microglobulin
CYR-61	proteína rica em cisteína
OPN	osteopontin
FABP	ácido graxo ligado à proteína
RBP	proteína ligada a retinol
KDa	quilodalton
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ANCA+	anticorpo anticitoplasma de neutrófilo positivo
LES	lúpus eritematoso sistêmico
PRIS	síndrome relacionada a infusão de propofol
HES	hidroxietilamido
RL	Ringer lactato
NF-kB	fator nuclear kappa B
uNGAL	lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos urinária

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 - INTRODUÇÃO E LITERATURA, 15

- 1.1 LESÃO RENAL AGUDA, 16
- 1.2 ISQUEMIA E REPERFUSÃO, 17
- 1.3 BIOMARCADORES DA LESÃO RENAL, 18
- 1.4 NGAL, 20
- 1.5 ANESTESIA, 24
- 1.6 REPOSIÇÃO VOLÊMICA, 25

2 - OBJETIVO, 27

3 - MATERIAL E MÉTODO, 29

- 3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS, 30
- 3.2 MOMENTOS ESTUDADOS, 31
- 3.3 ATRIBUTOS ESTUDADOS, 32
- 3.4 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL, 32
- 3.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, 36
- 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, 37

4 - RESULTADOS, 38

- 4.1 PESO DOS ANIMAIS, 39
- 4.2 TEMPERATURA, 40
- 4.3 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, 41
- 4.4 NGAL, 42
- 4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, 44

5 – DISCUSSÃO, 48

6 – CONCLUSÃO, 58

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 60

APÊNDICE, 70

Santos PSS. NGAL como marcador precoce de lesão renal em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia venosa total. Botucatu, 2011. 81p. Tese (Doutorado em Anestesiologia). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

RESUMO

Justificativa e Objetivo - A lesão renal aguda pode ter seu curso minimizado quando reconhecida e tratada adequadamente. NGAL surge como um novo biomarcador precoce desta lesão e poderá ser um marcador semelhante à troponina para o infarto agudo do miocárdio. O objetivo deste estudo foi quantificar a NGAL plasmática em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia venosa total (AVT) com reposição volêmica com cristalóide (RL) ou colóide (HES) e correlacionar com alterações histológicas renais. **Método** - Trinta ratos, *Wistar* machos, foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: G1 (AVT + RL + isquemia artéria renal esquerda), G2 (AVT + HES + isquemia artéria renal esquerda) e G3 (AVT + RL). A anestesia foi mantida com propofol na dose de $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e remifentanil na dose de 0,05 a $0,1 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Os valores plasmáticos da NGAL foram determinados a partir de coleta sanguínea estabelecidas em quatro momentos: M1, após a monitorização do animal; M2, após 30 minutos de isquemia; M3, após 30 minutos de reperfusão e M4, 12 horas após o início do experimento. Os atributos estudados foram pressão arterial média (PAM), temperatura retal (T), dosagem plasmática de NGAL e avaliação histológica. Todos os animais foram submetidos à laparotomia mediana para nefrectomia à direita e ao final do experimento procedeu-se nefrectomia à esquerda. A avaliação histológica foi realizada por meio de escala para avaliação de necrose tubular nos rins retirados dos grupos de estudo. As variáveis PAM, T, NGAL e escore de lesão histológica após análise, foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. **Resultados** - Os valores da NGAL plasmática nos grupo G1 e G2 foram elevados alcançando 400 ng.mL^{-1} especificamente no M4, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparado com G3; quando se comparou os diversos momentos dentro de um mesmo grupo a diferença foi estatisticamente significativa apenas no M4 em relação aos

outros momentos. Quanto aos escores de lesão histológicas houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2 em relação a G3. Quando se comparou rim direito e esquerdo em cada grupo, houve diferença estatisticamente significativa nos grupos G1 e G2. **Conclusão** - Neste estudo a NGAL encontrou-se expressivamente aumentada 12 horas após, em todos os animais submetidos à isquemia renal sob AVT, independente do tipo da reposição volêmica. As alterações histológicas mais evidentes foram observadas nos grupos G1 (RL) e G2 (HES) correlacionando-se com os valores de NGAL plasmática.

Palavras-chave: NGAL, Isquemia renal, Biomarcadores, Hidroxietilamido, Anestesia venosa total, Rato

Santos PSS. NGAL as an early marker of renal injury in rats submitted to renal ischemia under total venous anesthesia. Botucatu, 2011. 81p. Thesis (PhD in Anesthesiology). Botucatu Medical School. UNESP - Univ Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Background and Objective - The course of acute renal injury can be minimized when it is adequately recognized and treated. NGAL arises as a new early biomarker for such injury, and it may be used similarly to troponin, which is a marker for acute myocardial infarction. This study aimed at quantifying plasma NGAL in rats submitted to renal ischemia under total venous anesthesia (TVA) with crystalloid (RL) or colloid (HES) volemic replacement and at correlating it with renal histological alterations. **Method** - Thirty male Wistar rats were randomly distributed into three groups: G1 (TVA + RL + left renal arterial ischemia), G2 (TVA + HES + left renal arterial ischemia) and G3 (TVA + RL). Anesthesia was maintained with propofol at a dose of $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ and remifentanil at a dose of $0.05 \text{ to } 0.1 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. NGAL plasma levels were determined from blood collections established at four moments: M1, after animal monitorization; M2, after 30 minutes of ischemia; M3, after 30 minutes of reperfusion and M4, twelve hours after commencement of the experiment. The studied attributes were mean arterial pressure (MAP), rectal temperature (T), plasma NGAL dosing and histological evaluation. All the animals were submitted to median laparotomy for right nephrectomy and, at the end of the experiment, left nephrectomy was performed. Histological evaluation was performed by means of a scale for assessment of tubular necrosis in the kidneys removed from the study groups. Variables MAP, T, NGAL and histological lesion scores were considered to be statistically significant when $p < 0.05$. **Results** - Plasma NGAL values in Groups G1 and G2 were high and reached 400 ng.mL^{-1} specifically at M4. Such difference was statistically significant when comparing with G3. When the various moments were compared within the same group, the difference was statistically significant only at M4 in relation to the other moments. As regards histological lesion scores, there was statistically significant difference only

between Groups G1 and G2 in relation to G3. When comparing the right and left kidneys in each group, statistically significant difference was found in Groups G1 and G2. **Conclusion** - In this study, NGAL was found to have expressively increased after 12 hours in all animals submitted to renal ischemia under TVA, regardless of volemic replacement type. The most evident histological alterations were observed in Groups G1 (RL) and G2 (HES), and they correlated with plasma NGAL values.

Key words: NGAL, Rena ischemia, Biomarkers, Hydroxyethylamide, Total venous anesthesia, Rat.

1 INTRODUÇÃO E LITERATURA

1.1 LESÃO RENAL AGUDA

A lesão renal aguda (LRA) caracterizada como redução abrupta da função renal tem incidência bastante variável, dependendo dos critérios utilizados para sua definição¹. Apesar dos avanços terapêuticos sua ocorrência está associada a altos índices de morbidade e mortalidade¹. É relativamente comum entre pacientes internados, sobretudo em doentes críticos admitidos nas unidades de terapia intensiva, que têm como principais causas a sepse, cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea e exposição a contrastes. A incidência global estimada em pacientes hospitalizados é de 1% a 25%, enquanto que, nas unidades de cuidados intensivos, situa-se em torno de 30-70%^{2,3,4,5} sendo que, destes, aproximadamente 5% necessitam de terapia de substituição renal (TSR)⁶. Associa-se a períodos de internação prolongados e, não raro, evolui para doença renal em estágio terminal (DRET). Aumenta de maneira importante o risco de morte nestes doentes de 50% a 60% para os que necessitam de TSR^{6,7}. A LRA subtrai fração considerável dos recursos destinados à saúde.

Estudos que classificam a lesão renal aguda (LRA) baseado no critério RIFLE correlacionam a progressiva e significativa elevação da mortalidade da LRA ao grau de comprometimento da função renal dentro dessa classificação⁸. O critério RIFLE foi estabelecido em um consenso de 2004⁹⁻¹⁰, o qual definiu a LRA baseado na creatinina plasmática e ou débito urinário⁹⁻¹⁰. O propósito desse consenso foi padronizar os parâmetros dos estudos, além de estratificar a insuficiência renal, permitindo assim a identificação dos graus variáveis do comprometimento renal.

Esse consenso classificou a LRA em três categorias de gravidade (risco, lesão e falência) e em duas categorias clínicas (perda renal e estágio final da doença renal), e o acrônimo RIFLE passou a identificar essa classificação, da seguinte forma:

- Risco: aumento de 1,5 vezes da creatinina sérica em relação à creatinina basal e/ou débito urinário de $0,5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ por 6 horas.
- Lesão: aumento de 2 vezes da creatinina sérica em relação à creatinina basal e ou débito urinário de $0,5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ por 12 horas.

- Falência: aumento de 3 vezes da creatinina sérica em relação a creatinina basal e ou débito urinário de $0,3 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ por 24 horas (oligúria) ou por 12 horas (anúria) ou valores de creatinina acima de $4,0 \text{ mg.dL}^{-1}$.
- Perda renal: falência renal aguda persistente por mais de 4 semanas.
- Estágio final da doença renal: falência renal por mais de 3 meses.

1.2 ISQUEMIA E REPERFUSÃO (I/R)

A isquemia é a ausência ou diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido e contribui para várias condições fisiopatológicas, tais como infarto do miocárdio, insuficiência vascular periférica, acidente vascular cerebral e choque hipovolêmico. A restauração do fluxo sanguíneo para o órgão isquêmico (reperfusão), embora seja necessária para evitar a lesão celular irreversível, ocasiona maiores lesões celulares do que as causadas pela própria isquemia. Este dano celular, após a reperfusão de um tecido previamente isquêmico, é denominado lesão de reperfusão. A lesão de isquemia e reperfusão (I/R) causa resposta inflamatória local e sistêmica, podendo resultar em disfunção múltipla de órgãos e sistemas (DMOS) e morte do paciente¹¹. Transplantes renais estão, inevitavelmente, associados a um período de isquemia, que começa na captação do órgão do doador e se estende até a sua reperfusão no receptor. A reintrodução do fluxo sanguíneo ao rim isquêmico, embora necessária para resgatar o órgão da necrose e da perda permanente da função, pode causar lesão celular e lesão renal¹².

Vários mecanismos contribuem para a LRA após um insulto tóxico ou isquêmico: alterações da perfusão renal, resultando em perda da autorregulação e aumento da vasoconstrição renal, com perda do citoesqueleto e da polaridade celular com disfunção e morte celular por apoptose e necrose; descamação de células viáveis e mortas contribuindo para a obstrução intratubular renal; alterações metabólicas resultando em anormalidades no balanço tubuloglomerular e produção de mediadores resultando em inflamação e edema vascular¹³.

O rim, de forma eficiente, pode restaurar células perdidas após um insulto isquêmico ou tóxico a partir de células sobreviventes o que pode resultar na integridade

funcional do nefron. Estudos sugerem que há uma relação muito delicada e dinâmica entre o reparo tecidual e progressão ou regressão da lesão renal. Um retardo ou inibição da reparação tecidual pode levar a progressão para doença renal crônica, enquanto que, a reparação tecidual precoce pode deter a progressão da lesão evoluindo para a recuperação renal¹³.

1.3 BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL

Estudos experimentais em animais têm elucidado a patogênese da LRA, mas, essas descobertas não são traduzidas em aplicabilidade clínica devido principalmente à ausência de um marcador precoce de lesão renal. O marcador mais utilizado para avaliação da função renal é a dosagem de creatinina plasmática, porém, esta sofre interferência de vários fatores como idade, sexo, massa muscular, metabolismo muscular e grau de hidratação. Além disso, seu valor pode não sofrer qualquer alteração até que ocorra perda maior do que 50% da função renal^{1,10} e também em condições de baixa filtração glomerular a quantidade de creatinina produzida pela secreção tubular pode superestimar a função renal confirmando que a creatinina não é o marcador ideal. Tem, da mesma forma, demonstrado que a LRA pode ser prevenida ou tratada desde que, precocemente, medidas protetoras sejam tomadas antes mesmo que ocorra elevação da creatinina sérica.

Vários marcadores, dentre eles a NGAL (lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos), IL-18 (interleucina 18), KIM-1 (molécula de lesão renal-1), NAG (N-acetil- β -D-glucosaminidase), α -GST (α -glutathione-S-transferases), CYS-C (cistatina C), β_2 M (β_2 -microglobulina), α_1 M (α_1 -microglobulina), CYR-61 (proteína rica em cisteína) OPN (osteopontina), FABP (ácido graxo ligado à proteína), RBP (proteína ligada ao retinol), têm-se mostrado promissores para detectar precocemente a LRA. Em coortes específicas, isolados ou, mais provavelmente, compondo um painel, estes marcadores contribuem para a detecção precoce da LRA, orientando a conduta de forma rápida e eficaz^{14,15,16,17,18,19,20,21}.

Tradicionalmente, a creatinina e o nitrogênio urêico são insensíveis, não específicos e não diferenciam adequadamente entre os diferentes estágios da LRA¹³ (Figura 1).

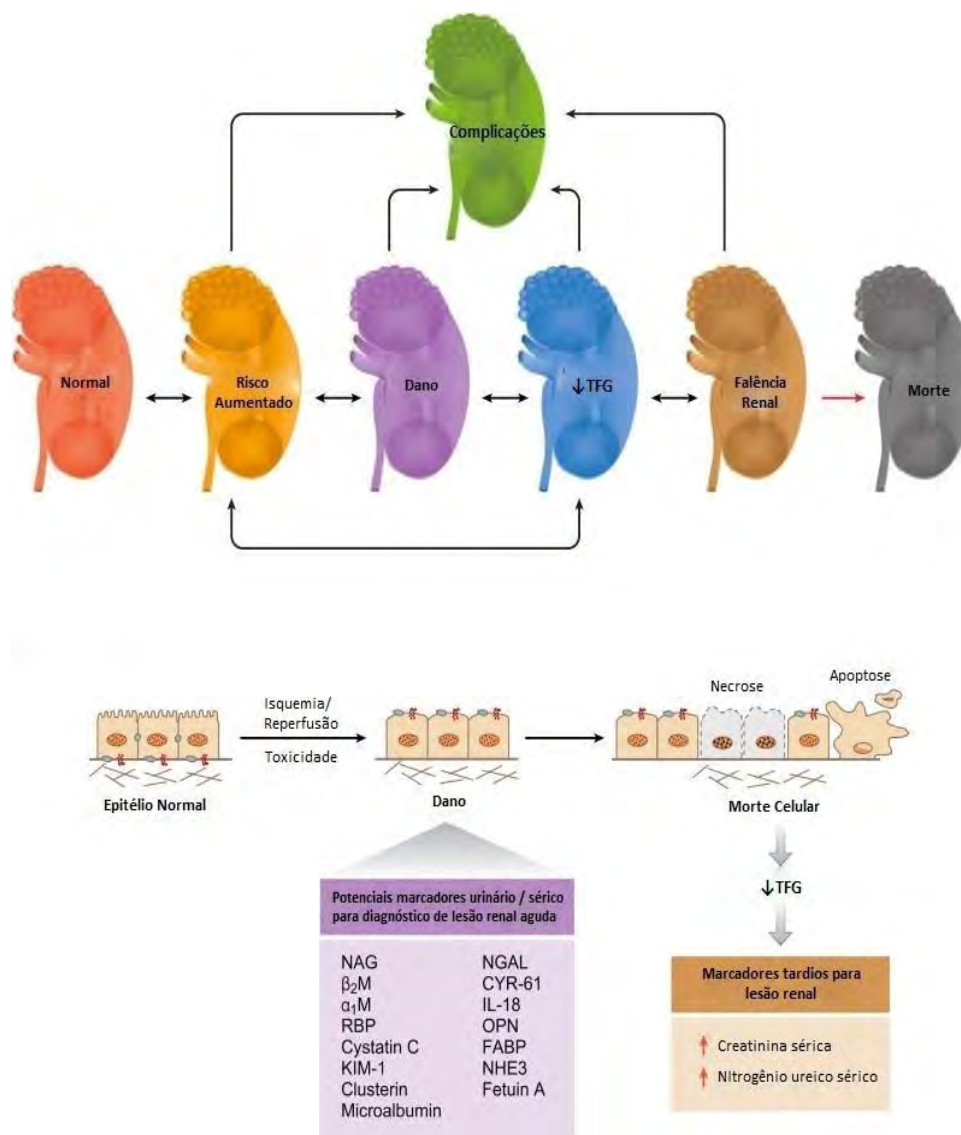


Figura 1 - Representação simplificada da relação dos biomarcadores de lesão com estágios de dano renal e celular (*Adaptado de Biomarkers of Acute Kidney Injury Annu. Rev Pharmacol Toxicol, 2008*).

1.4 NGAL (LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DOS NEUTRÓFILOS)

A NGAL é uma pequena proteína de 25 kDa pertencente à superfamília das lipocalinas. Sua expressão gênica inicia-se após evento lesivo, aparecendo em precursores granulocíticos e tecidos epiteliais ativados da traquéia, pulmões, estômago, cólon e, principalmente, dos rins. Passa livremente pela membrana glomerular sendo parcialmente reabsorvida por endocitose no túbulo proximal. Exerce importante papel bioquímico em diversas funções. Possui capacidade de ligação a moléculas hidrofóbicas ou lipofílicas, participando do movimento transmembrana de algumas delas através da ligação a receptores específicos de membrana. Transporta ácidos graxos, ácido araquidônico, prostaglandinas, esteróides e ferro. Participa também da homeostase celular e da resposta imune inata. Estudos mostram que a administração de NGAL em ratos com lesão renal inicial protege o rim, preserva a integridade tubular e minimiza a azotemia^{14,19}.

Em condições de lesão epitelial ocorre uma elevação de seus valores no plasma em torno de dez vezes e de cem vezes na urina¹, correlacionado com valores elevados de creatinina^{1,22}. Recentemente, em estudos animais foi identificado a NGAL como um dos mais precoces e sensíveis marcadores renais após isquemia ou lesão nefrotóxica, sendo facilmente identificada no sangue e na urina. Estas descobertas têm sido extrapoladas para estudos na espécie humana para avaliar a NGAL como o novo biomarcador da LRA. 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^{23,24,25}.

Sabendo-se que creatinina sérica é um marcador tardio da LRA, a NGAL surgirá como um marcador precoce de LRA semelhante à troponina para o miocárdio²⁶.

Recentes evidências também sugerem ser a NGAL um biomarcador em uma variedade de condições renais e não renais²⁶ (Tabela 1).

Tabela 1 - Potenciais empregos da NGAL como biomarcador

1. Biomarcador para detecção precoce da LRA
A: Momento conhecido da lesão renal
a. Após cirurgia cardíaca
b. Após procedimentos com contrastes
B: Momento desconhecido da lesão renal
a. Pacientes críticos
b. Politraumatismo
2. Preditor de desfecho de LRA
3. Como marcador de atividade e gravidade de doença
a. Nefrite lúpica pediátrica
b. Nefropatia por IgA
c. Glomerulonefrite idiopática
4. Como marcador de progressão de volume cístico na doença renal policística autossômica dominante
5. Biomarcador para
a. Detecção e resposta terapêutica de tumor cerebral
b. Doença inflamatória intestinal
c. Tumor de mama

Int. Urol. Nephrol. 2010

Vários métodos de mensuração da NGAL têm sido relatados em publicações. Em estudos iniciais²⁷, a técnica de *Western blot* foi utilizada para estimativa de NGAL urinária e plasmática e, subsequentemente, tem-se utilizado o método ELISA baseado em anticorpo monoclonal. Alguns estudos têm apresentado valores de 150 ng.mL⁻¹ para NGAL plasmática com sensibilidade de 84% e especificidade de 94%. A NGAL urinária com ponto de corte de 100 g.L⁻¹, tem sensibilidade de 82% e 90%^{28,29,30}.

Em revisão sistemática envolvendo 31 estudos que avaliaram a acurácia e confiabilidade dos biomarcadores urinários e séricos para detectar LRA estabelecida, LRA precoce e estratificar os riscos dos pacientes com LRA concluiu-se que em 25 estudos a cistatina C sérica, a interleucina 18 (IL-18) e a molécula de lesão renal-1 (KIM-1) foram os melhores marcadores para o diagnóstico diferencial da lesão renal estabelecida. A cistatina C sérica, NGAL e IL-18, glutathione-S-transferase- π e γ -glutathione-S-transferase foram os melhores no diagnóstico precoce de lesão renal

aguda. N-acetyl- β -D-glucosaminidase urinária, KIM-1 e IL-18 foram melhores em prever o risco de mortalidade após a lesão renal aguda³¹.

A dosagem da NGAL imediatamente à admissão em UTI após cirurgia cardíaca mostrou sua capacidade de identificar e estratificar pacientes com LRA, independentemente do perfil de risco perioperatório e do procedimento executado. Em estudo em que 71 crianças foram submetidas à correção de cardiopatia congênita, a NGAL mostrou um alto valor preditivo para LRA, tanto em dosagem urinária quanto plasmática. Nesse mesmo estudo, o diagnóstico clínico, baseado no marcador funcional creatinina ocorreu após 24-48 horas, tardiamente¹⁴. Em adultos, os dados foram menos animadores, mas não isentos de valor. Possíveis razões para essa discrepância entre as populações infantil e adulta podem ser a influência de comorbidades em adultos, as limitações típicas da creatinina ou do débito urinário, utilizados como método de auxílio diagnóstico. Além disso, coletas da NGAL realizadas em momentos diferentes entre os estudos podem ter contribuído para as divergências. Ainda assim, o incremento sérico da NGAL foi proporcional ao grau de gravidade e duração da LRA, sendo considerado o mais forte fator independente de risco para desenvolvimento de LRA na UTI^{32, 33,34}.

A sepse contribui de maneira importante para o desenvolvimento de LRA em mais de 50% dos pacientes gravemente hospitalizados. A utilização de um marcador precoce de lesão aguda propiciaria uma tomada de decisão tão logo quanto fosse estabelecido o risco. Diferentemente da cirurgia cardíaca, em que se conhece o momento da lesão, na sepse/choque séptico, este tempo é, via de regra, desconhecido dificultando a detecção precoce e a abordagem ideal. Em recente estudo envolvendo pacientes adultos sépticos e não sépticos as dosagens de NGAL urinária e plasmática mostraram associação significativa com piora da LRA e início da TSR³⁵. A NGAL plasmática mostrou discreta relação com a progressão da LRA e início da TSR. Embora a NGAL urinária tenha mostrado relação frágil com esses resultados, os picos urinários mostraram-se melhores como preditores de progressão da LRA em pacientes não sépticos. De maneira geral, a NGAL permitiu diagnóstico de LRA 48 horas antes dos métodos convencionais padronizados em consensos RIFLE¹⁸.

Em 661 pacientes com suspeita de sepse em sala de urgência, NGAL foi um bom marcador preditivo para diagnóstico e prognóstico de LRA. Concentrações

plasmáticas $> 150 \text{ ng.mL}^{-1}$ mostraram 96% de sensibilidade e 51% de especificidade para detecção de LRA dentro de 72 horas de acompanhamento³⁶. 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 contexto³⁷.

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^{38,39}. 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 a contraste. No mesmo estudo, NGAL mostrou excelente valor preditivo para LRA (80%) e para início da TSR (78%). O ponto de corte da NGAL variou conforme a etiologia da insuficiência renal, mas de maneira geral ficou acima de 150 ng.mL^{-1} ⁴⁰.

De maneira semelhante, valores aumentados de NGAL urinário foram observados em período de três horas após a administração de cisplatina, antecedendo sua elevação plasmática. Em estudo em que 12 pacientes em uso de cisplatina para tratamento de câncer foram avaliados, NGAL urinária elevada precedeu LRA. Neste estudo concluiu-se que um aumento precoce na excreção urinária de NGAL pode ajudar na identificação de pacientes com risco de desenvolvimento de LRA induzida pela cisplatina⁴¹.

Ding et al.⁴² testaram o marcador em pacientes portadores de nefrite túbulo-intersticial por IgA, em fase de moderada atividade da doença, observando dosagens elevadas de NGAL na urina. Constataram ainda que o marcador foi um forte preditor independente de LRA.

Em estudo envolvendo pacientes com vasculites e anticorpo anticitoplasma de neutrófilo positivo (ANCA+), onde o acometimento renal frequentemente evolui para DRET, observou-se valores mais elevados de NGAL plasmático em pacientes com doença em atividade do que quando em períodos de remissão. Tal achado pode ser utilizado para prever recidivas da doença^{43,44}.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) afeta os rins de crianças de forma mais rápida e frequente do que os 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^{45,46}.

A síndrome hemolítico-urêmica associada à diarreia é importante causa de lesão renal em crianças saudáveis, principalmente quando causada por toxinas relacionadas a *E. coli*, a maioria dos pacientes necessita de TSR temporária. Em tais pacientes, ocorre lesão do epitélio tubular, como evidenciado pelos altos valores de NGAL urinário encontrados⁴⁷.

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 urinária 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^{48,49}.

1.5 ANESTESIA

A escolha de técnicas anestésicas com fármacos que propiciem melhor proteção contra os efeitos da isquemia e da reperfusão, tem sido objeto de estudo há varias décadas⁵⁰.

O remifentanil é um opioide de ação ultracurta que age como agonista de receptor mu sendo 250 vezes mais potente que a morfina, caracterizado por rápido início e término de ação. É metabolizado por esterases plasmáticas não específicas em remifentanil ácido com pequena atividade farmacológica, que é eliminado pelos rins⁵¹.

O isoflurano é um anestésico volátil de rápido inicio de ação e despertar e fácil titulação. Assim como os demais anestésicos voláteis são primariamente eliminados

pelos pulmões e com pouco acúmulo em pacientes com disfunção renal e hepática, com tempo de emergência curto e previsível⁵¹.

O propofol é um agente anestésico geral intravenoso que tem sido utilizado amplamente como sedativo e hipnótico, em baixas doses tem propriedades amnésicas similar aos benzodiazepínicos. O seu rápido início de ação fornece uma opção para utilização em pacientes nos quais se deseje um rápido despertar. O propofol é hidrofóbico e, portanto, formulado em emulsão lipídica e fornece 1,1 kcal/mL de gordura e deve ser considerado como uma fonte calórica. As propriedades lipofílicas do propofol lhe permitem atravessar a barreira sangue-cérebro rapidamente. O metabolismo do propofol ocorre no fígado por conjugação em metabólitos inativos que são eliminados pelos rins. Aparentemente não parece que alterações hepáticas e renais interfiram com a sua depuração, embora, seja mais lento do que na população em geral. A hipotensão atribuída a vasodilatação sistêmica é um efeito adverso bem conhecido do propofol, principalmente em pacientes hipovolêmicos. Síndrome PRIS (Síndrome Relacionada à Infusão de Propofol) tem sido relatada com doses altas do mesmo, resultando em acidose metabólica, bradiarritmia, insuficiência miocárdica, infarto do miocárdio, lesão renal aguda, rabdomiólise e parada cardíaca. Estudos adicionais são necessários para identificar a incidência de PRIS e o seu mecanismo exato⁵².

1.6 REPOSIÇÃO VOLÊMICA

A utilização de cristalóide ou colóide na reposição da perda volêmica aguda é motivo de discussão e ambos apresentam vantagens e desvantagens.

A solução de Ringer lactato tem sido estudada para determinar seu papel na disfunção imune induzida pela hemorragia, na inflamação e na lesão endotelial. Apesar dos efeitos deletérios imputados ao Ringer lactato, ainda é a solução mais utilizada para reposição volêmica⁵³.

O hidroxietilamido (HES) é produzido da hidrólise parcial da amilopectina do milho, tem baixo *clearance* renal, lenta metabolização e ação prolongada. Apesar das controvérsias sobre o uso do HES, o mesmo tem se mostrado seguro em diversos estudos em comparação aos cristalóides na preservação do fluxo renal efetivo⁵⁴.

Aproximadamente 1/3 a 2/3 do HES é excretado na urina nas primeiras 24 horas após a infusão, o restante pode se acumular em vários tecidos, inclusive o rim^{55,56,57,58}. Estudo histopatológico em cachorros demonstrou depósito de HES em espaço intravascular e intersticial, células de parênquimas hepáticos, células tubulares proximais renais, fagócitos em fígado, baço, linfonodos e outros órgãos⁵⁵.

Efeitos adversos do HES foram observados com o emprego por período prolongado e em altas doses. HES é o colóide artificial mais utilizado em diversas condições clínicas por sua efetividade como expansor plasmático de longa duração, suas propriedades anticoagulantes, apesar de impróprias em determinadas cirurgias, pode ser útil em outras onde há risco de trombose⁵⁹. A maioria dos estudos que sinalizam os efeitos deletérios do HES refere-se aos de alto peso molecular, provavelmente devido à maior exposição dos tecidos a esta molécula⁶⁰. Para minimizar os riscos renais com o uso desse colóide, recomenda-se a não utilização dos mesmos em pacientes com disfunção renal pré-existente e em infusões prolongadas assim como em períodos perioperatórios e em unidades de terapia intensiva^{61,62,63,64,65}.

2 OBJETIVO

Quantificar a dosagem plasmática da NGAL em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia venosa total com reposição volêmica com cristalóide (RL) ou colóide (HES) e correlacioná-las com as alterações histológicas renais.

3 MATERIAL E MÉTODO

Após a aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram incluídos no estudo 30 ratos Wistar, machos, com peso maior que 350 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu, UNESP.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram inicialmente anestesiados por via inalatória com isoflurano em concentração inspirada de 4% e fluxo de oxigênio de 3 a 4 litros por minuto durante 5 minutos e incluídos aleatoriamente em três grupos de estudo conforme descrição abaixo e resumido na tabela 1.

Grupo 1: Anestesia venosa total + Ringer lactato (RL) + isquemia renal

Grupo 2: Anestesia venosa total + Hidroxietilamido (HES) + isquemia renal

Grupo 3: Anestesia venosa total + Ringer lactato (RL)

Grupo 1 (G1) - Manutenção com propofol $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão (ANNE®- Abbott laboratories, EUA) e remifentanil $0,05$ a $0,1 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ diluído em solução de Ringer lactato na concentração final de $1 \text{ }\mu\text{g.mL}$ em bomba de infusão. Hidratação com solução de Ringer lactato $5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Após cada coleta de amostra sanguínea de $1,5 \text{ mL}$ foi realizada reposição com Ringer lactato com 3 mL em *bolus* seriado de $0,5 \text{ mL}$.

Grupo 2 (G2) - Manutenção com propofol $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão e remifentanil $0,05$ a $0,1 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Hidratação com solução de hidroxietilamido (HES) (Voluven® 6%) $2 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Após cada coleta de amostra de $1,5 \text{ mL}$ foi realizada reposição com hidroxietilamido com $1,5 \text{ mL}$ em *bolus* seriado de $0,5 \text{ mL}$.

Grupo 3 (G3) (Controle). Manutenção com propofol $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão e remifentanil $0,05$ a $0,1 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ diluído em solução de Ringer lactato na concentração final de $1 \text{ }\mu\text{g.mL}$ em bomba de infusão. Hidratação com solução de Ringer lactato $5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Após cada coleta de amostra sanguínea de

1,5 mL foi realizada reposição com Ringer lactato com 3 mL em *bolus* seriado de 0,5 mL.

Em todos os grupos foram realizados laparotomia mediana e nefrectomia à direita. Nos animais dos grupos G1 e G2 realizou-se clampeamento da artéria renal esquerda por um período correspondente a 30 minutos. Decorrido este tempo, procedeu-se o desclampeamento da artéria e aguardou-se 30 minutos de reperfusão renal para coleta sanguínea. Os animais do grupo G3 foram utilizados como controle, não sendo submetidos à isquemia da artéria renal esquerda.

Tabela 2 - Resumo dos grupos quanto a anestesia utilizada, reposição volêmica, nefrectomia, isquemia da artéria renal esquerda e número de animais por grupo

Grupo	Propofol / Remifentanil	RL	HES	Nefrectomia direita	Clampeamento renal esquerda	n
G1	+	+	-	+	+	10
G2	+	-	+	+	+	10
G3	+	+	-	+	-	10

(+ indica presença, - indica ausência, HES-hidroxietilamido, RL- Ringer com lactato)

3.2 MOMENTOS ESTUDADOS

Momento 0 (M0) - Monitorização do animal

Momento 1 (M1) - Após a cateterização arterial e venosa

Momento 2 (M2) - Após 30 minutos de clampeamento artéria renal

Momento 3 (M3) - Após 30 minutos de desclampeamento da artéria renal

Momento 4 (M4) - Final do experimento

A monitoração da pressão arterial média, da capnometria e da temperatura retal permitiu o controle da anestesia e a manutenção do equilíbrio dos animais. Essas monitorizações foram contínuas, porém, registradas para a análise estatística apenas nos momentos M0, M1, M2 e M3.

A dosagem de NGAL plasmática foi obtida por meio das coletas sanguíneas nos seguintes momentos: momento um (M1), após estabilização do animal; momento dois (M2) após 30 minutos de clampeamento da artéria renal esquerda; momento três (M3) após 30 minutos de desclampeamento e reperusão renal e momento quatro (M4) imediatamente antes do sacrifício do animal.

3.3 ATRIBUTOS ESTUDADOS

Os atributos estudados em todos os grupos de animais do experimento foram:

- Pressão Arterial Média (PAM)
- Temperatura retal (T)
- Dosagem plasmática de NGAL
- Avaliação histológica renal

Tabela 3 - Resumo dos atributos e momentos estudados

Momentos	PAM, T	NGAL	Histologia renal
M0(início do experimento)	X		
M1(estabilização)	X	X	
M2(isquemia)	X	X	
M3(reperusão)	X	X	
M4(final do experimento)		X	X

X (atributo aferido no determinado momento)

3.4 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

1. Jejum alimentar dos ratos por um período de 12 horas.
2. Pesagem dos animais.
3. Indução inalatória com isoflurano a 4% em vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda® e fluxo de oxigênio de 3 a 4 litros por minuto durante 5 minutos em uma campânula apropriada para o modelo experimental e transferência do animal

após narcose para uma superfície inclinada em 40 graus para realização da intubação traqueal.

4. Intubação traqueal com sonda nº 2 e transferência do animal para mesa operatória.
5. Ventilação artificial com fração inspirada de oxigênio de 1,0 e concentração 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⁻¹ até o início da anestesia venosa total.
6. Colocação de termômetro retal.
7. Os animais foram mantidos sobre e cobertos com bolsas térmicas (Bolsa Térmica Gel - Body Care- Mercur[®]) com o objetivo de manutenção da temperatura retal em aproximadamente 37°C.
8. Realizada infiltração das incisões cirúrgicas (laparotomia e região cervical) com bupivacaína a 0,125% na dose de 2mg.kg⁻¹.
9. Dissecção e cateterismo da veia jugular externa direita para infusão de soluções de hidratação e fármacos venosos, remifentanil e propofol, em bomba de infusão (ANNE[®] - Abbott laboratories, EUA).
10. Dissecção e cateterismo da artéria carótida esquerda para monitorização da pressão arterial invasiva e coleta de amostras sanguíneas.
11. Monitorização da pressão arterial média (direta), gás carbônico no final da expiração, temperatura retal e concentração de isoflurano expirada, por sensores conectados ao monitor Datex-Ohmeda modelo AS3 (Engston-Finlândia).
12. Interrupção do anestésico inalatório e iniciada infusão de remifentanil e propofol nas doses preconizadas.
13. Período de estabilização do animal com anotação em protocolo individualizado dos dados de monitorização, correspondendo ao momento zero (M0) do experimento.
14. Dados de monitorização coletados: pressão arterial sistólica, diastólica e média, temperatura retal e capnometria.

15. Primeira coleta sanguínea - momento um (M1) correspondente a coleta de 1,5 mL de sangue da carótida esquerda seguida de reposição com:

Grupo 1 (G 1): Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL;

Grupo 2 (G2): HES no volume de 1,5 mL em *bolus* de 0,5 mL;

Grupo 3 (G3): Ringer lactato no volume de 3mL em *bolus* de 0,5 mL.
16. Laparotomia mediana e nefrectomia à direita seguido por coleta deste rim para posterior estudo histopatológico.
17. Clampeamento da artéria renal esquerda e fechamento da incisão cirúrgica.

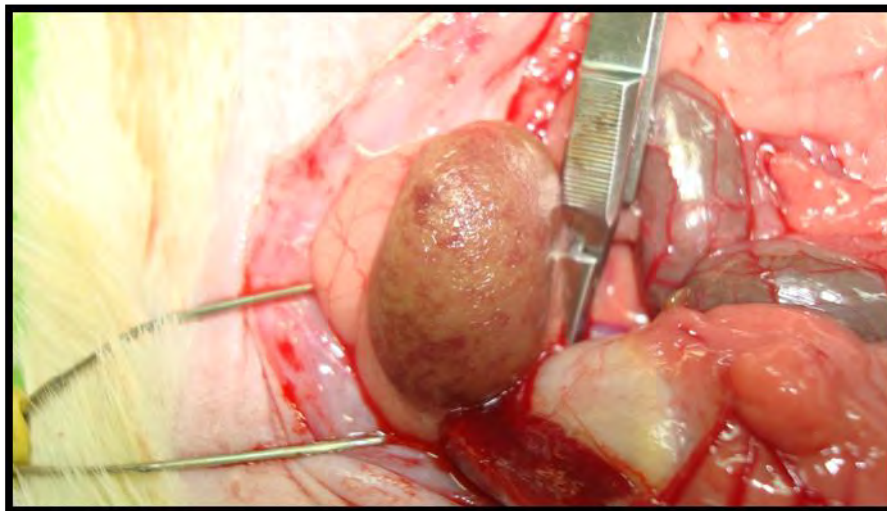


Figura 2 - Imagem ilustrativa do clampeamento temporário da artéria renal esquerda resultando em isquemia renal, observa-se alteração na coloração de cor do referido rim.

18. Após 30 minutos de clampeamento da artéria renal esquerda procedeu-se a reabertura da parede abdominal do animal com segunda coleta sanguínea, momento dois (M2) correspondente a coleta de 1,5 mL de sangue da carótida esquerda seguida de reposição com:

Grupo 1 (G1): Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL;

Grupo 2 (G2): HES no volume de 1,5 mL em *bolus* de 0,5 mL;

Grupo 3 (G3): Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL.

19. Desclampeamento da artéria renal esquerda para reperfusão do órgão.
20. Fechamento da parede abdominal com sutura contínua.
21. Após 30 minutos de desclampeamento, realizada a terceira coleta sangüínea, momento três (M3) correspondente a coleta de 1,5 mL de sangue da carótida esquerda seguida de reposição com:

Grupo 1 (G1): Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL;

Grupo 2 (G2): HES no volume de 1,5 mL em bolus de 0,5 mL;

Grupo 3 (G3): Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5mL.
22. Fechamento da incisão cervical em um único plano seguido de remoção dos cateteres em veia jugular direita e artéria carótida esquerda.
23. Aguardou-se a recuperação do animal até o mesmo reassumir a respiração espontânea quando se realizou a extubação orotraqueal.
24. Retorno do animal para a gaiola e liberação de alimentação.
25. Após 12 horas da primeira fase do experimento os animais foram submetidos à segunda fase do experimento que constou de indução anestésica com a mesma técnica inalatória inicial.
26. Seguiu-se a reabertura da laparotomia para nefrectomia esquerda e coleta deste rim para posterior estudo histopatológico.
27. Coleta de 1,5 mL de sangue intra-cardíaco correspondendo ao momento quatro (M4)
28. Sacrifício do animal com sobredose de pentobarbital sódico por via intra-cardíaca.
29. As amostras sangüíneas coletadas foram centrifugadas para obtenção do plasma e armazenadas em freezer a 80°C negativo.

As coletas sangüíneas realizadas em todos os momentos do experimento tiveram como objetivo dosagens de NGAL pelo método imunoenzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Foi utilizado NGAL Rapid Elisa Kit (037) descrito no anexo.

As doses dos fármacos utilizados foram baseadas na prática clínica e na recomendação do “Food and Drug Administration (FDA)”, que utiliza uma fórmula para estimar a bioequivalência entre a dose em rato e a correspondente aos ensaios clínicos em seres humanos e adultos, é fundamentada na área de superfície corporal⁶⁶. A fórmula de conversão da dosagem de ratos para humanos, em mg (μg ou UI).kg⁻¹ é a seguinte:

$$\text{Dosagem equivalente humana} = \text{dosagem no rato} \times 0,16 \text{ ou}$$

$$\text{Dosagem no rato} = \text{dosagem humana} \times 0,16^{-1}$$

A finalidade da nefrectomia à direita foi garantir a avaliação da função pelo rim remanescente e o estudo histológico do mesmo serviu como controle do rim esquerdo após isquemia.

3.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os rins direito e esquerdo dos animais retirados nos diferentes momentos da sequência experimental foram colocados na solução Duboscq-Brasil, durante 24 horas, sendo, a seguir, armazenado em álcool a 70% para posterior avaliação histológica. A solução de Duboscq-Brasil é uma solução utilizada para preservar, fixar as estruturas renais e aumentar a fidedignidade da análise histológica, formulada com álcool 80%, 150 mL; ácido pícrico, 2,4g; formalina 40%, 60 mL; ácido acético glacial, 125 mL.

O corante utilizado para a análise histológica foi a hematoxilina-eosina e os cortes foram verificados sob diversos aumentos na microscopia óptica. Após o preparo das lâminas dos rins, com fixação em parafina, essas foram avaliadas quanto à porcentagem de necrose tubular e classificadas com o uso de um escore descrito por Park et al., 2008⁶⁷ (Tabela 4).

O patologista que realizou a avaliação histológica não teve conhecimento a qual grupo pertencia o rim estudado.

Tabela 4 - Escore dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos

GRAU	TIPO	% DE LESÃO
0	Sem lesão	
1	Leve	< 10% necrose
2	Moderado	10 a 25%
3	Moderado a Grave	25 a 50%
4	Grave	50 a 75%
5	Muito grave	> 75%

Adaptada de Park et al. 2008

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando que o ensaio foi feito com dois tipos de anestésico em quatro tempos, tem-se um esquema em fatorial $2 \times 4 = 8$ tratamentos. Para um total de 10 animais foram analisadas 80 observações. Seguindo o esquema de ANOVA e um ensaio em fatorial com efeito de anestésico e tempo com interação, restrição 72 graus de liberdade para o resíduo, cujo valor causou grande redução na variabilidade residual. Desse modo, o uso de 10 animais foi suficiente para detectar os efeitos considerados.

Para a variável peso, foi utilizada a análise de variância, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas.

Para as variáveis PAS, PAD, PAM, temperatura e ETCO2 foi utilizada a análise de perfil, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas entre as médias.

Todas estas variáveis passaram pelo teste de Box relativo à homogeneidade das matrizes de covariâncias ($p > 0,05$), passaram pelo teste de homogeneidade de variâncias de Levene ($p > 0,05$) e pelo teste de esfericidade de Mauchly ($p > 0,05$).

Para a NGAL foram utilizados os testes de Friedmann para comparação dos momentos e Kruskal-Wallis para comparação dos grupos.

Para as variáveis de histologia foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância utilizado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 PESO DOS ANIMAIS

Embora os animais tenham sido escolhidos aleatoriamente, a média de peso foi maior no grupo 2 (G2) conforme tabela 5.

Tabela 5 - Valores da média e desvio-padrão referentes ao peso e grupos

Grupo	Peso
G1	436,0B $\pm$ 30,3
G2	474,0A $\pm$ 17,8
G3	435,0B $\pm$ 24,2

p = 0,02

Letras maiúsculas comparam médias dos grupos

4.2 TEMPERATURA (T)

Durante todo o experimento houve controle da temperatura dos animais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos (G1, G2 e G3) e diversos momentos estudados (M0, M1, M2 e M3).

Não ocorreu diferença estatisticamente significativa na interação momento *versus* grupo, de acordo com a tabela 6.

Tabela 6 - Valores da média e desvio-padrão referentes à temperatura segundo momentos e grupos

Grupos	Momentos				Média geral dos grupos
	M0	M1	M2	M3	
G1	36,6 ± 0,9	36,8 ± 0,8	37,2 ± 1,3	37,6 ± 0,7	37,0 ± 1,0
G2	37,2 ± 0,8	37,5 ± 1,1	37,9 ± 0,9	37,7 ± 0,6	37,6 ± 0,9
G3	37,2 ± 0,9	37,5 ± 0,4	37,8 ± 0,8	37,9 ± 0,5	37,6 ± 0,7
Média geral dos momentos	37,0 ± 0,9	37,3 ± 0,9	37,6 ± 1,0	37,7 ± 0,6	

Não houve efeito de grupo (p=0,10), momento(p=0,63) e nem da interação grupo x momento(p=0,25)

4.3 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

Os valores da PAM (mmHg) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 (RL) e G2 (HES), mas apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2 comparados com o grupo G3.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos (M0, M1, M2 e M3) assim como interação grupo *versus* momento (Tabela 7 e Figura 3).

Tabela 7 -Valores da média e desvio-padrão referentes à PAM (mmHg) segundo momentos e grupos

Grupo	Momento				Média geral dos grupos
	M0	M1	M2	M3	
G1	107,3 ± 18,3	118,1 ± 15,2	112,3 ± 28,5	111,6 ± 11,8	112,3 ± 19,1A
G2	115,2 ± 13,6	122,3 ± 25,0	120,0 ± 14,1	116,7 ± 14,4	118,6 ± 17,0A
G3	101,0 ± 15,5	86,9 ± 13,1	85,0 ± 15,2	86,5 ± 15,4	89,9 ± 15,7B
Média geral dos momentos	107,9 ± 16,4	108,8 ± 24,2	105,6 ± 24,7	104,7 ± 19,2	

Não houve efeito de momento ($p=0,64$) e nem da interação grupo X momento ($p = 0,76$), mas somente de grupo ($p<0,001$)

Letras maiúsculas comparam médias gerais dos grupos

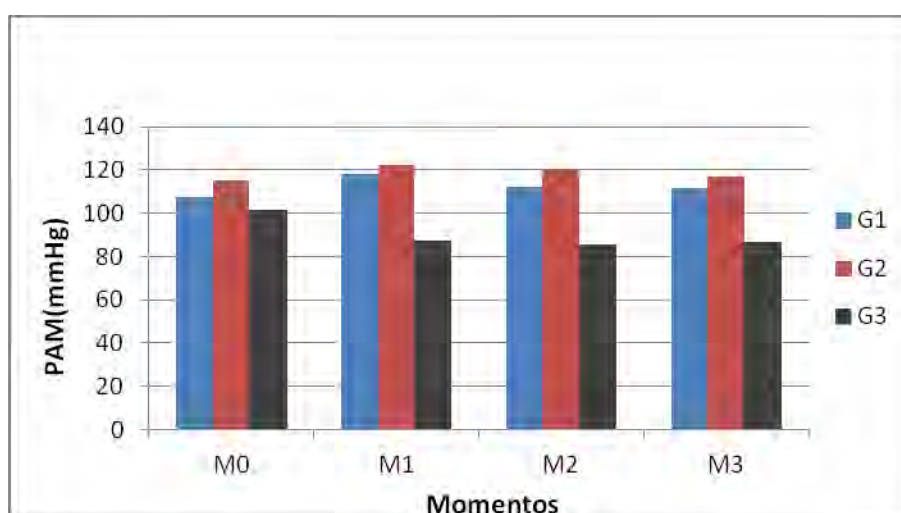


Figura 3 - Valores da PAM (mmHg) segundo momentos e grupos.

4.4 NGAL

Os valores plasmáticos da NGAL (ng.mL^{-1}) foram obtido nos momentos M1 (início do experimento), M2 (trinta minutos após a isquemia), M3(trinta minutos após a reperfusão) e M4 (12 horas após o M1). No M4, os valores da NGAL plasmática foram mais elevados nos três grupos quando comparados com os outros momentos. Nos grupos G1 (RL) e G2 (HES) os valores de NGAL foram elevados alcançando 400 mg.dL^{-1} especificamente no M4, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparados ao G3 neste mesmo momento ($p=0,001$). Não houve significância estatística quando se comparou os três grupos nos outros momentos ($p>0,05$). Quando se comparou os diversos momentos dentro de um mesmo grupo a diferença foi estatisticamente significativa apenas no M4 em relação aos outros momentos ($p=0,001$) (Tabela 8 e Figura 4).

Tabela 8 - Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes aos valores plasmáticos da NGAL segundo momentos e grupos

Grupos	Momentos			
	M1	M2	M3	M4
G1	14,0[4,4; 22,0]b A	12,1[7,7;16,4]b A	17,7[9,5;22,2]b A	400,0[400,0;400,0]a A
G2	6,9[4,5;8,7]b A	11,0[7,4;14,8]b A	11,5[8,8;17,2]b A	400,0[400,0;400,0]a A
G3	11,7[9,4;14,4]ab A	10,2[7,4;10,09]ab A	8,9[6,9;11,0]ab A	75,4[20,5;153,1]a B

Letras minúsculas comparam momentos em cada grupo

Letras maiúsculas comparam grupos em cada momento

P = 0,001 comparando momentos em cada grupo

P = 0,001 comparando os grupos em M4 e $p > 0,05$ comparando os grupos nos outros momentos

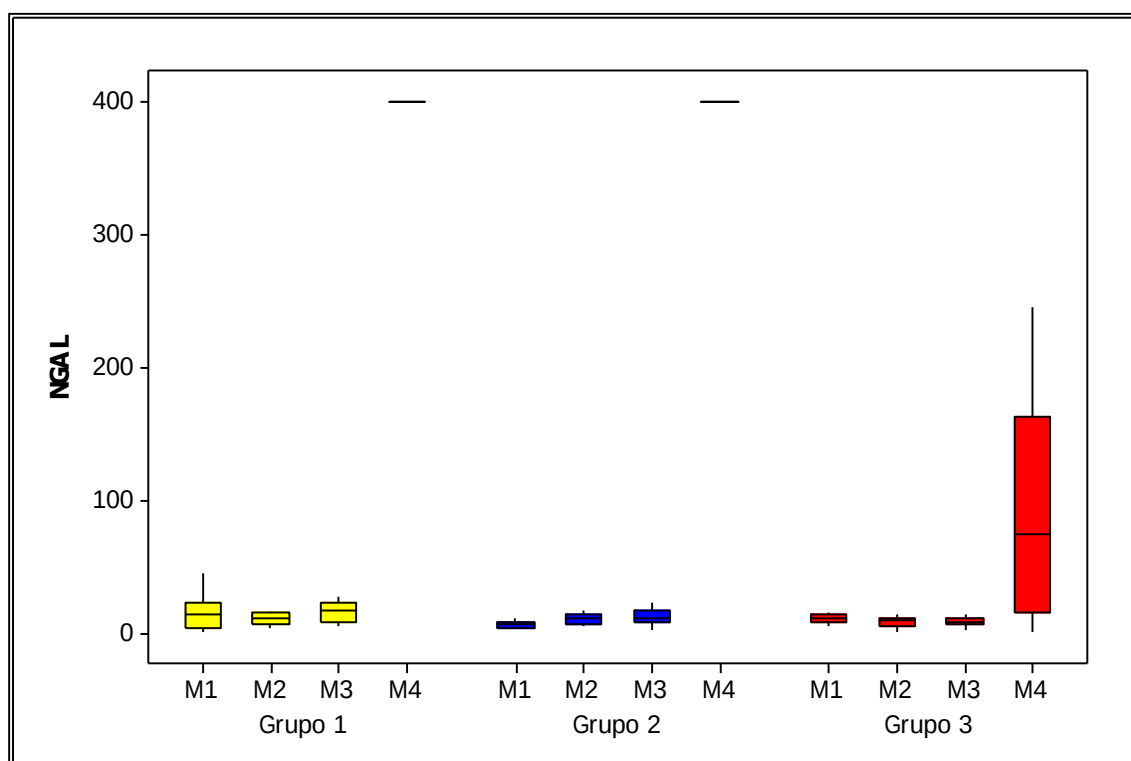


Figura 4 - Boxplot referente aos valores plasmáticos da NGAL (ng.mL^{-1}) nos quatro momentos segundo os grupos.

4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os valores dos escores dos exames histológicos mostraram que quando comparados os rins direitos dos três grupos não encontramos diferença estatisticamente significativa ($p=0,37$). Quando se comparou os rins esquerdos, estes não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 (RL) e G2 (HES), mas apresentaram diferença estatisticamente significativa destes em relação ao grupo G3 ($p<0,01$). Quando se comparou rim direito e esquerdo em cada grupo os dados apresentaram diferença estatisticamente significativa nos grupos G1 e G2 ($p<0,01$) e não houve diferença estatisticamente significativa no grupo G3 ($p=1,00$) (Tabela 9 e Figura 5).

Tabela 9 - Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes aos escores da intensidade da lesão segundo os grupos e rins direito e esquerdo

Grupos	Escore de Lesão	
	Direito	Esquerdo
G1	0[0,0]b A	2[2,3]a A
G2	0[0,0]b A	3[3,5]a A
G3	0[0,0]a A	0[0,0]a B

Grupos seguidos de pelo menos uma letra em comum, não diferem estatisticamente

Letras minúsculas comparam lados em cada grupo ($p < 0,01$ para os grupos Ringer e Amido) e $p = 1,00$ para o Sham

Letras maiúsculas comparam grupos em cada lado ($p = 0,37$) para o lado direito e $p < 0,01$ para o lado esquerdo)

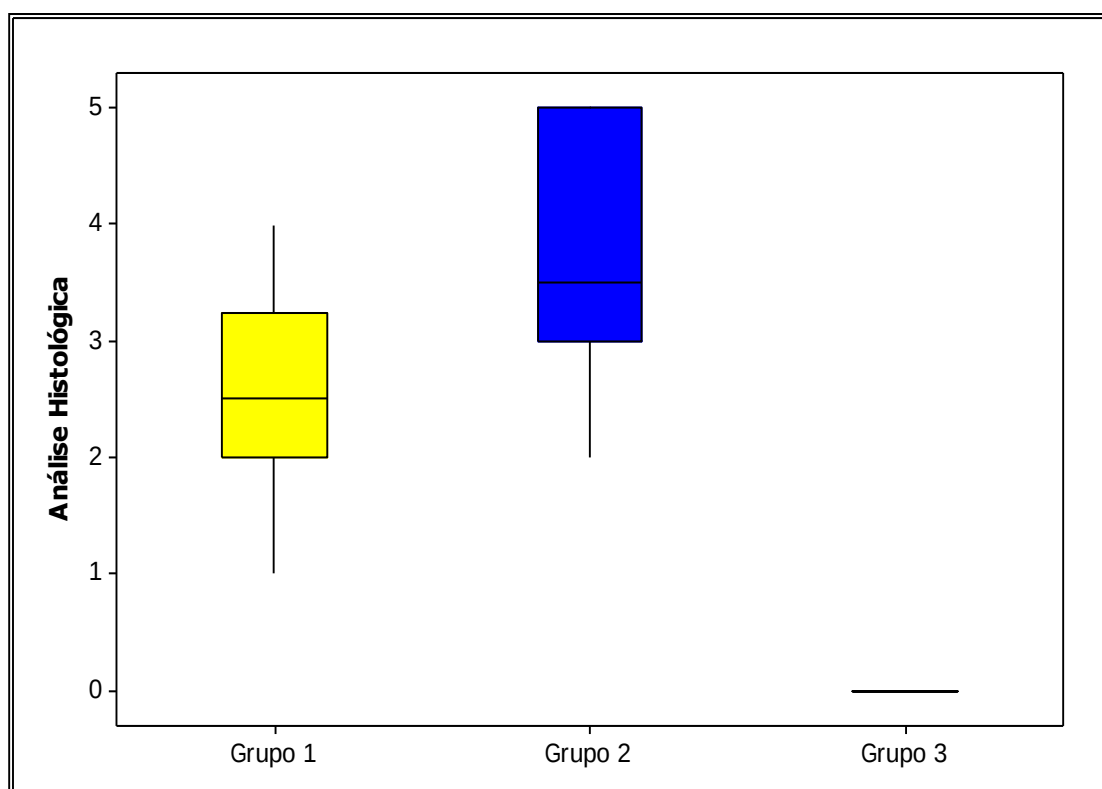


Figura 5 - Escore de lesão dos rins esquerdos em cada grupo.

CORTE HISTOLÓGICO REPRESENTATIVO DO GRUPO G3

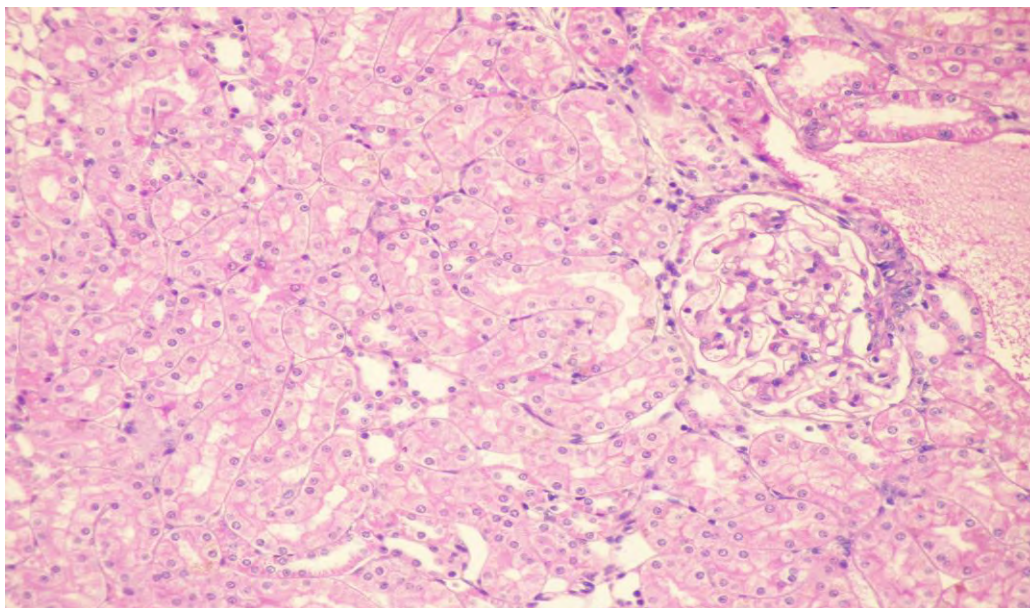


Figura 6 - Corte histológico com tecido renal normal (grau 0 de Park), (aumento 200x).

CORTE HISTOLÓGICO REPRESENTATIVO DO GRUPO G1 (RL)

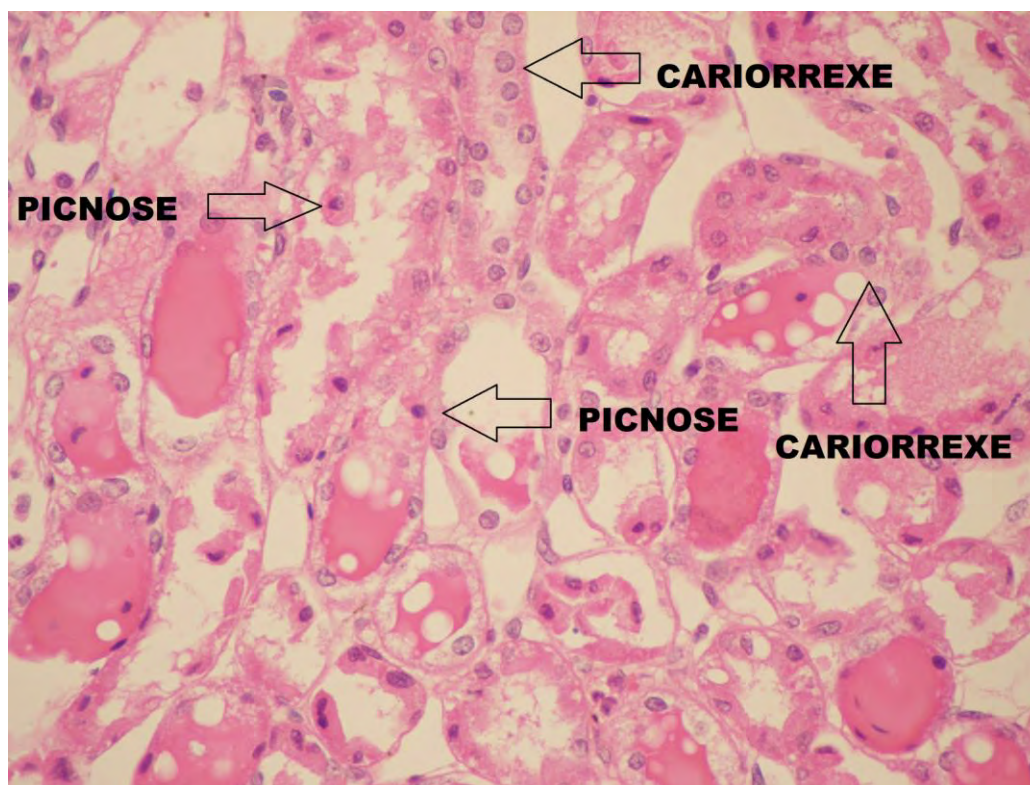


Figura 7 - Corte histológico com tipo de lesão moderada (grau 2 de Park) (aumento 400x).

CORTE HISTOLÓGICO REPRESENTATIVO DO GRUPO G2 (HES)

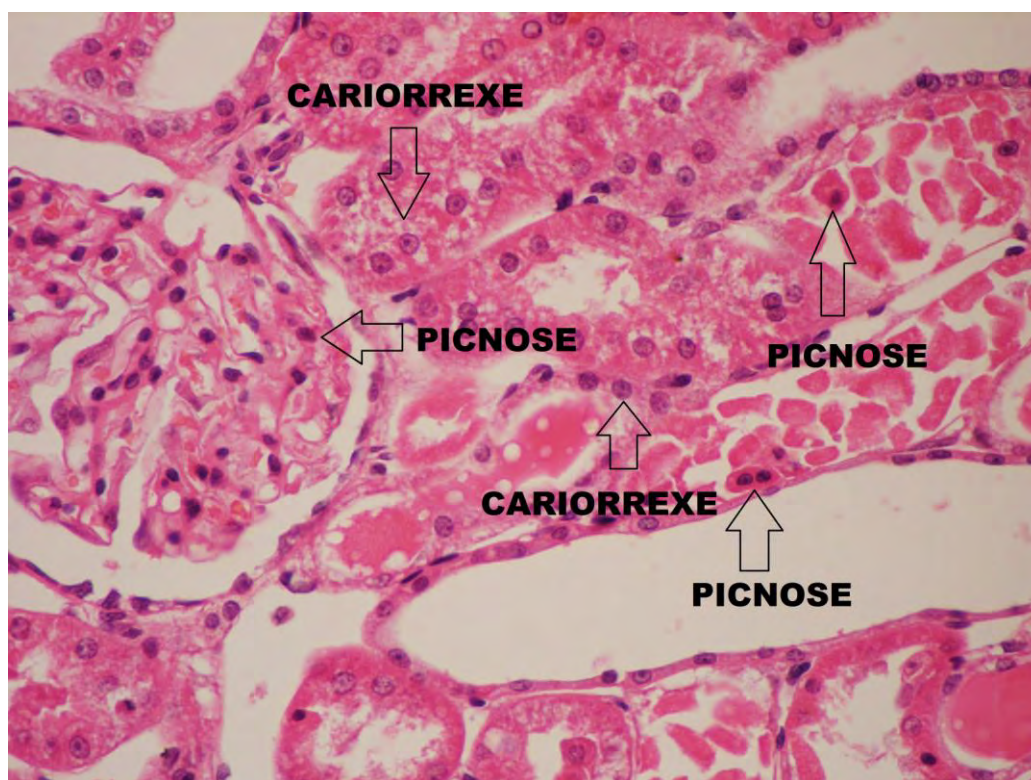


Figura 8 – Corte histológico com tipo de lesão moderada a grave (grau 3 de Park) (aumento 400x).

5 DISCUSSÃO

Para este experimento foram escolhidos ratos machos por serem estes mais susceptíveis à lesão por isquemia e reperfusão⁶⁷. Utilizou-se, o modelo isquemia/reperfusão (I/R) em ratos, desenvolvido pelo Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse interferência do rim contralateral, sendo a isquemia temporária renal executada com *clamp* microvascular atraumático.

Vários autores já relataram atenuação da doença e facilitação da recuperação com a realização da nefrectomia prévia contralateral^{68,69}.

A insuficiência renal aguda oligúrica, que é de pior prognóstico, foi demonstrada em ratos submetidos a clampeamento da artéria renal esquerda sem a realização prévia de nefrectomia contralateral. Nesta mesma pesquisa, nos ratos nos quais houve a realização de nefrectomia contralateral previamente, a insuficiência renal que se instalou foi da forma poliúrica, além desses animais terem apresentado menor dano celular tubular e maior depuração de inulina⁶⁹.

A produção de fatores humorais, que estimulam o crescimento das células renais, aumenta, seguindo a nefrectomia prévia e acelera o reparo das mesmas. 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 (tromboxane A₂, endotelina, etc) parecem estar em maior concentração nos ratos não nefrectomizados⁷⁰⁻⁷².

Entretanto, Islan et al.⁷³ não observaram diferenças entre os rins pré-condicionados por isquemia e os que não foram submetidos a esta técnica nos animais que não sofreram nefrectomia unilateral.

De qualquer forma, a nefrectomia prévia foi realizada para que não houvesse interferência com a avaliação do rim esquerdo, que foi submetido à isquemia.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente, contudo a média de peso foi maior no grupo que utilizou o HES (G2) como líquido de reposição volêmica, comparados com os grupos nos quais se administrou Ringer lactato, G1 e G3 (Controle) com $p=0,02$. Entretanto, os animais eram todos adultos e com a mesma maturidade, o que não interferiu com os parâmetros avaliados na pesquisa.

A susceptibilidade renal à lesão isquêmica parece ser influenciada pela temperatura. Na ausência de isquemia renal a hipertermia não tem efeito adverso sobre a função e morfologia renais ou sobre os estoques renais de fosfato de alta energia, mas quando há instalação da mesma isto não acontece segundo Zager e Altschuld, em 1986⁷⁴.

Estes mesmos autores trabalharam com ratos em normo, hipo e hipertermia, submetidos à isquemia renal total de 25-40 minutos. Com 25 minutos de isquemia, a lesão isquêmica nos ratos normotérmicos desapareceu após 24-48 horas da interrupção do fluxo sanguíneo. Em ratos hipertérmicos (temperatura maior que 38°C) 25 minutos de isquemia causaram lesão renal intensa e nos hipotérmicos (32-35°C) a lesão foi branda e de rápida recuperação. Outros autores também comprovaram a interferência da temperatura com a gravidade da lesão isquêmica^{75,76}.

Durante o experimento vários fatores podem alterar a temperatura. As soluções administradas são frias, abertura de cavidade, respiração com ventilação controlada sem reinalação e sem aquecimento do ar promovem perda rápida de calor. A manutenção da temperatura foi realizada com a colocação de mantas térmicas sob e sobre os animais e controlou-se a temperatura retal. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, sendo que a média da temperatura foi de 37°C para o grupo G1 (RL), de 37,6° para o grupo G2 (HES) e de 37,6°C para o grupo G3 (Controle).

A ausência de alterações histológicas, no grupo G3 (Controle) comprovou que a temperatura não interferiu com os resultados encontrados no experimento.

A anestesia utilizada neste experimento foi a venosa total com propofol associado à remifentanila, que possuem meia vida contexto-dependente favorável a esta forma de administração.

A remifentanila com meia vida contexto-dependente fixa de quatro minutos apresenta comportamento favorável à infusão contínua. A sua rápida metabolização plasmática por esterases específicas e volume de distribuição pequeno fica restrita aos compartimentos centrais. Atinge a estabilidade em torno de dez minutos e permanece constante durante a infusão, não se acumulando em tecido gorduroso. Portanto, é

independente da duração da infusão a recuperação da ventilação espontânea acontece em até sete minutos⁷⁷.

Em ratos submetidos à isquemia/reperfusão a administração de remifentanila determinou maior viabilidade de células renais⁷⁸.

O propofol foi o hipnótico utilizado, tem latência curta, meia-vida contexto-dependente favorável, redistribuição entre os compartimentos central e periférico, cuja rapidez excede o “clearance” plasmático e determina o término de ação ao se interromper a administração.

A utilização desta técnica anestésica poderia ter interferido nos resultados obtidos, uma vez que o propofol é um hipnótico lipofílico com comprovada atividade antioxidante “in vitro” e “in vivo”.

Tem sido axaustivamente demonstrado que os radicais livres de oxigênio desempenham papel importante nas lesões orgânicas determinadas pela isquemia/reperfusão, assim como, foi demonstrada proteção dos tecidos reperfundidos, quando se utilizou os chamados varredores de radicais superóxidos.

Murphy et al.⁷⁹ observaram o efeito antioxidante do propofol (2,6 diisopropilfenol) que mesmo em baixas concentrações (10^{-6} a 10^{-5} mol.L⁻¹), foi capaz de varrer duas espécies de radicais livres. Os autores concluíram que as propriedades de varredura de radicais livres do propofol aproximam-se das do antioxidante endógeno alfa-tocoferol, a vitamina E.

Dogan et al.⁸⁰, em ratos submetidos à isquemia de 60 minutos e com igual período de reperfusão, estudaram os efeitos do tiopental, propofol, solução de lipídeos, etomidato e cetamina administrados 15 minutos antes da isquemia. A avaliação realizada por meio da atividade da catalase, da superóxido desmutase e da dosagem sorológica da malondialdeído, determinou que o tiopental e o propofol são mais efetivos na proteção renal em situações de isquemia/reperfusão.

Outros autores avaliaram em ratos submetidos a igual período de isquemia e reperfusão (60 minutos) os efeitos protetores da administração intraperitoneal de solução de lipídeos e de propofol. Realizaram avaliação histológica da atividade da catalase, da superóxido dismutase e dos valores sorológicos da malondialdeído. O grupo

no qual foi administrado propofol apresentou menores valores do malondialdeído e dos escores de lesão histológica do que no grupo controle e nos que receberam solução de lipídeos⁸¹.

Em suínos observou-se proteção renal com o propofol ($4 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) quando comparado ao sevoflurano (concentração expirada final de 1,5%). Modelo de isquemia e reperfusão determinado pelo clampeamento da aorta durante 30 minutos, acima da bifurcação das artérias renais. Os animais anestesiados com o propofol apresentaram menores valores de creatinina plasmática, infiltração de neutrófilos, níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, produção de radicais livres derivados de oxigênio, peroxidação lipídica e redução da atividade da sintase do NO induzível (iNOS), quando comparados aos anestesiados com o sevoflurano⁸².

Entretanto, em nossa pesquisa tal fato não ocorreu, pois os grupos submetidos à isquemia/reperfusão apresentaram lesão histológica, fato que não ocorreu no grupo controle no qual não realizamos isquemia e que foi submetido à mesma técnica anestésica. A dosagem de NGAL corroborou as alterações histológicas encontradas nos grupos estudados.

A técnica anestésica utilizada poderia ter proporcionado lesões não tão intensas nos grupos estudados, principalmente as encontradas no grupo G2 (HES), que apresentou maior comprometimento na avaliação histológica, embora com resultado não estatisticamente significativo.

Em nossa pesquisa não dosamos malondialdeído nem as atividades das enzimas antioxidantes. As lesões foram avaliadas pela histologia e pela dosagem plasmática do biomarcador de lesão renal, a NGAL.

Embora neste estudo os valores encontrados de pressão arterial média (PAM), revelarem significância estatística entre os grupos G1 e G2 comparados com o G3, $p < 0,001$, não ocorreram alterações histológicas no grupo G3 (Controle) indicando preservação do mecanismo de autorregulação da pressão de perfusão renal.

A estabilidade hemodinâmica foi obtida pela adequação da técnica anestésica e pela administração de líquidos para repor as perdas intraoperatórias.

Um dos grandes desafios da reposição volêmica é a escolha do fluido utilizado. A composição do mesmo bem como o volume administrado podem alterar a função renal. As soluções coloidais são frequentemente utilizadas para restauração do volume providenciando melhor resultado hemodinâmico com pequena quantidade de fluido⁸³. Entretanto existe evidência limitada para justificar seu emprego⁸⁴.

Em grande estudo multicêntrico denominado SAFE (saline versus albumin fluid evaluation), que comparou albumina 4% acrescida de solução salina 0,9% com solução salina 0,9% não houve diferença nos efeitos renais⁸⁵.

Hüter et al.⁸⁶ realizaram estudo controlado randomizado multicêntrico comparando a administração de Ringer lactato *versus* amido (HES 200/0,5) na ressuscitação volêmica em pacientes sépticos (estudo VISEP). Os pacientes que receberam colóide apresentaram risco de desenvolverem duas vezes mais lesão renal aguda (o valor da creatinina sérica ou a necessidade de terapia de reposição renal aumentaram o dobro).

Schick et al.⁸⁷ demonstraram que mesmo a gelatina ou o amido de baixo peso molecular podem determinar aumento dos biomarcadores de lesão renal e causar alterações histológicas no túbulo renal quando comparados a soluções cristalóides em modelo de sepse em roedores.

A lesão renal que pode ter como causa a administração de colóides, embora não totalmente compreendida, parece envolver efeitos moleculares diretos ou ser determinada pela pressão oncótica elevada⁸⁸.

Embora a utilização de amidos de baixo peso molecular possa ser mais segura, Prowle e Belomo⁸³ acrescentam que até agora não existe estudo prospectivo randomizado com poder estatístico suficiente para afirmar benefício clínico e segurança destas soluções quando comparadas aos cristalóides.

Entretanto, a composição das soluções cristalóides também pode provocar impacto na função renal. As soluções salinas contêm 154 mmol/L de cloro e sua administração em grandes volumes podem causar hiperclorêmia relativa e absoluta^{89,90}. Em seres humanos esta alteração pode determinar redução no fluxo sanguíneo renal e deterioração na excreção de sódio⁸⁹⁻⁹¹.

Soluções cristalóides mais balanceadas e com concentração de cloro mais próxima da concentração fisiológica causam menor distúrbio no equilíbrio ácido-base^{83,87}.

Se levarmos em consideração a composição do Ringer lactato esta solução parece ser adequada para esta finalidade, uma vez que, é isotônico e com composição semelhante a do plasma. Entretanto, embora seja a mais estudada das soluções isotônicas cristalóides, o RL, em estudos animais, esteve relacionado com expressivo aumento de diversas moléculas de adesão dentre elas, molécula de adesão intercelular 1, molécula de adesão vascular, molécula de adesão plaquetária e molécula de adesão neutrofílica. Solução de RL também foi relacionada com aumento de apoptose de células endoteliais, macrófagos, musculares lisas e epiteliais de intestino, fígado e pulmão⁹²⁻⁹⁵.

O HES mostrou ter efeito deletério em modelos animais dose-dependente incluindo eclosão oxidativa dos neutrófilos e apoptose pulmonar pior do que a produzida pela solução de RL. Entretanto, ele teve também alguns benefícios como restabelecer o equilíbrio entre proteínas proapoptóticas e antiapoptóticas.⁹⁶⁻¹⁰⁰

Em nossa pesquisa, utilizamos o hidroxietilamido (HES) que é um colóide sintético com propriedades farmacológicas que mais se assemelham aos colóides naturais. Além de ser um expansor de volume, o seu emprego no contexto da sepse, tem sido associado com a redução dos níveis de moléculas de adesão circulante reduzindo, portanto, o dano endotelial. Adicionalmente, HES tem efeitos microvasculares na cascata da coagulação por elevação nos níveis de proteína C e proteína S. O alto custo da albumina tem promovido o uso mais difundido de soluções de HES, entretanto, existe a contínua preocupação com a possibilidade de efeitos adversos incluindo coagulopatias, reações anafilatóides e lesão renal. Casos de LRA ou semelhante à nefrose osmótica em biópsia foram relatados e atribuídos ao uso de HES. Diversos estudos apresentaram resultados conflitantes, alguns implicando o uso de HES na deterioração da função renal, e outros refutando esta relação¹⁰¹⁻¹⁰⁹.

Observamos na literatura que existem relatos de lesão renal com a administração de colóides em situação de risco para lesão renal, mas também onde este pré-requisito não está presente.

Em nossa pesquisa, como foi realizada isquemia renal durante 30 minutos, a administração do amido pode ter contribuído para a gravidade da lesão renal que se instalou.

Quando analisamos o resultado do exame histológico, os rins que foram submetidos à isquemia renal apresentaram necrose das células tubulares renais, caracterizada por picnose nuclear, cariorrexe e cariólise ou cromatólise, sendo que no grupo G2, as lesões foram mais graves, embora não estatisticamente significativas.

Entretanto, o biomarcador de lesão renal, a NGAL, não apresentou valores com diferença estatística nos grupos submetidos à isquemia/reperfusão.

A partir do processo isquêmico uma cadeia de eventos químicos intra e extracelulares é ativada resultando, frequentemente, em disfunção parcial ou total, com necrose celular e perda definitiva de funções. Com a interrupção da isquemia e restauração do fluxo sanguíneo, outra cadeia de eventos se sobrepõe ocasionando lesões adicionais denominadas como lesões por reperfusão¹¹⁰.

A reperfusão de tecidos isquêmicos está frequentemente associada com a disfunção microvascular com comprometimento da dilatação das arteríolas do endotélio, aumento da filtração de fluidos, agregação dos leucócitos aos capilares, migração de leucócitos e extravasamento de proteínas plasmáticas nas vênulas pós-capilares. No período inicial após a reperfusão, a ativação das células endoteliais, em todos os segmentos da microcirculação, produz mais radicais de oxigênio e menor quantidade de óxido nítrico. Nas células endoteliais, o desequilíbrio entre os superóxidos e o óxido nítrico leva a produção e a liberação de mediadores inflamatórios (tais como, fator ativador de plaqueta e fator de necrose tumoral) e aumenta a biossíntese de moléculas de adesão que mediam a adesão celular leucócito-endotelial¹¹¹.

Mishra et al.¹¹² foi o primeiro a propor a NGAL como um novo marcador de lesão. Em modelos de lesão por isquemia/reperfusão, ratos submetidos à oclusão bilateral das artérias renais por 30 minutos, a NGAL foi facilmente detectada na urina dentro de duas horas seguidas à isquemia. Neste mesmo estudo, distintos grupos de ratos foram submetidos a 5, 10 e 20 minutos de isquemia. A NGAL urinária (uNGAL) foi detectada em todos os ratos, aparecendo após 6 horas nos animais com cinco

minutos de isquemia e após quatro horas naqueles com 10 e 20 minutos de isquemia. Assim, a uNGAL revelou ser um marcador sensível de LRA isquêmica e seus valores foram correlacionados com a dose e a duração da isquemia renal.

A NGAL se expressa após a lesão renal aguda e é rapidamente induzida e liberada em lesões de nefrons distais em estudos experimentais e em algumas doenças em seres humanos^{27,113}.

As concentrações plasmática e urinária da NGAL aumentam devido à gravidade e a duração da lesão renal e diminuem com a atenuação da mesma^{27-29,114}. É uma proteína ligada aos neutrófilos, regulada pelo gen NF-kB (fator nuclear kappa B) relacionado com a resposta imune e com alta expressão no tecido renal, com elevação de 68 a 138 vezes entre 6 e 36 horas após a lesão¹¹⁵. Está envolvida na recuperação de células tubulares renais imediatamente após lesão inflamatória ou isquêmica. Em modelo experimental, em ratos, de lesão por isquemia e reperfusão, constatou-se que uma simples dose de NGAL administrada durante a fase inicial, protege o rim, preserva a integridade tubular e minimiza a azotemia^{27,109}.

Estando a NGAL envolvida na fisiopatologia das doenças renais agudas, pode representar uma nova terapêutica baseada na sua capacidade de regeneração das células tubulares¹¹⁶.

Em tecido humano saudável a NGAL encontra-se apenas em níveis mínimos ou ausentes. Aproximadamente 50% das células tubulares corticais são NGAL positivas em situação de isquemia ou danos renais por nefrotoxinas, sugerindo que a NGAL possa ser marcador sensível da lesão renal¹⁰⁹.

A NGAL parece apresentar características de marcador em tempo real para detecção de lesão renal aguda e tornar-se o biomarcador ideal para conceituar e definir a lesão e doença renal aguda em substituição aos parâmetros atualmente utilizados como creatinina e débito urinário¹⁹.

Em nosso estudo, os animais dos grupos G1 (RL) e G2 (HES) após retirada do rim direito, foram submetidos a um período de 30 minutos de isquemia por meio da ligadura da artéria renal esquerda seguido por um período de desclampamento desta artéria. Os valores da NGAL estiveram expressivamente aumentados 12 horas após os

outros momentos do experimento, chegando a valores de 400 ng.mL^{-1} . Sendo esta a capacidade máxima de aferição pelo equipamento utilizado para quantificação da mesma, é possível que a NGAL tenha alcançado valores ainda mais elevados.

Ocorreu elevação nos valores da NGAL dentro da faixa de normalidade no grupo G3 (Controle). As possíveis causas aventadas podem ter sido o trauma cirúrgico pela laparotomia, nefrectomia direita, manipulação de alça intestinal e ventilação pulmonar.

Os critérios microscópicos utilizados para caracterizar a necrose das células tubulares foram os seguintes: picnose nuclear, cariorrexe e cariólise ou cromatólise (rompimento de membranas celulares)⁶⁷.

Picnose é a alteração degenerativa do núcleo da célula que apresenta um volume reduzido (diminui até menos de 6 micras de diâmetro) e torna-se hipercorada, tendo sua cromatina condensada. A picnose é um processo que indica a necrose do tecido e, eventualmente, pode ocorrer fragmentação do núcleo picnótico (núcleo celular cuja cromatina está condensada devido a um processo patológico). 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. 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 completamente¹¹⁷.

A análise histológica das lâminas dos rins, utilizando o escore de lesão proposto por Park et al., 2008⁶⁷, para a avaliação da necrose tubular, demonstrou que os animais pertencentes ao grupo G3 (Controle) não apresentaram lesão histológica (escore zero), evidenciando um bom controle térmico e hemodinâmico do experimento. Os rins direitos dos grupos G1 e G2 também tiveram escore de lesão igual a zero. O menor escore de lesão dos rins esquerdos no grupo G1 (RL) foi 2 e o maior escore foi 3. O menor escore de lesão dos rins esquerdos no grupo G2 (HES) foi 3 e o maior escore foi 5. Estes resultados podem apontar para uma ação mais lesiva dos colóides sobre os rins em situação de isquemia/reperfusão.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo a NGAL encontrou-se expressivamente aumentada 12 horas após, em todos os animais submetidos à isquemia renal sob anestesia venosa total, independente do tipo da reposição volêmica.

As alterações histológicas observadas nos grupos G1(RL) e G2 (HES) correlacionaram-se com os valores de NGAL plasmática.

7 REFERÊNCIAS

1. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2008; 23:2152-7.
2. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Bates S, Ronco C. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Crit Care Med*. 2006; 34(7):1913-7.
3. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int*. 2008; 73: 538-46.
4. Bagshaw SM, George C, Dinu I, Bellomo R. A multi-centre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(4):1203-10.
5. Ostermann M, Chang RW. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE. *Crit Care Med*. 2007;35(8):1837-43; quiz 1852.
6. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005;294(7):813-8.
7. Bagshaw SM, Laupland KB, Doig CJ, Mortis G, Fick GH, Mucenski M, et al. Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study. *Crit Care*. 2005;9(6):R700-9.
8. Chang CH, Lin CY, Tian YC, Jenq CC, Chang MY, Chen YC, et al. Acute kidney injury classification: comparison of AKIN and RIFLE criteria. *Shock*. 2010;33(3):247-52.
9. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-12.
10. Azevedo VL, Silveira MA, Santos JN, Braz JR, Braz LG, Módolo NS. Postoperative renal function evaluation, through RIFLE criteria, of elderly patients who underwent femur fracture surgery under spinal anesthesia. *Ren Fail*. 2008;30(5):485-90.
11. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1133-8.
12. Snoeijs MG, van Heurn LW, Buurman WA. Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(2):190-9.
13. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:463-93.

14. 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(9466):1231-8.
15. Bagshaw SM, Bellomo R, Devarajan P, Johnson C, Karvellas CJ, et al. [Review article: Acute kidney injury in critical illness]. *Can J Anaesth*. 2010; 57 (11): 985-98.
16. 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(9):1008-16.
17. Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Curr Opin Crit Care*. 2010; 16: 526-32.
18. Cruz DN, de Cal M, Garzotto F, Perazella MA, Lentini P, Corradi V, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population. *Intensive Care Med*. 2010;36(3):444-51.
19. Haase M, haase-Fielitz A, Bellomo R, Mertens PR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18: 11-8.
20. Cruz DN, Ronco C, Katz N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for detecting cardiac surgery-associated acute kidney injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(5):1101-6.
21. Xin C, Yulong X, Yu C, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 predict acute kidney injury after cardiac surgery. *Ren Fail* 2008; 30:904-13.
22. 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.
23. 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.
24. Soni SS, Ronco C, Katz N, Cruz DN. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif*. 2009;28(3):165-74.
25. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med*. 2008; 148:810-9.

26. Soni SS, Cruz D, Bobek I, Chionh CY, Nalesso F, Lentini P, et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol*. 2010;42(1):141-50.
27. Mishra J, Ma Q, 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.
28. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Bennett M, Mitsnefes MM, Barasch J, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care*. 2007;11(6):R127.
29. Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3):665-73.
30. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2008;241:89-94.
31. Coca SG, Yalavarth R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int*. 2008;73(9):1008-16.
32. 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.
33. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, Story D, Matalanis G, Dragun D, et al. Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery--a prospective cohort study. *Crit Care Med*. 2009;37(2):553-60.
34. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, Bennett M, Story D, Matalanis G, et al. The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(11):3349-54.
35. 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.
36. 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.
37. 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.

38. Finn WF. The clinical and renal consequences of contrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(6):i2-10.
39. 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.
40. Harbord RM, Deeks JJ, Egger M, Whiting P, Sterne JA. A unification of models for meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Biostatistics*. 2007;8(2):239-51.
41. Gaspari F, Cravedi P, Mandalà M, Perico N, de Leon FR, Stucchi N, et al. Predicting cisplatin-induced acute kidney injury by urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin excretion: a pilot prospective case-control study. *Nephron Clin Pract*. 2010;115(2):c154-60.
42. Ding H, He Y, Li K, Yang J, Li X, Lu R, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol*. 2007;123(2):227-34.
43. Chen M, Wang F, Zhao MH. Circulating neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a useful biomarker for assessing disease activity of ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(4):355-8.
44. Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M. Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission. *Clin Exp Immunol*. 2003;131(3):528-35.
45. 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.
46. 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.
47. Trachtman H, Christen E, Cnaan A, Patrick J, Mai V, Mishra J, et al. Investigators of the HUS-SYNSORB Pk Multicenter Clinical Trial. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in D+HUS: a novel marker of renal injury. *Pediatr Nephrol*. 2006;21(7):989-94.
48. 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.
49. Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, et al. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(7):1639-45.

50. Spieckermann PG, Bruckner J, Kubler W, Lohr B, Bretschneider HJ. [Preischemic stress and resuscitation time of the heart]. *Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch.* 1969; 35:358-64.
51. Panzer O, Moitra V, Sladen RN. Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists. *Crit Care Clin.* 2009;25(3):451-69.
52. Devlin JW, Roberts RJ. Pharmacology of commonly used analgesics and sedatives in the ICU: benzodiazepines, propofol and opioids. *Crit Care Clin.* 2009;25:431-49.
53. Liang L, Xu G, Zhang Y, Chen W, Li J, Liang T. Resuscitation with hydroxyethyl starch solution prevents bone marrow mononuclear apoptosis in a rat trauma-hemorrhagic shock model. *J Trauma.* 2010;68(3):655-61.
54. Davidson IJ. Renal impact of fluid management with colloids: a comparative review. *Eur J Anaesthesiol.* 2006;23(9):721-38.
55. Thompson WL, Fukushima T, Rutherford RB, Walton RP. Intravascular persistence, tissue storage, and excretion of hydroxyethyl starch. *Surg Gynecol Obstet.* 1970; 131: 965-72.
56. Lindblad G, Falk J. Konzentrationsverlauf von Hydroxyäthylstärke und Dextran in Serum und Lebergewebe von Kaninchen und die histopathologischen Folgen der Speicherung von Hydroxyäthylstärke. *Infusionstherapie.* 1976; 3: 301-3.
57. Paulini K, Sonntag W. Veränderungen des RHS der Ratte nach parenteraler Gabe von Dextran (Mw 40000) und Hydroxyäthylstärke (Mw 40000): Chemische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Infusionstherapie.* 1976; 3: 294-9.
58. Jesch F, Hübner G, Zumtobel V, Zimmermann M, Messmer K. Hydroxyäthylstärke (HÄS 450/0,7) in Plasma und Leber: Konzentrationsverlauf und histologische Veränderungen beim Menschen. *Infusionsther Klin Ernähr.* 1979; 6: 112-7.
59. Wieslander JB, Salemark L, Dougan P. Hydroxyethyl starch increases patency and reduces thrombus formation following arteriotomy/intimectomy in small arteries: an experimental study in the rabbit. *J Reconstr Microsurg.* 1990; 6: 357-61.
60. Boldt J. Hydroxyethylstärke (HES). *Wien Klin Wochenschr.* 2004; 116: 159-69.
61. Boldt J, Priebe HJ. Intravascular volume replacement therapy with synthetic colloids: is there an influence on renal function? *Anesth Analg.* 2003; 96: 376-82.
62. Tsang RK, Mok JS, Poon YS, van Hasselt A. Acute renal failure in a healthy young adult after dextran 40 infusion for external-ear reattachment surgery. *Brit J Plast Surg.* 2000; 53: 701-3.

63. Brooks D, Okeefe P, Buncke HJ. Dextran-induced acute renal failure after microvascular muscle transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108: 2057-60.
64. Pfeifer U, Kult J, Forster H. Ascites als Komplikation hepatischer Speicherung von Hydroxyethylstärke (HES) bei Langzeitdialyse. *Klin Wochenschr.* 1984; 62: 862-6.
65. De Labarthe A, Jacobs F, Blot F, Glotz D. Acute renal failure secondary to hydroxyethylstarch administration in a surgical patient. *Am J Med.* 2001;111(5):417-8.
66. Cui W, Li Y, Li S, Yang W, Jiang J, Han S, et al. Systemic lidocaine inhibits remifentanyl-induced hyperalgesia via the inhibition of cPKCgamma membrane translocation in spinal dorsal horn of rats. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2009;21(4):318-25.
67. 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.
68. Cronin RE, de Torrente A, Miller PD, Bulger RE, Burke TJ, Schrier RW. Pathogenic mechanisms in early norepinephrine-induced acute renal failure: functional and histological correlates of protection. *Kidney Int.* 1978 Aug;14(2):115-25.
69. Fernandez-Repollet E, Finn WF. Effect of contralateral nephrectomy on the initial phase postischemic acute renal failure in the rat. In: Eliahou HE. ed. *Acute Renal Failure*. London: J. Libbey. 1982. p.262-82.
70. Kon V, Yoshioka T, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1762-7;
71. Collins DM, Coffman TM, Klotman PE. The role of thromboxane in the pathogenesis of acute renal failure. In: Solez K, Racusen LC. eds. *Acute Renal Failure: Diagnosis Treatment and Prevention*. New York: M. Dekker. 1991. p. 13-43.
72. Lüscher TF, Bock HA, Yang ZH, Diederich D. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: perspectives in nephrology. *Kidney Int.* 1991 Apr;39(4):575-90.
73. 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.
74. Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol.* 1986 Jul;251(1 Pt 2):F87-93.
75. Finn WF. Post-ischemic acute renal failure: variation in the initial phase. In: Eliahou HE. ed. *Acute Renal Failure*. London: J. Libbey. 1982. p.267-76.

76. 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.
77. Glass PS, Gan TI, Howell S. A Review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl. Model development. *Anesthesiology* 1997;86:10-23.
78. Vianna PTG, Castiglia YMM, Braz JRC, Viero RM, Beier S, Vianna Filho PTG et al. Remifentanyl, isoflurane, and preconditioning attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplant Proc.* 2009;41:4080-2.
79. Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth.* 1992 Jun; 68(6):613-8.
80. Dogan Z, Yuzbasioglu MF, Kurutas EB, Yildiz H, Coskuner I, Senoglu N, et al. Thiopental improves renal ischemia-reperfusion injury. *Ren Fail.* 2010 Jan; 32(3):391-5.
81. Yuzbasioglu MF, Aykas A, Kurutas EB, Sahinkanat T. Protective effects of propofol against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Ren Fail.* 2010 Jun; 32(5):578-83.
82. Rodriguez-Lopez JM, Sanchez-Conde P, Lozano FS, Nicolas JL, Garcia-Criado FJ, Cascajo C, et al. Laboratory investigation: effects of propofol on the systemic inflammatory response during aortic surgery. *Can J Anaesth.* 2006 Jul; 53(7):701-10.
83. Prowle JR, Bellomo R. Fluid administration and the kidney. *Curr Opin Crit Care.* 2010 Aug;16(4):332-6.
84. Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 17;(4); doi CD000567.
85. Finfer S, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R et al. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *SAFE Study Investigators. N Engl J Med.* 2004 May 27;350(22):2247-56.
86. Hüter L, Simon TP, Weinmann L, Schuerholz T, Reinhart K, Wolf G et al. Hydroxyethylstarch impairs renal function and induces interstitial proliferation, macrophage infiltration and tubular damage in an isolated renal perfusion model. *Crit Care.* 2009;13(1):R23.
87. Schick MA, Isbary TJ, Schlegel N, Brugger J, Waschke J, Muellenbach R et al. The impact of crystalloid and colloid infusion on the kidney in rodent sepsis. *Intensive Care Med.* 2010 Mar;36(3):541-8.
88. Schortgen F, Brochard L. Colloid-induced kidney injury: experimental evidence may help to understand mechanisms. *Crit Care.* 2009;13(2):130-6.

89. Reid F, Lobo DN, Williams RN, Rowlands BJ, Allison SP. (Ab)normal saline and physiological Hartmann's solution: a randomized double-blind crossover study. *Clin Sci (Lond)*. 2003 Jan;104(1):17-24.
90. Scheingraber S, Rehm M, Sehmisch C, Finsterer U. Rapid saline infusion produces hyperchloremic acidosis in patients undergoing gynecologic surgery. *Anesthesiology*. 1999 May;90(5):1265-70.
91. Wilcox CS. Regulation of renal blood flow by plasma chloride. *J Clin Invest*. 1983 Mar;71(3):726-35.
92. Sakr Y, Payen D, Reinhart K, Sipmann FS, Zavala E, Bewley J et al. Effects of hydroxyethyl starch administration on renal function in critically ill patients. *Br J Anaesth*. 2007; 98 (2): 216-24.
93. Suttner S, Boldt J. Volume replacement with hydroxyethyl starch: is there an influence on kidney function? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2004; 39:71-7.
94. Boldt J, Muller M, Heesen M, Neumann K, Hempelmann GG. Influence of different volume therapies and pentoxifylline infusion on circulatory soluble adhesion molecules in critically ill patients. *Crit Care Med*. 1996; 24: 385-91.
95. Boldt J, Heesen M, Welters I, Padberg W, Martin K, Hempelmann G. Does the type of volume therapy influence endothelial-related coagulation in the critically ill? *Br J Anaesth*. 1995; 75: 740-6.
96. Barron ME, Wilkes MM, Navickis RJ. A systematic review of the comparative safety of colloids. *Arch Surg*. 2004; 139: 552-63.
97. De Labarthe A, Jacobs F, Blot F, Glotz D. Acute renal failure secondary to hydroxyethylstarch administration in a surgical patient. *Am J Med*. 2001; 111: 417-18.
98. Winkelmayr WC, Glynn RJ, Levin R, Avorn J. Hydroxyethyl starch and change in renal function in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Kidney Int*. 2003; 64: 1046-9.
199. Schortgen F, Lacherade JC, Bruneel F, et al. Effects of hydroxyethylstarch and gelatin on renal function in severe sepsis: a multicentre randomised study. *Lancet* 2001; 357: 911-6.
100. Neff TA, Doelberg M, Jungheinrich C, Sauerland A, Spahn DR, Stocker R. Repetitive large-dose infusion of the novel hydroxyethyl starch 130/0.4 in patients with severe head injury. *Anesth Analg*. 2003; 96: 1453-9.
101. Alam HB, Sun L, Ruff P, Austin B, Burris D, Rhee P.E-and P-selectin expression depends on the resuscitation fluid used in hemorrhaged rats. *J Surg Res*. 2000 94:145Y152.

102. Deb S, Martin B, Sun L, Ruff P, Burris D, Rich N, DeBreux S, Austin B, Rhee P. Resuscitation with lactated Ringer's solution in rats with hemorrhagic shock induces immediate apoptosis. *J Trauma*.1999; 46:582Y588.
103. Deb S, Sun L, Martin B, Talens E, Burris D, Kaufmann C, Rich N, Rhee P. Lactated Ringer's solution and hetastarch but not plasma resuscitation after rat hemorrhagic shock is associated with immediate lung apoptosis by the upregulation of the bax protein. *J Trauma*.2000; 49:47Y53.
104. Ayuste EC, Chen H, Koustova E, Rhee P, Ahuja N, Chen Z, Valeri CR, Spaniolas K, Mehrani T, Alam HB. Hepatic and pulmonary apoptosis after hemorrhagic shock in swine can be reduced through modifications of conventional Ringer's solution. *J Trauma*.2006; 60:52Y63.
105. Heena P. Santry and Hasan B. Alam, Fluid Resuscitation: Past, Present and the future. *Shock*. 2010.33(3): 229-241.
106. Tsai MC, Chen WJ, Ching CH, Chuang JI. Resuscitation with hydroxyethyl starch solution prevents nuclear factor kappaB activation and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *Shock*.2007; 27:527-533.
107. Schmand JF, Ayala A, Morrison MH, Chaudry IH. Effects of hydroxyethyl starch after trauma-hemorrhagic shock: restoration of macrophage integrity and prevention of increased circulating interleukin-6 levels. *Crit Care Med*.1995;23:806-814.
108. Handrigan MT, Burns AR, Donnachie EM, Bowden RA. Hydroxyethyl starch inhibits neutrophil adhesion and transendothelial migration. *Shock*. 2005; 24:434-439.
109. Stanton K, Alam HB, Rhee P, Llorente O, Kirkpatrick J, Koustova E. Human polymorphonuclear cell death after exposure to resuscitation fluids in vitro: apoptosis versus necrosis. *J Trauma*.2003; 54:1065-74.
110. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94:1133-8.
111. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000 Feb; 190(3):255-66.
112. Mishra J, Ma Q, 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.
113. 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.

114. Haase M, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, Story D, Matalanis G, et al. Sodium bicarbonate to prevent increases in serum creatinine after cardiac surgery: a pilot double-blind, randomized controlled trial. *Crit Care Med*. 2009;37(1):39-47.
115. Grigoryev DN, Liu M, Hassoun HT, Cheadle C, Barnes KC, Rabb H. The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(3):547-58.
116. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3073-82.
117. Universidade de São Paulo. Morte cerebral e necrose. Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Available from: www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoartenec.htm.

APÊNDICE

Tabela 10 – Variáveis antropométricas peso (g), pressão arterial sistólica (PAS) (mm Hg), pressão arterial diastólica (PAD)(mmHg), pressão arterial média (PAM)(mmHg), temperatura (T) (°C), pressão expirada de CO₂ (ETCO₂) do Grupo 1

Rato	M	Peso (g)	PAS	PAD	PAM	T	ETCO ₂
1	M0	400	114	87	100	35	18
	M1		138	119	111	37,2	24
	M2		72	39	42	34,2	20
	M3		116	89	103	36,7	23
2	M0	450	109	98	112	37	23
	M1		119	96	123	37	22
	M2		119	98	121	37	23
	M3		130	101	114	38	25
3	M0	390	100	78	88	36,6	17
	M1		136	106	121	37,5	18
	M2		Óbito				
	M3						
3B	M0	420	157	120	136	37	19
	M1		128	105	117	35,2	16
	M2		121	107	109	37,1	19
	M3		133	113	123	36,4	22
4	M0	410	118	86	99	36	22
	M1		112	89	102	36	24
	M2		140	112	124	37,8	20
	M3		102	81	93	38,5	20
6	M0	450	130	103	117	36	22
	M1		169	118	139	37,2	20
	M2		139	104	124	37,5	21
	M3		105	69	105	37	18
7	M0	450	124	100	114	36,5	25
	M1		111	90	99	37,2	17
	M2		118	88	111	36,6	24
	M3		136	105	120	37,4	22
8	M0	490	96	75	85	37	23
	M1		164	121	141	37,2	21
	M2		150	131	142	38,4	24
	M3		144	123	131	38	24
9	M0	450	81	58	79	37,7	25
	M1		121	99	106	36,6	24
	M2		128	101	108	37,4	31
	M3		111	97	112	37,9	31
10	M0	450	135	108	124	37,5	27
	M1		135	114	125	37,6	30
	M2		147	119	130	38,4	28
	M3		129	120	103	38,2	29

Tabela 11 - Variáveis antropométricas(peso (g), pressão arterial sistólica(PAS)(mm Hg), pressão arterial diastólica(PAD)(mm Hg), pressão arterial média(PAM)(mm Hg), temperatura(T)(°C), pressão expirada de CO₂(ETCO₂) do Grupo 2 (HES)

Rato	M	Peso (g)	PAS	PAD	PAM	T	ETCO ₂
11	M1	490	133	105	116	38,2	26
	M2		102	80	93	35,9	34
	M3		144	117	127	36	32
12	M0	470	120	94	116	36,9	23
	M1		134	127	118	39,9	36
	M2		131	96	120	38,2	39
	M3		131	98	124	38	38
13	M0	470	136	122	127	38,2	19
	M1		170	122	145	38	19
	M2		160	127	124	38,2	21
	M3		152	119	134	38,3	21
14	M0	460	170	127	145	37,3	25
	M1		154	124	143	37,2	27
	M2		155	132	145	38,2	27
	M3		135	113	139	38	25
15	M0	480	120	87	104	37,4	30
	M1		138	112	128	38	28
	M2		149	116	131	38	29
	M3		108	82	95	37,5	26
16	M0	500	140	102	118	37,1	21
	M1		140	120	132	36,5	20
	M2		138	113	121	38,6	21
	M3		134	111	121	37,9	22
17	M0	480	129	97	111	37,5	22
	M1		91	37	56	37,2	21
	M2		133	99	113	39	26
	M3		130	91	107	37,9	23
18	M0	490	143	98	116	35,2	27
	M1		148	106	122	35,6	37
	M2		135	102	111	37,9	34
	M3		120	104	106	37,5	41
19	M0	440	109	85	97	37,6	20
	M1		160	115	133	37,5	17
	M2		143	116	130	38,4	20
	M3		124	90	104	37,5	20
20	M0	460	114	84	103	36,7	21
	M1		132	109	121	37,3	27
	M2		127	101	112	37	27
	M3		130	120	110	38	22

Tabela 12 - Variáveis antropométricas, peso (g), pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg), pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg), pressão arterial média (PAM) (mmHg), temperatura (T) (°C), pressão expirada de CO₂ (ETCO₂) Grupo 3

Rato	M	Peso (g)	PAS	PAD	PAM	T
21	M0	420	121	92	107	37,9
	M1		98	63	77	37,3
	M2		127	99	113	36,8
	M3		128	92	111	37,6
22	M0	380	102	75	90	37
	M1		101	61	77	37,9
	M2		96	48	64	37,4
	M3		115	86	101	37,8
23	M0	450	106	71	87	37,6
	M1		121	84	103	37,6
	M2		108	64	83	38,8
	M3		115	75	92	37,9
24	M0	430	109	70	69	38,1
	M1		90	59	72	37,8
	M2		97	53	67	37,8
	M3		96	47	62	37,2
25	M0	440	124	96	112	37,7
	M1		100	65	78	37,5
	M2		114	78	93	38,1
	M3		103	55	74	37,8
26	M0	460	116	86	100	35,8
	M1		108	79	95	37
	M2		115	71	89	38,2
	M3		104	71	89	38
27	M0	460	123	97	110	35,6
	M1		123	96	108	36,8
	M2		110	64	81	36,3
	M3		112	60	76	39
28	M0	450	138	107	122	37,1
	M1		110	80	94	38
	M2		120	79	98	38,4
	M3		122	81	100	37,3
29	M0	440	131	96	113	37,8
	M1		112	76	92	37,1
	M2		113	78	92	38,1
	M3		115	71	89	38
30	M0	420	115	84	100	37,1
	M1		98	58	73	38,1
	M2		96	57	70	38,1
	M3		102	51	71	38,2

Tabela 13 - Dosagem plasmática da lipocaina associada à gelatinase (NGAL) (ng.mL⁻¹) do grupo 1 (G1)

Rato	M	NGAL
1	M1	27,23
	M2	9,74
	M3	10,31
	M4	> 400
2	M1	44,91
	M2	14,69
	M3	19,06
	M4	> 400
3	M1	14,84
	M2	8,17
	M3	9,48
	M4	> 400
4	M1	22
	M2	16,41
	M3	28
	M4	> 400
5	M1	13,12
	M2	38,92
	M3	26,15
	M4	393,89
6	M1	3,81
	M2	7,65
	M3	9,09
	M4	> 400
7	M1	1,71
	M2	4,91
	M3	5,43
	M4	> 400
8	M1	4,39
	M2	7,26
	M3	17,03
	M4	> 400
9	M1	15,31
	M2	16,72
	M3	22,15
	M4	> 400
10	M1	6,35
	M2	14,37
	M3	18,28
	M4	> 400

Tabela 14 - Dosagem plasmática da lipocaina associada à gelatinase (NGAL) (ng.mL⁻¹) do grupo 2 (G2)

Rato	M	NGAL
11	M1	4,52
	M2	17,34
	M3	8,83
	M4	394,81
12	M1	4,39
	M2	8,04
	M3	11,41
	M4	> 400
13	M1	5,96
	M2	12,81
	M3	18,91
	M4	> 400
14	M1	4,39
	M2	7,39
	M3	9,35
	M4	> 400
15	M1	5,57
	M2	5,3
	M3	8,83
	M4	> 400
16	M1	11,25
	M2	14,84
	M3	23,85
	M4	> 400
17	M1	8,43
	M2	6,61
	M3	3,24
	M4	> 400
18	M1	8,7
	M2	15,16
	M3	11,56
	M4	> 400
19	M1	9,74
	M2	13,91
	M3	17,19
	M4	> 400
20	M1	7,91
	M2	9,22
	M3	14,84
	M4	> 400

Tabela 15 - Dosagem plasmática da lipocaína associada à gelatinase (NGAL) (ng.mL⁻¹) do grupo 3 (Controle)

Rato	Momentos	NGAL
21	M1	15,21
	M2	7,36
	M3	15,26
	M4	120,13
22	M1	14,36
	M2	10,17
	M3	5,56
	M4	20,47
23	M1	10,85
	M2	21,6
	M3	9,52
	M4	1,87
24	M1	10,13
	M2	10,64
	M3	6,88
	M4	193,55
25	M1	9,38
	M2	10,13
	M3	7,84
	M4	134,43
26	M1	14,1
	M2	13,93
	M3	12,78
	M4	245,81
27	M1	16,11
	M2	10,85
	M3	10,98
	M4	30,61
28	M1	12,52
	M2	10,26
	M3	8,2
	M4	153,14
29	M1	6,64
	M2	2,31
	M3	2,22
	M4	2,93
30	M1	5,8
	M2	2,04
	M3	9,88
	M4	28,64

Tabela 16 - Histologia renal dos ratos do grupo 1 (G1)

ANIMAL	RIM	
	Direito	Esquerdo
Rato 1	1346	1336
Grau	0	3
Rato 2	1325	1339
Grau	0	3
Rato 3	1368	1314
Grau	0	1
Rato 4	1367	1329
Grau	0	2
Rato 5	1328	1378
Grau	0	2
Rato 6	1376	1342
Grau	0	4
Rato 7	1316	1321
Grau	0	2
Rato 8	1317	1385
Grau	0	3
Rato 9	1379	1347
Grau	0	2
Rato 10	1348	1345
Grau	0	4

Tabela 17 - Histologia renal dos ratos do grupo 2 (HES)

ANIMAL	RIM	
	Direito	Esquerdo
Rato 11	1346	1362
Grau	0	3
Rato 12	1333	1345
Grau	0	4
Rato 13	1384	1318
Grau	0	3
Rato 14	1331	1337
Grau	0	5
Rato 15	1353	1332
Grau	0	5
Rato 16	1356	1322
Grau	0	4
Rato 17	1386	1330
Grau	0	5
Rato 18	1383	1323
Grau	0	3
Rato 19	1363	1354
Grau	0	2
Rato 20	1349	1351
Grau	1	3

Tabela 18 - Histologia renal dos ratos do grupo 3 (Controle)

ANIMAL	RIM	
	Direito	Esquerdo
Rato 21	1482	1483
Grau	0	0
Rato 22	1484	1485
Grau	0	0
Rato 23	1486	1487
Grau	0	0
Rato 24	1488	1489
Grau	0	0
Rato 25	1490	1491
Grau	0	0
Rato 26	1492	1493
Grau	0	0
Rato 27	1494	1495
Grau	0	0
Rato 28	1496	1497
Grau	0	0
Rato 29	1498	1499
Grau	0	0
Rato 30	1500	1501
Grau	0	0

NGAL RAPID ELISA KIT (037)

1 – Preparação dos Reagentes:

Wash Solution – diluir 25x wash solution (30ml) em 750ml de Água destilada ou Deionizada.

Sample Diluente – diluir 5x Sample Diluent(60ml) em 300ml de Água destilada ou Deionizada.

NGAL Rapid Calibradores – 6 pontos de curvas prontos para uso.

HRP-conjugado NGAL - pronto para uso.

TMB Substrato – pronto para uso.

Stop Solution – pronto para uso.

2 - Diluir as amostras nas concentrações de 1/100 para plasma ou soro.

Colocar 990ul de diluente de amostra + 10ul de amostra.

3 - Pipetar 50ul de calibrador, amostras e controles nos poços correspondentes + 50ul do

HRP conjugated NGAL antibody em todos os poços.

4 - Cobrir os poços e incubar por 30 min. Em temperatura ambiente.

5 - Lavar 3x com 300ul de Wash Solution. Inverter a placa e bater em papel absorvente.

6 – Dispensar 100ul de TMB Substrato em todos os poços.

7 – Incubar exatamente por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro.

8 – Adicionar 100ul de Stop Solution em cada poço, mix gentilmente pos 20 segundos.

Fazer a leitura no máximo em 30 minutos.

9 – Fazer a leitura da placa em 450 nm. (650 ou 620nm).